

BAB III METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris secara *in vitro*, yaitu mengetahui adanya daya anti-jamur pada ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*.

B. Tempat dan Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan Mei tahun 2018.

C. Sampel

1. Definisi Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah plat resin akrilik berukuran 10x10x1 mm yang telah diinkubasi dengan *Candida albicans*.

2. Jumlah Sampel

Untuk menentukan jumlah sampel minimal tiap perlakuan dalam penelitian ini, digunakan rumus sebagai berikut (Hidayat, 2007) :

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

Keterangan :

t = jumlah perlakuan

n = jumlah sampel

Perhitungan :

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 17/2$$

$$n \geq 8,5 \text{ (Dibulatkan)}$$

$$n = 9 \text{ (Ditambah drop-out)}$$

$$n = 9 \times 10\%$$

$$n = 9,9 \text{ (Dibulatkan)}$$

$$n = 10$$

Jadi, jumlah sampel tiap perlakuan adalah 10, sehingga total sampel yang diperlukan dengan 3 jenis perlakuan yaitu 30 plat resin akrilik.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

- a. Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle*) konsentrasi 10%.
- b. Sodium Hipoklorit (NaOCl) konsentrasi 10%.
- c. Akuades steril.

2. Variabel Terpengaruh

- a. Pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik *heat-cure*.

3. Variabel Terkendali

- a. Konsentrasi ekstrak dan larutan yang digunakan.
- b. Teknik pembuatan ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle*).
- c. Media pembiakan *Candida albicans*.
- d. Konsentrasi *Candida albicans* yaitu 1×10^6 CFU/ml.
- e. Lama waktu perendaman pada uji daya anti-jamur.

4. Variabel Tidak Terkendali

- a. Kontaminasi mikroorganisme lainnya.
- b. Suhu ruangan dan larutan yang digunakan.

E. Definisi Operasional

1. Plat Resin Akrilik *Heat-cure* adalah plat berukuran 10x10x1 mm yang dibuat dengan bahan resin akrilik *heat-cure*.
2. *Candida albican* adalah fungi dari golongan *Candida*.
3. Ekstrak Daun Sirih Hijau adalah ekstrak dari daun tanaman *Piper betle* yang dicampur akuades dengan konsentrasi sebesar 10%.
4. Sodium Hipoklorit adalah larutan dengan rumus kimia NaOCl dengan konsentrasi 10%.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

- a. Kertas Selofan digunakan untuk pembuatan plat resin akrilik.
- b. Kertas Gosok digunakan untuk menghaluskan tepi plat resin akrilik.
- c. Tabung Erlenmeyer (Pyrex, Jepang) digunakan sebagai tempat larutan.
- d. Timbangan Digital (Analytical Balance ABJ 80-4NM) digunakan untuk menimbang bahan yang digunakan.
- e. Rak dan Tabung Reaksi digunakan sebagai tempat larutan.
- f. Gelas Ukur (Pyrex, Jepang) digunakan untuk mengukur larutan yang digunakan.
- g. Stopwatch digunakan untuk menghitung waktu.
- h. Stick Pengaduk digunakan untuk mengaduk bahan.
- i. Ose digunakan sebagai tempat biakan mikroorganisme.
- j. Masker digunakan sebagai alat pelindung diri.
- k. Handscoon digunakan sebagai alat pelindung diri.
- l. Press begel digunakan untuk membuat plat resin akrilik.
- m. Kuvet digunakan untuk membuat plat resin akrilik.
- n. Pisau Model digunakan untuk memotong malam merah.
- o. Spatula digunakan untuk mengaduk bahan.
- p. Bowl karet digunakan sebagai tempat untuk mencampur bahan.
- q. Blender digunakan untuk menghaluskan bahan.
- r. Vortex Mixer (VM-300) digunakan untuk mencampur bahan.
- s. Corong Buchner (Pyrex, Jepang) digunakan untuk menyaring larutan.

- t. Rotary Evaporator (RE 1000 HN) untuk menguapkan larutan ekstrak dari larutan etanol.
- u. Oven (Mettler Oven 53L Excelent, Jerman) digunakan sebagai sterilisasi plat resin akrilik.
- v. Spektrofotometer Vis (Genesys 20 Visible) digunakan untuk mengukur optical density.
- w. Inkubator (Mettler, Jerman) digunakan untuk tempat inkubasi mikroorganisme.

2. Bahan

- a. Daun Sirih digunakan sebagai bahan untuk membuat ekstrak daun sirih.
- b. Etanol digunakan sebagai bahan untuk membuat ekstrak daun sirih.
- c. Larutan Sodium Hipoklorit digunakan sebagai larutan kontrol positif.
- d. *Brain Heart Infusion* (BHI) digunakan sebagai tempat biakan mikroorganisme.
- e. *Cold Mould Seal* (CMS) digunakan sebagai pelapis.
- f. Vaseline digunakan sebagai pelapis.
- g. Resin Akrilik *Heat-cure* digunakan sebagai bahan untuk membuat plat resin akrilik.
- h. Saliva buatan steril digunakan sebagai bahan untuk membantu pertumbuhan *Candida albicans* pada plat resin akrilik.
- i. Akuades steril digunakan sebagai larutan kontrol negatif.
- j. Malam merah digunakan sebagai bahan untuk membuat plat resin akrilik.

- k. Gips Putih digunakan sebagai bahan untuk membuat plat resin akrilik.
- l. Larutan Asam Asetat digunakan sebagai larutan untuk melepaskan larutan pewarna pada mikroorganisme.
- m. Larutan Pewarna Kristal Violet digunakan sebagai larutan pewarna untuk *Candida albicans*.

G. Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak Daun Sirih

Daun sirih segar dicuci bersih kemudian ditiriskan, lalu daun sirih diiris kecil-kecil dan ditimbang seberat 250 mg. Daun sirih kemudian dikeringkan dengan cara menjemur daun sirih di dalam ruang yang tidak terpapar matahari secara langsung. Apabila daun sudah kering, daun kemudian dihaluskan/diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk yang diperoleh ditimbang seberat 100 gram kemudian dimaserasi dengan etanol 96 % sebanyak 1,5 liter sampai seluruh bagian terendam. Ekstrak kemudian disaring dengan corong Buchner dan hasil saringan yang didapat adalah ekstrak cair. Ekstrak cair tersebut kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol dengan menggunakan vakum evaporator (Rotary evaporator) pada suhu 40° C selama 3 jam hingga ekstrak menjadi kental. Kemudian ekstrak disterilkan dalam autoklav pada suhu 121° C selama 15 menit dan diperoleh 25 ml ekstrak dan hasil tersebut menunjukkan 100% ekstrak daun sirih dalam air. Dilakukan pengenceran dengan menggunakan pelarut akuades steril hingga mendapat konsentrasi sebesar 10%.

2. Pembuatan Plat Resin Akrilik *Heat-cure*

Membuat plat dari malam merah berukuran (10 x 10 x 1) mm sejumlah 30 plat dengan menggunakan cetakan malam. plat malam merah ini digunakan untuk membuat sampel plat resin akrilik yang tidak dipulas. Kemudian dilakukan pembuatan mould space dengan menggunakan kuvet dan gips putih. Lakukan pengisian resin akrilik heat cured pada mould space. 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. Plat resin akrilik dikeluarkan dari kuvet, sehingga diperoleh ukuran plat resin akrilik (10 x 10 x 1) mm dan pada bagian tepi digosok dengan kertas gosok.



Gambar 1. Pembuatan Resin Akrilik *Heat-cure*

3. Pembuatan Suspensi *Candida albicans*

Diambil 1 ose *Candida albicans* dan dimasukkan pada media BHI 5 ml, inkubasi selama 48 jam pada 38°C. Suspensi *Candida albicans* yang dipergunakan, dibuat dengan cara menyesuaikan kekeruhan menurut larutan

standard Mc. Farland no. 1 (3×10^8 CFU/ml) dilakukan dengan cara dari suspensi yang telah disesuaikan dengan larutan standard Mc. Farland no. 1 diambil 1 ml ditambahkan 2 ml *Saboraud's broth* sehingga didapatkan konsentrasi 1×10^8 CFU/ml, kemudian dari suspensi ini diencerkan 1/100, sehingga didapatkan konsentrasi akhir 1×10^6 CFU/ml.

4. Inkubasi *Candida albicans* pada Plat Resin Akrilik *Heat-cure*

Plat resin akrilik (10 x 10 x 1) mm direndam di dalam aquadest steril selama 48 jam untuk mengurangi sisa monomer. Sterilisasi plat resin akrilik menggunakan oven pada suhu 170° C selama 30 menit . Kemudian plat resin akrilik direndam dalam saliva steril selama 1 jam. Setelah direndam, plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi suspensi *Candida albicans*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C.

5. Uji Daya Anti-jamur

10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang masing – masing berisi 5 ml ekstrak daun sirih dengan konsentrasi 10%. Pada kelompok kontrol (+), 10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml larutan Sodium Hipoklorit dengan konsentrasi 10%, dan pada kelompok kontrol (-), 10 plat resin akrilik dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml akudes steril. Lama perendaman yang dipergunakan adalah 3 menit.



Gambar 2. Perendaman Plat Resin Akrilik pada Larutan Uji Coba

6. Perhitungan Pertumbuhan *Candida albicans* pada Plat Resin Akrilik

Plat resin akrilik, yang telah diberikan perlakuan, dibilas dengan 1 ml akuades untuk menghilangkan *Candida albicans* yang sudah mati atau yang tidak lagi menempel pada plat resin akrilik. *Candida albicans* pada plat resin akrilik diwarnai dengan 1 ml larutan Kristal Violet dengan konsentrasi 1% dan didiamkan selama 5 menit. Larutan Kristal Violet yang tidak diserap dibilas dari plat resin akrilik dengan cara direndam di akuades kemudian dikeringkan. Kristal Violet yang diikat oleh *Candida albicans* yang masih hidup dan menempel di plat resin akrilik dilepaskan dari *Candida albicans* dengan 5 ml larutan Asam Asetat konsentrasi 33%. Larutan hasil pelepasan Kristal Violet dari *Candida albicans* diukur menggunakan Spektrophotometer Vis dan diatur pada panjang gelombang 570 nm.



Gambar 3. Pelepasan Larutan Pewarna pada Plat Resin Akrilik

H. Analisis Data

Data dari hasil penelitian ini didapat dari hasil pengukuran tingkat absorbansi dari larutan kristal violet yang terserap oleh *Candida albicans* pada setiap perlakuan. Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode Shapiro-Wilk karena sampel berjumlah kurang dari 50. Uji normalitas ini digunakan untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berdasarkan dari populasi yang terdistribusi normal. Data yang terdistribusi normal memiliki nilai probabilitas $> 0,05$. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui apakah sampel memiliki variasi yang sama. Jika variasi data pada setiap kelompok adalah sama memiliki nilai probabilitas $> 0,05$. Pengujian distribusi data normal dan variasi sama maka dapat dilakuka pengujian berikutnya menggunakan uji analisa parametrik menggunakan *One Way Anova* untuk mengetahui keefektifitasan dari ekstrak daun sirih sama atau tidak secara signifikan dengan tingkat kemaknaan $p < 0,05$. Jika variabel tidak terdistribusi normal dan variasi tidak sama, maka alternatifnya dapat menggunakan uji *Kruskal Wallis*.

Apabila menggunakan uji *One Way Anova* dan *Kruskal Wallis* menghasilkan nilai probabilitas $< 0,05$ dapat dilanjutkan dengan analisa *Post Hock*. Analisa *post hock* digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata diantara ketiga perlakuan tersebut benar benar ada perbedaan nyata atau tidak. Jika analisa data menggunakan *One Way Anova* analisa *post hock* menggunakan *tukey*, dan apabila analisa data menggunakan *Kruskal Wallis* analisa *post hock* menggunakan *mann-whitney*.

I. Alur Penelitian

