

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan melakukan tindakan terhadap subyek penelitian dan selanjutnya mempelajari dengan menganalisis efek yang timbul dari tindakan yang dilakukan terhadap subyek.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

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

2. Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada 13 Oktober 2014

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* dengan pembiakan murni yang dibiakan oleh Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Estimasi Besar Sampel

1. Penggolongan Sample Penelitian

Sampel penelitian dikelompokkan dalam 1 kelompok konsentrasi larutan dan 1 kelompok kontrol positif

- a. Kelompok I : direndam dalam ekstrak daun teh hijau 100%,
- b. Kelompok II : direndam dalam *Chlorhexidine gluconate* 0,2% (kontrol positif).
- c. Kelompok III : direndam dalam aquades steril (kontrol negatif).

2. Jumlah Sampel Penelitian

Jumlah sampel minimal ini diestimasi berdasarkan rumus Daniel (1991) sebagai berikut :

$$n \geq \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

Keterangan :

n = jumlah sampel

Z = nilai Z pada kesalahan tertentu $\alpha = 0,05$ maka nilai Z = 1,96.

σ = standart deviasi sampel

d = kesalahan yang masih dapat ditoleransi.

Asumsi bahwa kesalahan yang masih dapat diterima (d) sama besar dengan (σ), maka :

$$n \geq \frac{Z^2 \cdot \sigma^2}{d^2}$$

$$\sigma^2 = d^2$$

$$n \geq Z^2$$

$$n \geq (1,96)^2$$

$$n \geq 3,84$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan jumlah hitungan di atas maka jumlah sampel minimal yang di perlukan adalah 4 sediaan untuk setiap perlakuan. Pada penelitian ini menggunakan 5 sampel dengan total seluruh sampel yang di gunakan adalah 15 sampel.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

- a. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 100%
- b. Larutan *Chlorhexidine gluconate* 0,2% dan aquades steril

2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada resin akrilik

3. Variabel Terkendali

- a. Jenis resin akrilik : resin akrilik *heat cured*
- b. Diameter cakram resin akrilik : 10 mm dengan ketebalan 2 mm
- c. Jumlah bahan resin akrilik : 15 buah
- d. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam suspensi *Candida albicans* 24 jam 37°C
- e. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak daun teh hijau 8 jam pada suhu kamar
- f. Lama pengeraman cawan petri dalam inkubator 24 jam pada suhu 37°C.
- g. Suhu autoclave 121° C

4. Variabel Tak Terkendali

- a. Kontaminasi bakteri dan jamur lain

- b. Keporusan resin akrilik
- c. Jumlah perlekatan *Candida albicans* pada resin akrilik
- d. Penyebaran suspensi jamur
- e. Usia tanaman

F. Definisi Operasional

1. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) adalah ekstrak yang dibuat dari daun teh hijau (*Camellia sinensis*) hasil maserasi dengan etanol 70% .
2. *Chlorhexidine gluconate 0,2%* adalah suatu bahan yang memiliki daya antibakteri dengan spektrum yang luas dan sangat efektif untuk bakteri Gram (+), Gram (-), bakteri ragi, jamur serta protozoa, algae dan virus.
3. *Candida albicans* adalah spesies jamur yang secara normal terdapat pada permukaan rongga mulut manusia.
4. Plat dasar gigi tiruan resin akrilik *heat cured* dalam bentuk cakram dibuat dengan ukuran diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat-alat Penelitian :
 - a. Becker glass untuk tempat perendaman cakram resin akrilik di dalam saliva buatan
 - b. Tabung reaksi untuk perendaman cakram resin akrilik ke dalam suspensi *Candida albicans* dan untuk perendaman cakram resin akrilik ke dalam ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 100%

- c. Glass ukur dan spuit injeksi untuk mengukur ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*)
 - d. Pipet
 - e. Pinset steril untuk memindahkan cakram resin akrilik
 - f. Lampu spritus untuk mensterilkan ose
 - g. Ose digunakan untuk mengambil koloni *Candida albicans*
 - h. Inkubator untuk menginkubasi *Candida albicans* selama 24 jam pada suhu 37°C.
 - i. Press dan cuvet untuk membuat cakram resin akrilik
 - j. Arkansas untuk menghaluskan cakram resin akrilik
 - k. Vortex mixer untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada cakram resin akrilik
 - l. Colony counter untuk menghitung koloni *Candida albicans*
 - m. Cawan petri dengan diameter 10 cm untuk tempat pembiakan *Candida albicans*
 - n. Kapas lidi steril
 - o. Stelon pot
 - p. *eppendorf micropipette*
 - q. *Rubber bowl*
 - r. *Spatula*
2. Bahan Penelitian :
- a. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) dengan konsentrasi 100%
 - b. Larutan *Chlorhexidine gluconate* 0,2%

- c. Etanol 70% untuk bahan pelarut
- d. Sediaan jamur *Candida albicans* 10⁸ CFU/ml
- e. Cakram resin akrilik *heat cured* dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm
- f. *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) adalah media selektif untuk pertumbuhan jamur
- g. Media *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai media pembiakan *Candida albicans*
- h. Alkohol 70% untuk sterilisasi cakram resin akrilik
- i. Malam model
- j. Gips
- k. Vaseline
- l. Saliva buatan sebagai bahan perlekatan *Candida albicans*
- m. *Phosphat Buffer Saline* (PBS)
- n. *Could Mould Seal* (CMS)
- o. Aqua steril

H. Cara Penelitian

1. Tahap persiapan penelitian
 - a. Persiapan pembuatan lempeng resin akrilik
 - 1) Membuat lempeng dari malam merah berbentuk cakram dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm sejumlah 15 cakram dengan menggunakan cetakan malam. Cakram malam merah ini digunakan untuk membuat sampel lempeng resin akrilik yang tidak dipulas.

2) Pembuatan *mould space*

- a) Membuat adonan gips dengan perbandingan 75 ml air : 250 gram gips dan diaduk dalam mangkok karet dan spatula dengan tangan selama 60 detik.
- b) Adonan dimasukkan ke dalam kuvet bawah yang telah disiapkan kemudian di vibrasi
- c) Lempong malam merah diletakkan pada adonan dan didiamkan selama 15 menit.
- d) Permukaan gips pada kuvet bawah, diulasi dengan vaseline dan kuvet atas dipasang, yang selanjutnya diberi adonan gips (dilakukan sambil divibrasi)
- e) Setelah gips mengeras, kuvet dibuka dan cetakan diambil atau malam dituangi air panas sampai bersih
- f) Setelah bersih, maka didapatkan *mould space* dari cetakan malam merah

3) Pengisian resin akrilik *heat cured* pada *mould space*

- a) Bahan resin akrilik *heat cured* diaduk dalam stellon potdeng dengan menggunakan perbandingan 6 gram : 3 ml pada suhu kamar (28°C). Setelah 4 menit maka adonan akan mencapai *dough stage*
- b) Adonan dimasukkan ke dalam cetakan (*mould space*) yang bagian permukaannya telah diulasi *cold mould seal* (CMS)
- c) Selanjutnya kuvet atas dipasang dan dilakukan pengepresan

d) Pemasakan

Selanjutnya kuvet yang telah diisi dengan resin akrilik dimasukkan dalam panci aluminium yang telah berisi air 15 liter air mendidih (100°C) selama 20 menit

e) Penyelesaian

Cakram resin akrilik dikeluarkan dari kuvet, sehingga diperoleh ukuran cakram resin akrilik diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm dan pada bagian tepi digosok dengan kertas gosok

b. Persiapan teh hijau

- 1) Daun teh yang sudah panen dipisahkan dengan akarnya kemudian dicuci dengan menggunakan air bersih.
- 2) Daun teh yang sudah bersih dikeringkan di almari pengering dengan suhu 45°C hingga kering. Kemudian dihaluskan dengan menggunakan alat penyerbuk hingga terbentuk serbuk teh hijau.
- 3) Serbuk tersebut direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak lima kali lipat berat bahan dan diaduk selama 30 menit lalu diamkan selama 24 jam.
- 4) Saring dan pisahkan filtrat dari bagian yang tidak larut (ampas) dan diulang sebanyak dua kali.
- 5) Filtrat dipekatkan dengan menggunakan vacuum rotary *evaporator* suhu pemanas 70°C dengan pendingin air.

6) Filtrat kental dituang ke dalam cawan porselin dipekatkan dengan menggunakan pemanas *water bath* sambil terus diaduk dengan suhu pemanas 50-70°C.

c. Menyiapkan koloni *Candida albicans*

Candida albicans diambil menggunakan ose steril kemudian ditanam ke dalam *Sabouraud' dextrose agar*, inkubasi selama 24 jam, dengan suhu 37°C. Suspensi *Candida albicans* disesuaikan dengan standar larutan *Mc Farland*. Suspensi ini yang dipakai untuk kontaminasi pada plat resin akrilik.

d. Larutan *Chlorhexidine gluconate* 0,2%

Larutan *Chlorhexidine gluconate* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan sediaan jadi yang tersedia di toko bahan kedokteran gigi dengan konsentrasi 0,2%.

2. Tahap pelaksanaan penelitian

- a. Cakram resin akrilik dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm yang berjumlah 15 buah direndam di dalam aquadest steril selama 48 jam untuk mengurangi sisa monomer
- b. Sterilisasi lempeng resin akrilik menggunakan *autoclave* 121°C selama 18 menit
- c. Cakram resin akrilik direndam dalam saliva steril selama 1 jam untuk memudahkan perlekatan *Candida albicans* pada cakram resin akrilik, kemudian dibilas dengan PBS 2 kali

- d. Cakram resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi *C.albicans*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C
- e. Cakram resin akrilik kemudian diambil dengan pinset dan dipindahkan ke dalam ekstrak daun teh hijau (*Camellia Sinensis*) dan diberi nomer 1-15. Cakram resin akrilik nomor 1-5 di rendam ke dalam ekstrak daun teh hijau dengan konsentrasi 100% selama 8 jam, cakram resin akrilik nomer 6-10 di rendam dalam *chlorexidine gluconate* 0,2% selama 8 jam, dan cakram resin akrilik 11-15 direndam dalam aquades steril selama 8 jam
- f. Cakram resin akrilik 1 – 15 diambil dan dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi berisi aquades 10ml, kemudian masing-masing dikocok dengan *vortex mixer* selama 1 menit dan masing-masing tabung reaksi dilakukan pengenceran seri sampai 10⁻³ dengan cara :
- 1) Pengenceran P1 (10-1) diperoleh dengan memasukkan 1 ml larutan dari tabung ni 1 ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.
 - 2) Pengenceran P2 (10-2) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P1 ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.
 - 3) Pengenceran P3 (10-3) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P2 ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.
 - 4) Ambil 0,01 ml larutan dari pengenceran P3, kemudian ditetaskan pada cawan petri agar MHA dan dieramkan dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37o C.

5) Hal yang sama dilakukan pada tabung reaksi no 2-15.

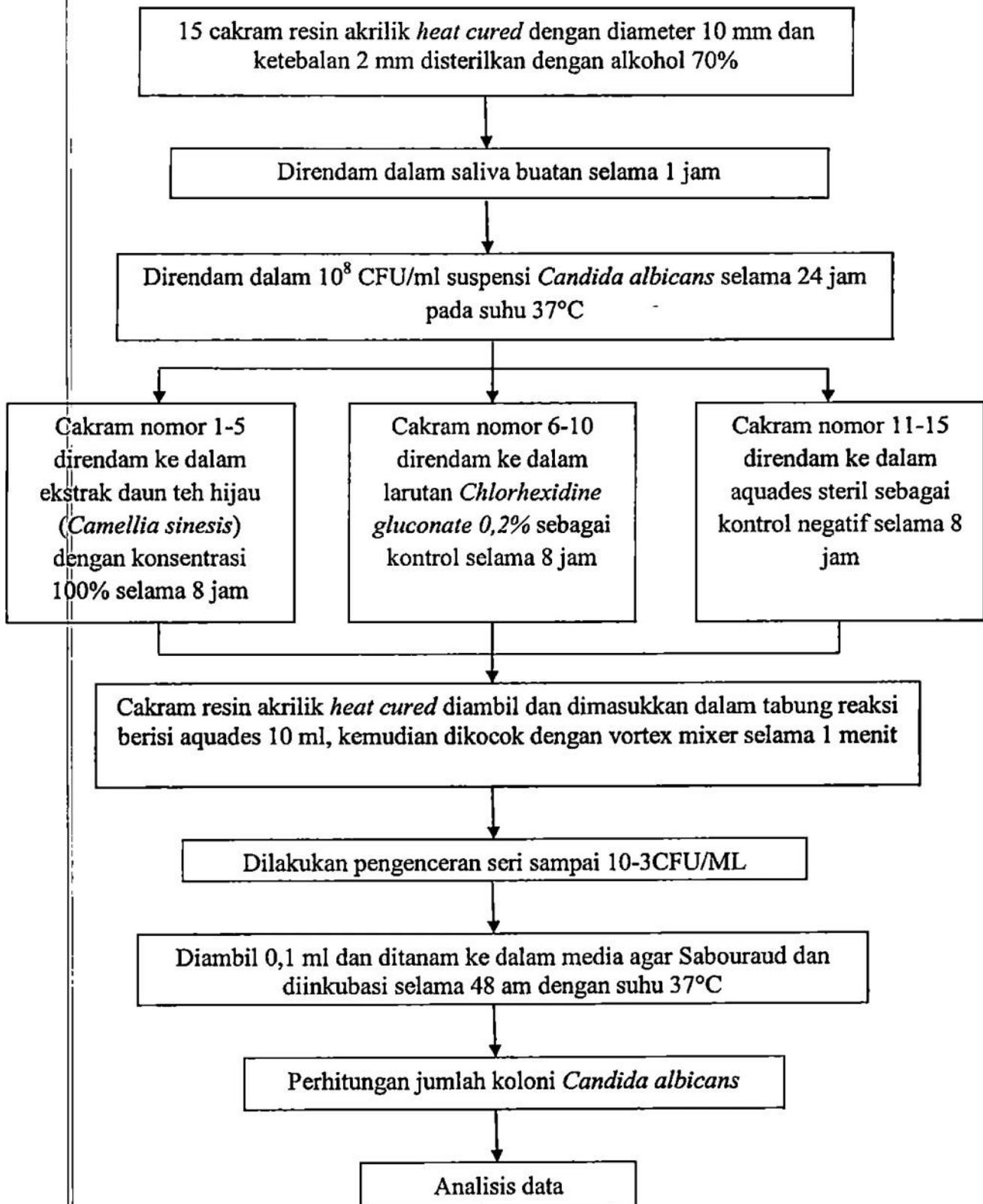
- g. Perhitungkan jumlah koloni *Candida albicans* menggunakan cuonter pada ekstrak daun teh hijau 100%, *chlorhexidine gluconate* 0,2% dan aquades steril dilakukan setelah diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37o C. Jumlah koloni *Candida albicans* yang diperoleh, digunakan untuk menghitung angka jamur masing-masing sampel dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{Angka jamur} = \frac{\text{jumlah koloni} \times \text{Faktor pengencer}}{\text{Volume larutan yang dihitung}}$$

I. Analisis Data

Dalam penelitian ini, data yang didapatkan dianalisa dengan menggunakan Shapiro wilk untuk menentukan apakah data berdistribusi normal kemudian dilanjutkan dengan uji levene untuk mengetahui apakah data pada masing-masing kelompok sampel homogen. Apabila data berdistribusi normal dan homogen maka dilakukan uji statistik menggunakan *one way anova* untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun teh hijau pada perendaman plat resin akrilik terhadap jumlah *C. albicans*, maka digunakan uji statistik analisa varians satu arah dengan signifikasi 0,05%. Selanjutnya dilakukan uji Least significance Difference (LSD) dengan taraf kemaknaan 95% ($\alpha = 0,05$) untuk menentukan pengaruh ekstrak daun teh hijau terhadap jumlah *C. albicans*.

J. Alur Penelitian



Gambar 3. Skema Alur Penelitian