

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium (*in vitro*) menggunakan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) yang diujikan pada bakteri penyebab gingivitis pada pengguna ortodontik cekat.

B. Subyek Penelitian

1. Bahan Uji

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Yogyakarta dan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) diolah di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah populasi bakteri pada penderita gingivitis pengguna ortodontik cekat yang dilakukan dengan cara pengambilan sampel cairan sulkus gingiva menggunakan 2 *paper point* steril yang dimasukkan di dalam area subgingiva pada gigi dan didiamkan selama 20 detik. Ujung *paper point* yang telah diaplikasikan dari sulkus gingiva digunting sebatas meresapnya GCF (*Gingival Crevicular Fluid*) pada *paper point* dengan gunting steril dan langsung dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 3 ml PBS (*Phosphate*

Buffered Saline). Sampel harus sudah dikultur agar terhindar dari kontaminasi.

3. Besar Sampel

Jumlah dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus federer (Arkeman & David, 2006). Kelompok perlakuan adalah daun belimbing wuluh 100%, 50%, 25% dan 12,5%, aquades sebagai kontrol negatif dan khlorhexidin 0,2% sebagai kontrol positif.

$(n-1)(t-1) \geq 15$, yang mana :

t= jumlah kelompok perlakuan

n= jumlah ulang tiap perlakuan

diketahui : t=6

ditanya : n =?

Jawab :

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

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

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

$$n5-5 \geq 15$$

$$n \geq 4$$

n : banyaknya pengulangan

t : banyaknya perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka diperoleh $n = 4$ dan $t = 6$ maka banyaknya pengulangan adalah 4 kali pengulangan kemudian dari hasil tersebut ditambah dengan *drop out* 10% sehingga jumlah

pengulangan tiap kelompok perlakuan yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan (Tanjong, 2011)

Kelompok perlakuan yang berjumlah enam kelompok dibagi menjadi 2 cawan petri. Setiap cawan petri diulang sebanyak 5 kali sehingga dibutuhkan 10 cawan petri.

4. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

a. Kriteria inklusi

- 1) Pasien bersedia menjadi subyek penelitian
- 2) Pasien pengguna ortodontik cekat penderita gingivitis
- 3) Minimal penggunaan ortodontik 6 bulan
- 4) Mengisi *Informed consent*
- 5) Usia pasien 17-24 tahun

b. Kriteria eksklusi

- 1) Merokok
- 2) Sedang mengkonsumsi antibiotik
- 3) Memiliki penyakit sistemik

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 hingga Februari 2017.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

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

2. Variabel Terpengaruh

Biakan populasi bakteri anaerob isolat penderita gingivitis

3. Variabel Terkendali

1) Suhu pembiakan populasi bakteri anaerob

2) Lama pembiakan populasi bakteri anaerob

3) Larutan kuman populasi bakteri anaerob dengan kekeruhan 10^8 CFU/ml

4) Media kultur populasi bakteri adalah TSA (*Tryton Soya agar*)

4. Variabel Tidak Terkendali

Kontaminasi organisme lain seperti jamur.

E. Definisi Operasional

1. Daya hambat adalah kemampuan suatu zat untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan area bening di sekitar sumuran

2. Ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) adalah sediaan pekat yang didapat dengan mengekstraksi zat aktif dari daun belimbing wuluh dengan menggunakan pelarut etanol. Pada penelitian ini dibuat larutan ekstrak 12,5%, 25%, 50% dan 100%.
3. Populasi bakteri anaerob adalah Sejumlah bakteri anaerob yang menyebabkan gingivitis. Bakteri anaerob yang diperoleh dari swab pada cairan sulkus gingiva menggunakan *paper point* pada penderita gingivitis.
4. Gingivitis merupakan suatu respon inflamasi pada gingiva yang menyebabkan gingiva berwarna kemerahan dan mudah berdarah yang disebabkan oleh akumulasi plak yang mengandung bakteri karena faktor lokal seperti tekanan yang berlebih pada penggunaan alat ortodontik.
5. Pasien pengguna alat ortodontik cekat adalah pasien yang menggunakan alat yang dipasang cekat untuk meratakan gigi dan hanya dapat dipasang serta dilepas oleh dokter gigi yang merawat.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian
 - a. Ose steril
 - b. Kapas lidi
 - c. *Paper point*
 - d. Cawan petri
 - e. Pipet dan mikropet
 - f. *Sliding caliper*
 - g. Inkubator

- h. Tabung reaksi
 - i. Rak tabung reaksi
 - j. *Anaerobic jar*
 - k. Oven
 - l. spiritus
 - m. Masker
 - n. *Gloves*
 - o. Neraca digital
2. Bahan penelitian
- a. Biakan populasi bakteri anaerob hasil swab dari penderita gingivitis pengguna ortodontik cekat di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY
 - b. Ekstrak daun belimbing wuluh konsentrasi 100% , 50%, 25%, 12,5%
 - c. khlorhexidin 0,2%
 - d. Aquades steril
 - e. Agar TSA
 - f. Larutan media cair *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai media penyubur bakteri
 - g. NaCl 0,9%
 - h. PBS (*Phosphate Buffered Saline*)

G. Jalannya Penelitian

- 1. Tahap persiapan penelitian
 - a. Persiapan subyek penelitian
 - 1) Mengurus surat ijin penelitian

- 2) Mengurus *ethical clearance*
- 3) Memilih subyek penderita gingivitis pengguna ortodontik cekat sesuai kriteria inklusi
- 4) Menyiapkan *informed consent*

b. Sterilisasi alat

Alat yang digunakan untuk uji bakteri yang terbuat dari kaca yang disterilkan dengan oven yang suhunya 180°C – 200°C selama 1 jam, sedangkan untuk media agar darah dapat disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 200°C.

2. Pembuatan ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*)

Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh dilakukan di laboratorium penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pembuatan ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) dengan cara maserasi. Sebelum di maserasi, daun belimbing wuluh dicuci bersih. Daun belimbing wuluh seberat 3 kg dikeringkan dengan temperatur (32-35°C) dan dihindarkan oleh sinar matahari langsung sampai mengering. Setelah itu, diblender sampai halus menjadi serbuk. Serbuk daun belimbing wuluh dimaserasi dengan etanol 70% selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan corong *buchner*. Setelah proses maserasi, serbuk yang masih tersisa digunakan kembali untuk proses remaserasi untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang maksimum. Filtrat diuapkan dengan menggunakan *Rotary Evaporator* untuk menghilangkan pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak yang pekat dan kental dengan berat ±300 gram

dengan konsentrasi 100%. Ekstrak daun belimbing wuluh murni diencerkan dengan menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, yaitu 50%, 25%, 12,5% dan 100%. Pengenceran diperoleh dengan cara pengenceran aquades steril dengan perhitungan sebagai berikut.

$$M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$$

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 bakteri anaerob dan kultur bakteri

Populasi bakteri gingivitis diperoleh melalui isolasi dari cairan sulkus gingiva penderita gingivitis. Sampel bakteri diambil dengan cara memasukkan *paper point* ke dalam sulkus gingiva. Kemudian, *paper point* dipotong menggunakan gunting steril. Setelah itu, dimasukkan ke tabung yang berisi 3ml PBS. Sampel dalam PBS digetarkan menggunakan *centrifuge* dengan kecepatan 10.000rpm selama 30 detik. Setelah itu, 1ml sampel diencerkan dengan 9ml larutan aquades dan dibuat 5 kali pengenceran. Larutan sampel yang telah diencerkan diambil sebanyak 1ml ditanam dalam media TSA lalu

diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dalam *anaerobic jar* sehingga terjadi pertumbuhan koloni bakteri.

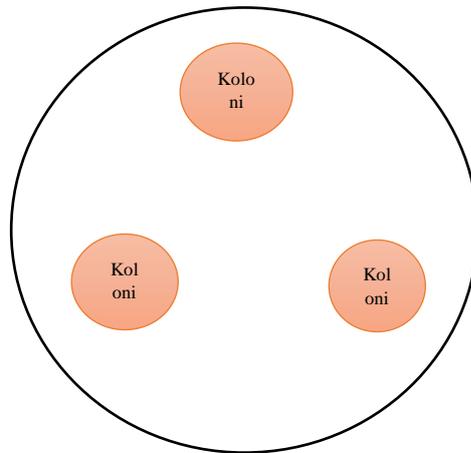
b. Persiapan bakteri uji

Satu koloni diambil dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam tabung yang berisi NaCl 1ml, kemudian diinkubasikan lagi selama 2-4 jam pada suhu 37°C. Kemudian, larutan dibuat suspensi sesuai standar brown III yaitu diencerkan dengan media BHI dengan digojok hingga kekeruhan 10^8 CFU/ml.

4. Uji kepekaan bakteri

a. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

Setelah didapatkan standar konsentrasi bakteri, bakteri diambil dengan menggunakan kapas lidi steril dan dioleskan kepada permukaan media TSA secara merata. Kemudian, dibuat lubang sumuran sebanyak 3 lubang pada 1 cawan petri, dengan masing-masing berdiameter 5mm dan kedalaman 3mm. Seluruh lubang diisi dengan konsentrasi ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L*) 100%, 50% , 25% ,12,5%, aquades sebagai kontrol negatif dan khlorhexidin 0,2% sebagai kontrol positif. Pemindehan bakteri dari suatu tempat ke tempat lainnya harus dilakukan didekat spritus. (Kartikasari *et al.*, 2012)



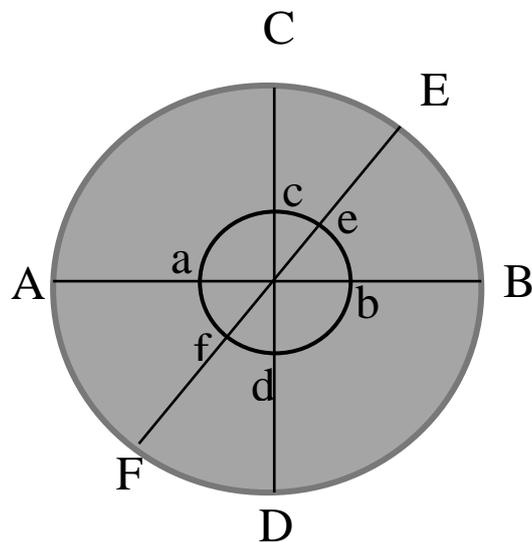
Gambar 4. Sumuran cawan petri

Langkah pengulangan sebanyak 5 kali. Setelah semua cawan petri sudah ditetesi ekstrak, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam *anaerobic jar*.

b. Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter. 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 hambat (C-D) dikurangi diameter lubang sumuran (c-d) kemudian hasilnya dibagi 2. Pengukuran ketiga menggunakan diameter hambat (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 (Kartikasari *et al.*, 2012)



Gambar 5. Pengukuran zona radikal

A,B,C,D,C,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

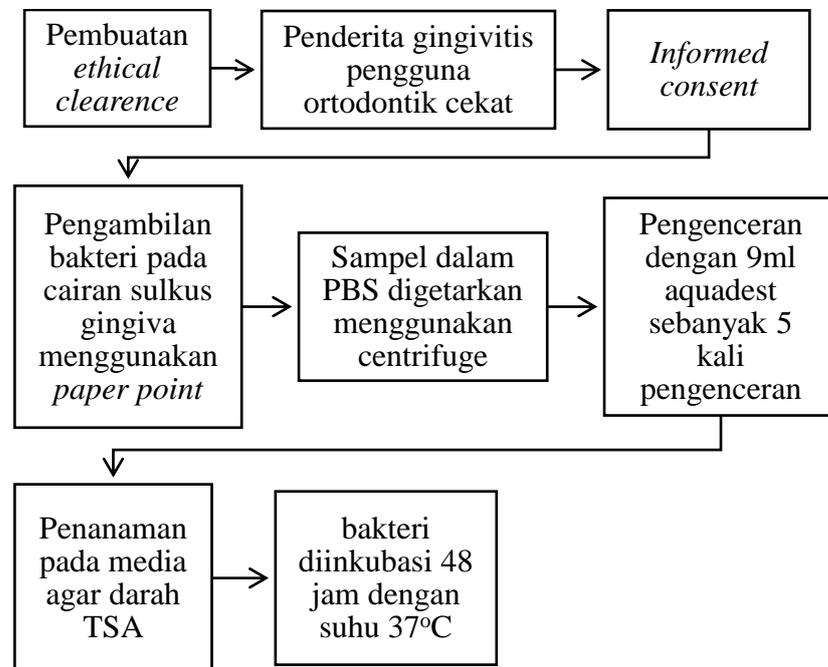
- a) Jenis data : data primer
- b) Pengolahan : spss versi 15.0
- c) Analisis data :

Metode analisis statistik yang digunakan adalah :

1. Uji Normalitas data dan uji variansi data dengan metode *Shapiro-Wilk* karena sampel berjumlah ≤ 50 .
2. Metode uji statistik *One way ANOVA* atau *Kruskal Wallis*
3. Uji LSD (*Least Significance Diference*)

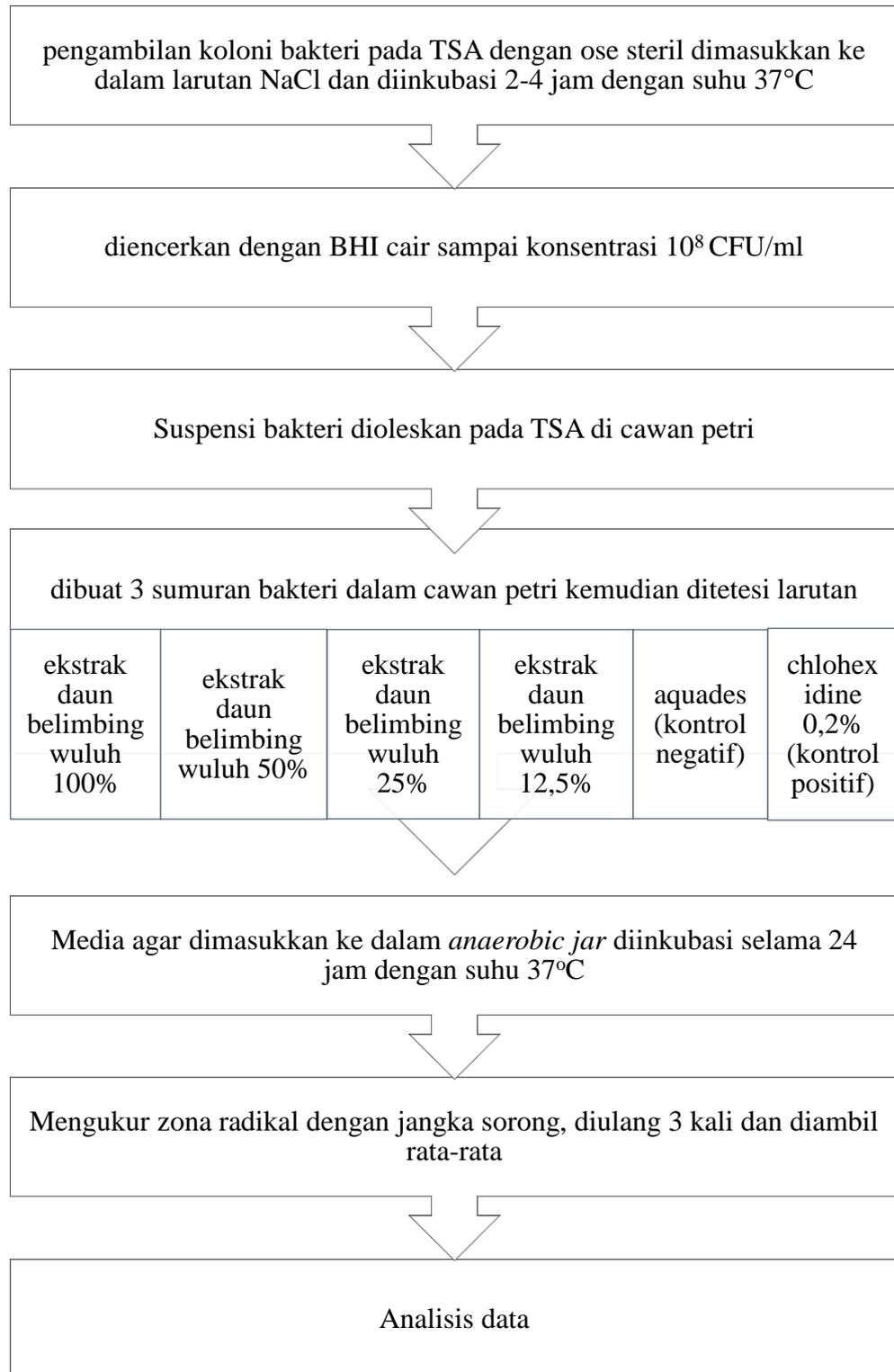
I. Alur Penelitian

- a. Skema kultur bakteri



Gambar 6. Skema kultur bakteri

b. Skema alur penelitian



Gambar 7. Skema alur penelitian