

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni laboratoris dengan desain penelitian pendekatan *post-test only control group design*. Penelitian dilakukan secara *in vitro* menggunakan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) yang diujikan pada populasi bakteri pada penderita gingivitis pengguna alat ortodontik cekat secara *in vitro*.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah Yogyakarta tepatnya di Kabupaten Bantul, dan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) diolah di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit I Universitas Gadjah Mada.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah populasi bakteri pada penderita gingivitis pada pengguna alat ortodontik cekat, khususnya bakteri anaerob 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 cairan sulkus gingiva atau *Gingival Crevicular Fluids* (GCF) pada paper

point dengan menggunakan gunting steril dan dimasukkan langsung ke tabung reaksi yang berisi 3 ml PBS. Sampel harus langsung dikultur agar tidak terkontaminasi.

3. Besar Sampel

Jumlah dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus federer. Kelompok perlakuan adalah ekstrak buah belimbing wuluh 100%, 50%, 25%, 12,5%, aquades sebagai kontrol negatif dan klorhexidin 0,2% sebagai kontrol positif.

Rumus federer yang digunakan adalah :

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

t= jumlah kelompok perlakuan

n= jumlah ulang tiap perlakuan

diketahui : t=2

ditanya : n =?

Jawab :

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

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

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

$$n-1 \geq 15$$

$$n \geq 16$$

n : banyaknya pengulangan

t : banyaknya perlakuan

Berdasarkan perhitungan diatas, maka diperoleh $n=4$ dan $t=6$ maka banyaknya pengulangan adalah 4 kali kemudian dari hasil tersebut ditambah dengan *drop out* 10% sehingga jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan yang diperlukan adalah 5 kali pengulangan (Tanjong, 2011).

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) Unit I Universitas Gadjah Mada

2. Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober 2016 - Februari 2017.

D. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

1. Kriteria inklusi

- 1) Pasien bersedia menjadi subyek penelitian
- 2) Pasien mengisi Informed Consent
- 3) Pasien penderita gingivitis
- 4) Pasien menggunakan alat ortodontik cekat selama lebih dari 6 bulan
- 5) Usia pasien 17-24 tahun

2. Kriteria eksklusi

- a) Sedang mengkonsumsi antibiotik
- b) Memiliki penyakit sistemik
- c) Merokok

E. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, serta akuades sebagai kontrol negatif dan klorhexidin 0,2% sebagai kontrol positif.

2. Variabel Terpengaruh

Biakan populasi bakteri anaerob isolat penderita gingivitis pengguna alat ortodontik cekat.

3. Variabel terkontrol

- 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 (*Tryptone Soya Agar*)
- 5) Sterilisasi alat

4. Variabel tidak terkontrol

Kontaminasi organisme lain seperti jamur dan virus.

F. Definisi Operasional Penelitian

1. Daya hambat adalah kemampuan suatu zat untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Gambaran pertumbuhan bakteri media padat dan terjadinya kekeruhan pada media cair.
2. Ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) adalah sediaan zat aktif dalam bentuk serbuk dari buah belimbing wuluh dengan menggunakan larutan etanol. Konsentrasi ekstrak yang diperoleh dari buah belimbing wuluh adalah 100%, 50%, 25%, dan 12,5%.
3. Populasi bakteri anaerob
Sejumlah bakteri anaerob yang menyebabkan gingivitis. Bakteri anaerob yang diperoleh dari cairan sulkus gingiva (GCF) menggunakan 2 paper point pada penderita gingivitis pengguna alat ortodontik cekat.
4. Gingivitis adalah peradangan atau inflamasi pada gingiva karena beberapa faktor, diantaranya adalah plak, hormon, medikasi, trauma, dan lain-lain. Akumulasi plak adalah salah satu penyebab gingivitis karena kurangnya kontrol kebersihan gigi dan mulut contohnya pada pengguna alat ortodontik cekat, gigi tiruan lengkap atau sebagian, dan lain-lain,
5. Pasien pengguna alat ortodontik cekat adalah pasien yang menggunakan alat ortodontik dengan komponen yang lebih kompleks dibandingkan dengan alat ortodontik lepasan, serta alat tersebut tidak bisa dilepaskan oleh pasien tersebut melainkan oleh dokter gigi.

G. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Alat untuk ekstrak
- b. Ose steril
- c. Kapas lidi
- d. *Paper Point*
- e. Cawan petri
- f. Pipet dan mikropet
- g. Sliding caliper
- h. Timbangan
- i. Inkubator
- j. Tabung reaksi
- k. Rak tabung reaksi
- l. *Anaerobic Jar*
- m. Oven
- n. Spiritus
- o. Korek api
- p. Masker
- q. *Handscoon*

2. Bahan penelitian

- a. Biakan populasi bakteri anaerob penyebab gingivitis di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY

- b. Ekstrak buah belimbing wuluh konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5%
- c. Klorhexidin 0,2%
- d. Akuades steril
- e. Media Agar TSA
- f. Larutan media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) sebagai media penyubur bakteri
- g. NaCl 0,9%
- h. *Phosphat Buffer Saline* (PBS)

H. Jalannya penelitian

1. Tahap persiapan penelitian

- a. Persiapan subyek penelitian
 - 1) Mengurus surat ijin penelitian
 - 2) Mengurus *ethical clearence*
 - 3) Memilih subyek penderita gingivitis 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 buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

Pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit I Universitas Gadjah Mada (UGM). Pembuatan ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) dengan cara maserasi. Sebelum dimaserasi, buah belimbing wuluh dicuci bersih. Buah 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 buah 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. Ekstrak buah belimbing wuluh murni diencerkan dengan menggunakan aquades steril sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan, yaitu 12,5%, 25%, 50% 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 buah belimbing wuluh (%)

V_1 : Volume awal ekstrak buah belimbing wuluh (ml)

M_2 : Konsentrasi akhir ekstrak buah belimbing wuluh (%)

V_2 : Volume akhir ekstrak buah belimbing wuluh (ml)

(Kartikasari *et al.*,2012)

3. Pengisolasian bakteri

a. Pengambilan bakteri anaerob dan kultur bakteri

Sampel populasi bakteri gingivitis diperoleh melalui isolasi dari cairan sulkus gingiva (GCF) penderita gingivitis dari pengguna alat ortodontik cekat yang lebih dari 6 bulan. Sampel bakteri diambil dengan cara memasukkan 2 paper point ke dalam sulkus gingiva. Kemudian, paper point dipotong menggunakan gunting steril. Setelah itu, dimasukkan ke tabung berisi 3 ml PBS dengan konsentrasi 7,4. Sampel dalam PBS digetarkan menggunakan centrifuge dengan kecepatan 10.000 rpm selama 30 detik. Setelah itu, 1 ml sampel diencerkan dengan 9 ml larutan aquadest dan dibuat 5 kali pengenceran. Larutan sampel yang telah diencerkan diambil sebanyak 1 ml 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 1 ml, 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.

c. Staining bakteri uji

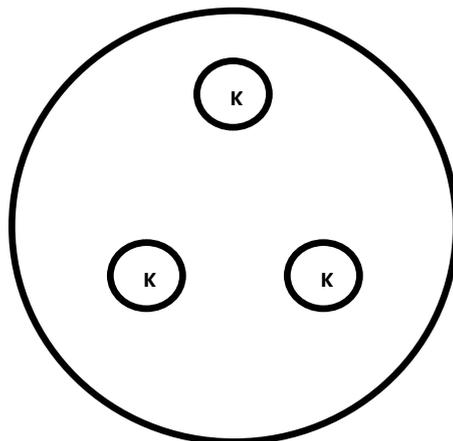
Larutan sampel yang telah diencerkan diambil sebanyak 1 ml ditanam dalam media TSA dan 5 % *sheep blood*. Penyebaran dengan teknik *streaking* dilakukan dengan menggunakan kawat ose pada petridish dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi. Koloni yang telah di ambil, dicampur dengan larutan diatas *object glass* dengan gerakan memutar dan melebar. Setelah itu dikeringkan dengan mengangin-anginkan dan difiksasi dengan melewati di atas api bunsen. Tahap selanjutnya yakni pewarnaan Gram. Preparat ditetesi pewarna Gram A (kristal violet) selama 30-60 detik kemudian dicuci dengan air mengalir, selanjutnya preparat diberi pewarnaan gram B (larutan iodin) selama 60 detik kemudian dicuci dengan air mengalir, preparat diberi pewarnaan Gram C (alkohol 96 %) selama 2 detik kemudian dibilas dengan air mengalir, selanjutnya preparat ditetesi pewarnaan Gram D (safranin) selama 30 detik dan dibilas dengan air mengalir. Preparat tersebut dikeringkan dan ditutup dengan *deck glass*. Tahap identifikasi bentuk sel bakteri dilakukan menggunakan mikroskop binokuler dengan pembesaran 1000x. Kemudian secara sistematis dilihat bakteri anaerob baik Gram-positif maupun Gram-negatif. Identifikasi didasarkan terhadap bentuk sel bakteri yang terlihat (Widodo S. A., 2014).

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 dalam 1 cawan petri, dengan masing-masing berdiameter 5 mm dan kedalaman 3 mm. Seluruh lubang diisi dengan konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) 100%, 50%, 25%, dan 12,5%, serta akuades sebagai kontrol negatif dan klorhexidin 0,2% sebagai kontrol positif. Pindahkan bakteri dari suatu tempat ke tempat lainnya harus dilakukan didekat spritus agar meminimalkan terjadinya kontaminasi bakteri lain (Kartikasari *et al.*, 2012).

Gambar 5 Sumuran Cawan Petri



K adalah koloni bakteri penyebab gingivitis.

Langkah pengulangan sebanyak 5 kali dengan 3 sumuran setiap 1 cawan petri. Setelah semua cawan petri sudah ditetesi ekstrak,

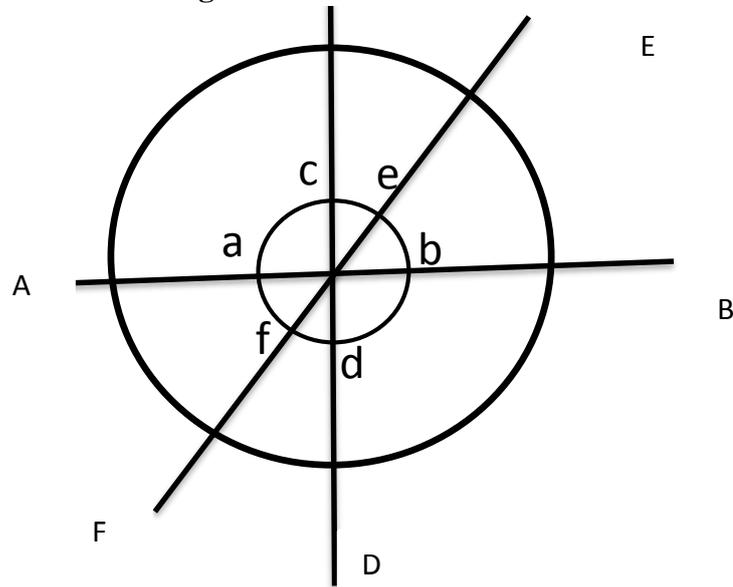
kemudian inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam dalam *anaerobic jar*.

b. Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,01 mm. Setiap sumuran dalam cawan petri dilakukan pengulangan pengukuran diameter sumuran sebanyak tiga kali guna mendapatkan hasil pengukuran yang reliabel.

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. Data pengukuran pertama, kedua dan ketiga diambil nilai rata-ratanya, maka akan diperoleh data zona radikal (Kartikasari *et al.*, 2012)

Gambar 6 Pengukuran Zona Radikal



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

A,b,c,d,e,f : Titik dalam zona radikal

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

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

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

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

I. Analisis Data

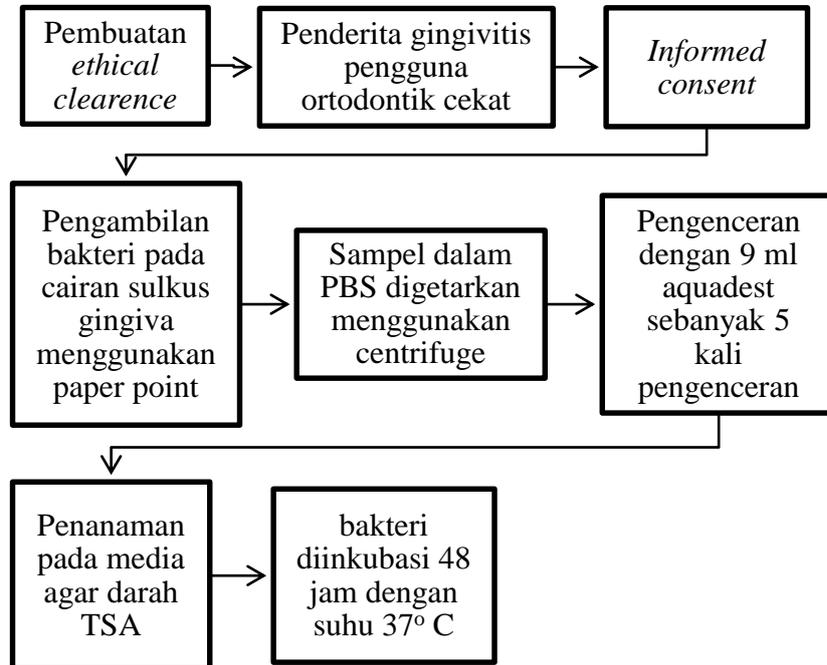
1. Jenis data : data primer
2. Pengolahan : spss versi 15.0
3. Analisis data :

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*
Uji LSD (*Least Significance Diference*)

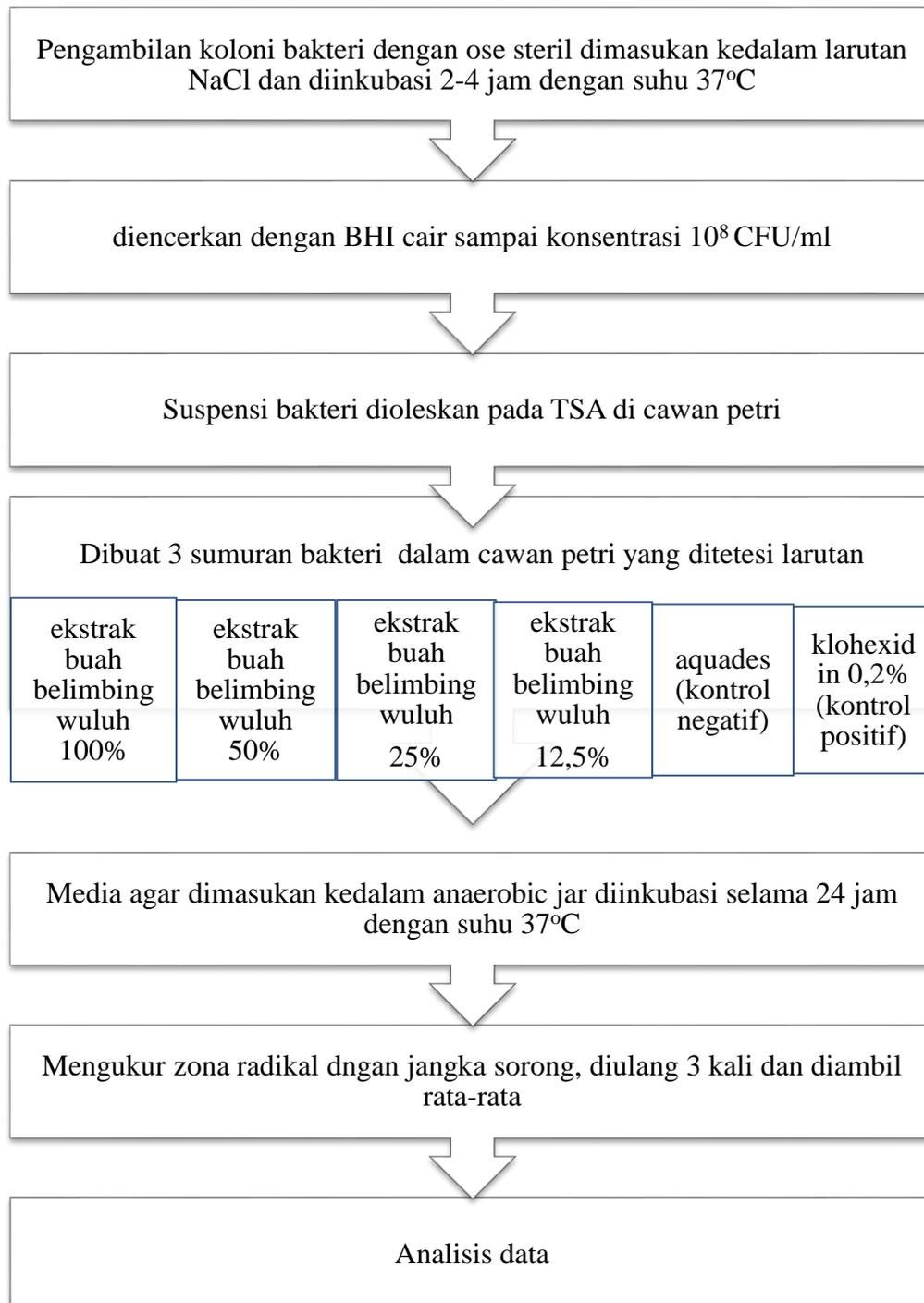
J. Alur penelitian

1. Skema kultur bakteri



Gambar 7 Skema kultur bakteri

2. Skema alur penelitian



Gambar 8 Skema Alur Penelitian