

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris. Penelitian laboratoris adalah penelitian yang dilakukan di laboratorium, dan selanjutnya mempelajari dengan menganalisis efek yang timbul dari tindakan yang dilakukan terhadap subyek.

B. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Waktu penelitian :

Penelitian dilakukan pada bulan Juni 2013.

2. Tempat penelitian :

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* dengan pembiakan murni yang dibiakkan oleh Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta. Daya anti jamur diketahui dengan menghitung

jumlah koloni *Candida albicans* pada masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.).

D. Estimasi Besar Sampel

Pengujian terdiri dari ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi 15%, 30%, 60%.

Sampel yang digunakan berjumlah 25 buah cakram resin akrilik *heat-curing* dengan diameter 10 mm dan dengan ketebalan 2 mm, dibagi dalam 3 kelompok perlakuan utama sebagai berikut (Wahyuningtyas, 2008) :

1. Kelompok pertama, 5 buah resin akrilik yang dibagi menjadi 3 perlakuan ditempelkan jamur *Candida albicans* direndam ke dalam ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi 15% selama 30 menit.
2. Kelompok kedua, 5 buah resin akrilik yang dibagi menjadi 3 perlakuan ditempelkan jamur *Candida albicans* direndam ke dalam ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi 30% selama 30 menit.
3. Kelompok ketiga, 5 buah resin akrilik yang dibagi menjadi 3 perlakuan ditempelkan jamur *Candida albicans* direndam ke dalam ekstrak kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi 60% selama 30 menit.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) dengan konsentrasi 15%, 30%, dan 60%.

2. Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada plat akrilik.

3. Variabel Terkendali

- a. Jenis resin akrilik : resin akrilik *heat-curing*
- b. Diameter cakram resin akrilik : 10 mm dengan ketebalan 2 mm
- c. Jumlah bahan resin akrilik : 25 buah
- d. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam suspensi *Candida albicans* 24 jam pada suhu 37°C.
- e. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak kulit buah manggis 30 menit.
- f. Lama pengeraman cawan petri dalam inkubator 24 jam pada suhu 37°C.
- g. Rasio powder dan liquid resin akrilik

4. Variabel tak terkendali

- a. Kontaminasi bakteri dan jamur lain.
- b. Keporusan resin akrilik.
- c. Jumlah kepekatan *Candida albicans* pada resin akrilik.
- d. Penyebaran suspensi jamur
- e. Usia tanaman
- f. Working time

- g. Kekasaran permukaan (*roughness*)
- h. Kepadatan resin akrilik
- i. Perbandingan serbuk

F. Definisi operasional

1. Plat resin akrilik *heat-curing* (aktivasi panas) dalam bentuk cakram dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.
2. Saliva buatan merupakan media yang membantu perlekatan *Candida albicans* pada resin akrilik.
3. Suspensi *Candida albicans* 10^8 CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Candida albicans* yang telah diencerkan dengan Aquades steril sehingga mencapai kekeruhan sesuai dengan standar Brown III. Pertumbuhan *Candida albicans* dapat terlihat pada media agar.
4. Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) didapatkan dari hasil maserasi dengan cara mengeringkan kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) kemudian serbuk direndam dalam pelarut.
5. Jumlah koloni *Candida Albicans* adalah banyaknya koloni pada media sabouraud.

G. Alat dan Bahan Penelitian

Alat-alat Penelitian :

1. Becker glass tempat perendaman cakram resin akrilik di dalam saliva buatan.
2. Tabung reaksi untuk perendaman cakram resin akrilik ke dalam suspensi *Candida albicans* dan untuk perendaman cakram resin akrilik ke dalam ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 15%, 30% dan 30%.
3. Glass ukur dan spuit injeksi untuk mengukur ekstrak kulit manggis.
4. Pipet
5. Pinset steril untuk memindahkan cakram resin akrilik
6. Lampu spirtus untuk mensterilkan ose
7. Ose digunakan untuk mengambil koloni *Candida albicans*
8. Inkubator
9. Press dan cuvet untuk membuat cakram resin akrilik
10. Arkansas untuk menghaluskan cakram resin akrilik
11. Vortex mixer untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada resin akrilik
12. Colony counter untuk menghitung koloni *Candida albicans*
13. Cawan petri dengan diameter 10 cm untuk tempat pembiakan *Candida albicans*
14. Kapas lidi steril
15. Stelon pot

Bahan Penelitian :

1. Ekstrak kulit manggis dengan konsentrasi 15%, 30%, dan 60%.
2. Etanol 70% untuk bahan pelarut
3. Sediaan jamur *Candida albicans* 10^8 CFU/ml
4. Cakram resin akrilik *heat curing* dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm
5. Media agar sabouraud
6. Media Brain Health Infusion (BHI) sebagai media pembiakan *Candida albicans*
7. Alkohol 70% untuk sterilisasi cakram akrilik
8. Malam model
9. Gips
10. Vaseline
11. Saliva buatan sebagai bahan perlekatan *Candida albicans*

H. Cara Penelitian

1. Tahap persiapan penelitian
 - 1.1. Pembuatan cakram resin akrilik

Model cetakan dibuat dengan menggunakan malam merah berbentuk cakram dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm. Model tersebut ditanam di dalam kuvet bagian bawah dengan menggunakan gips, 1 kuvet berisi 10 malam merah, ditunggu sampai

mengeras kemudian seluruh permukaan model malam dan gips yang telah mengeras diolesi dengan vaselin. Membuat kontra dengan cara memasang kuvet bagian atas dan diisi dengan gips, dipress dan ditunggu hingga gips mengeras. Kemudian dipanaskan, setelah mendidih diangkat dan dibiarkan sampai cukup dingin, lalu kuvet dibuka. Dilakukan *boiling out* sampai bersih sehingga berbentuk mould untuk kemudian diisi dengan resin akrilik. Polimer dan monomer resin akrilik kering panas dicampur dalam stellon pot. Saat mencapai fase dough masukkan adonan resin akrilik ke dalam cetakan yang sebelumnya diolesi vaselin. Dilakukan initial press selama 5 detik kemudian dipres lagi dan dibiarkan minimal 1 jam. Prosesing resin akrilik dengan pemanasan. Setelah prosesing selesai, kuvet dibiarkan sampai mencapai suhu kamar kemudian kuvet dibuka, plat resin akrilik diambil dan dihilangkan akses-akses dengan *Arkansass stone* bur kemudian dihaluskan dengan ampelas nomor 600 kemudian 1000.

1.2. Persiapan koloni *Candida albicans*

Suspensi *Candida albicans* didapat dari pembiakan yang sudah dilakukan oleh Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Koloni jamur *Candida albicans* hasil biakan di laboratorium diambil dengan menggunakan ose steril, dimasukkan kedalam media Brain Hearth Infusion (BHI) sebagai media penyubur kemudian

diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C sehingga diperoleh suspensi *Candida albicans*. Suspensi *Candida albicans* diencerkan dengan menambahkan akuades steril sehingga mencapai kekeruhan tertentu sesuai dengan standar Brown III yaitu 10^8 CFU/ml.

1.3. Persiapan ekstrak kulit manggis

Kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dipotong-potong dan dikeringkan lalu angin-anginkan pada tempat yang tidak terkena sinar matahari secara langsung kemudian diblender dan disaring dengan penyaring berukuran 0,2 Mesh. Dilanjutkan dengan proses ekstraksi dengan metode maserasi. Sebanyak 0.6 gram, 0.3 gram, dan 0.15 gram serbuk direndam dengan etanol hingga 10 ml selama 4 x 24 jam. Selanjutnya larutan difiltrasi dan diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C. Hasil evaporasi dimasukkan ke dalam wadah steril dan disimpan di dalam desikator silika gel. Ekstrak etanol kulit buah manggis (*Garcinia mangostana*) dibuat dalam konsentrasi 60%, 30%, 15%.

2. Tahap Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode dilusi atau pengenceran seri. Metode dilusi dilakukan dengan cara : cakram resin akrilik dengan diameter 10 mm tebal 2 mm sebanyak 25 buah (nomor 1-25) disterilkan dengan alcohol 70% kemudian diambil dengan pinset steril dan direndam dalam 10 ml suspensi *candida albicans*

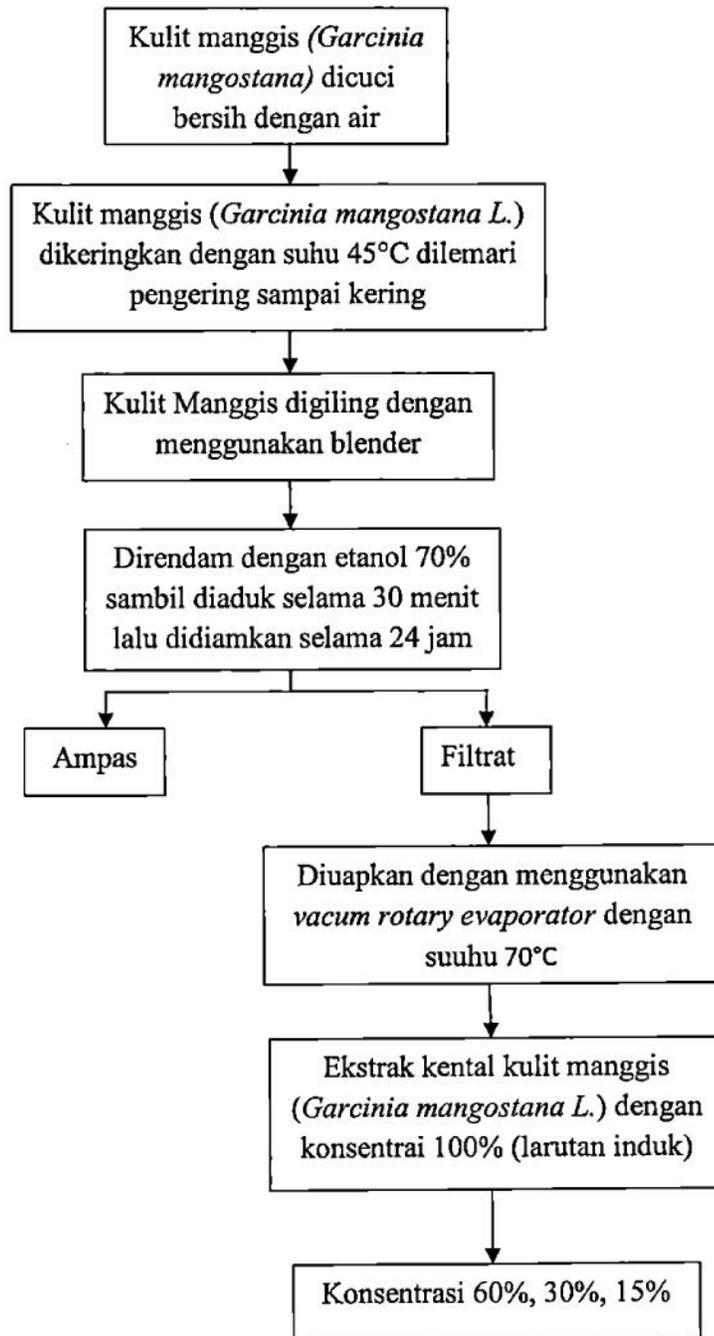
selama 24 jam pada suhu 37°C dalam tabung reaksi. Tujuh puluh lima buah cakram resin akrilik dibagi dalam 5 kelompok. Kelompok I terdiri dari 5 cakram resin akrilik yang digunakan sebagai kontrol menggunakan aquades dengan perlakuan cakram resin akrilik nomor 1-5 dengan waktu 30 menit dan ditempatkan dalam tabung nomor 1-5. Kelompok II kontrol positif menggunakan klorhexidine 0,2% dengan perlakuan yang sama, cakram resin akrilik nomor 6-10 dengan waktu 30 menit, dan ditempatkan dalam tabung nomor 6-10. Kelompok III – V direndam selama 30 menit ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi yang berbeda pada suhu kamar. Kelompok III terdiri dari cakram resin akrilik nomor 11-15 dalam konsentrasi 15%, dan masing cakram resin akrilik ditempatkan dalam tabung nomor 11-15. Kelompok IV terdiri dari cakram resin akrilik nomor 16-20 dalam konsentrasi 30% dan masing cakram resin akrilik ditempatkan dalam tabung nomor 16-20. Kelompok V terdiri dari cakram resin akrilik nomor 21-25 dalam konsentrasi 60% dan masing - masing cakram resin akrilik ditempatkan dalam tabung nomor 21-25. Cakram resin akrilik 1-25 diambil dan dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi berisi aquades steril 10 ml, 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 cara memasukkan 1 ml larutan dari tabung nomor 1 ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.
2. Pengenceran P2 (10^{-2}) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P1 kedalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.

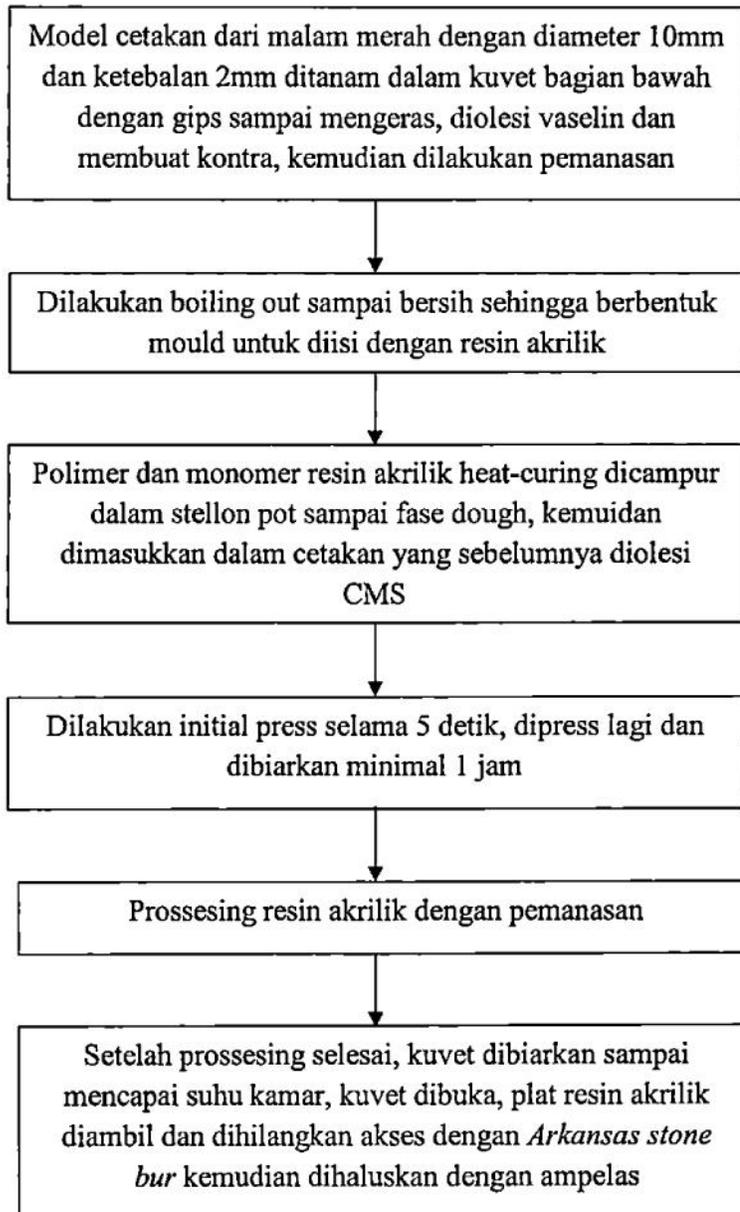
3. Pengenceran P3 (10^{-3}) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P2 kedalam tabung reaksi berisi 9 ml akuades steril.
4. Ambil 0,01 ml larutan tes dari pengenceran P3, kemudian diteteskan pada 1 cawan petri agar sabouraud dan dieramkan dalam incubator selama 48 jam pada suhu 37°C .
5. Hal yang sama dilakukan pada tabung reaksi nomor 2-25.
6. Perhitungan jumlah koloni candida albicans pada masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis dan larutan control dilakukan setelah diinkubasikan selama 48 jam dengan suhu 37°C .

3. Analisi data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan anova satu jalur dilanjutkan dengan uji LSD.

Skema Pembuatan Ekstrak Kulit buah manggis

Skema Pembuatan Resin Akrilik *Heat Curing*



Skema Tahap Penelitian

