

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental murni laboratoris.

B. Sampel penelitian

1. Bahan uji

Larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%, *chlorhexidine* 0,2%, serta aquades steril sebagai kontrol negatif. Tiap kelompok perlakuan minimal adalah 6 kali pengulangan. Sehingga besar sampel dalam penelitian ini sebanyak 18 sampel, yang terbagi menjadi 3 kelompok perlakuan.

2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

a. Bakteri yang akan diujikan dalam penelitian ini adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diperoleh dari biakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada.

b. Pelaksanaan uji larutan bahan irigasi *chlorhexidine* 0.2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Desember 2017 hingga Februari 2018.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

a. Bahan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%.

b. Bahan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2%.

c. Aquades steril.

2. Variabel Terpengaruh

Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

3. Variable Terkendali

a. Larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasikan dengan *hydrogen peroxide* 3%.

b. Larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2%.

c. Media pembiakan bakteri.

d. Suspensi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

e. Suhu inkubator inokulasi bakteri 37° C.

- f. Cara pengolesan bakteri pada media kultur *blood Agar* .
- g. Diameter sumuran yaitu 6 mm.
- h. Media *Tryptose Phospate Broth*.
- i. Lama waktu inkubasi 24 jam.

E. Definisi Operasional

1. Bahan irigasi : larutan yang berisi antibakteri.
2. Larutan irigasi yang digunakan adalah *Chlorhexidine 0,2%* dan *Hydrogen peroxide 3%*.
3. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang diperoleh dari biakan yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Gadjah Mada dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml.
4. Media yang digunakan adalah *Blood Agar*.
5. Kontrol negatif menggunakan aquades.
6. Pengukuran zona radikal dengan menggunakan *sliding caliper* dengan ketelitian 0,01 mm.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat penelitian
 - a. Autoklaf alat yang digunakan untuk sterilisasi alat (Hirayama, Jepang).
 - b. Cawan petri digunakan untuk media Blood Agar sebagai penanaman bakteri dan media tumbuh koloni bakteri (Pyrex Iwaki, Jepang).

- c. Pipet ukur digunakan untuk mengambil larutan dengan volume tertentu (Pyrex Iwaki, Jepang).
- d. Tabung reaksi digunakan untuk menyimpan suspensi bakteri (Pyrex Iwaki, Jepang).
- e. Erlenmeyer digunakan untuk menyimpan media Tryptose (Pyrex Iwaki, Jepang).
- f. Inkubator yang digunakan untuk menginkubasi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Memmert, Germany).
- g. Ose steril untuk mengambil bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- h. Mikropipet dan yellow tip digunakan untuk mengambil cairan suspensi dan larutan irigasi (Soccorex, Swiss).
- i. Kapas steril digunakan untuk menutup tabung reaksi yang sudah diberi suspensi bakteri.
- j. *Anaerobic jar* adalah alat untuk menginkubasi mikroba anaerob.
- k. *Anaerogen* adalah kertas *sachet* mengandung asam askorbat dan karbon aktif yang bereaksi dengan udara sehingga menciptakan kondisi atmosfer yang ideal untuk pertumbuhan anaerob.
- l. Pelubang sumuran yang digunakan untuk melubangi media *blood agar* dengan diameter 6mm.
- m. Pipet pasteur yang dimodifikasi untuk meratakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media *blood agar*.

- n. *Sliding caliper* yang digunakan untuk mengukur diameter sumuran dan zona radikal.
 - o. *Handscope* dan masker steril sebagai alat pelindung diri.
2. Bahan penelitian
- a. *Chlorhexidine 0,2%*.
 - b. *Chlorhexidine 0,2% + Hydrogen peroxide 3%*.
 - c. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
 - d. *Blood agar*
 - e. Media *Tryptose Phosphate Broth* .
 - f. *Aquadest* steril.

G. Jalannya penelitian

1. Tahap persiapan:
 - a. Perijinan penggunaan laboratorium
Membuat surat ijin penggunaan laboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta untuk penggunaan selama penelitian berlangsung.
 - b. Mempersiapkan sampel uji
 - 1) Mengurus surat etika penelitian pada program studi pendidikan dokter gigi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
 - 2) Mempersiapkan media, bahan uji dan bakteri uji.
 - c. Sterilisasi alat dan bahan
Alat uji bakteri yang terbuat dari kaca disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit dan bahan media

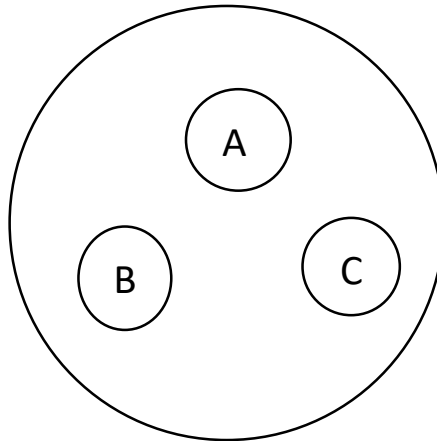
Tryptose Phosphate Broth disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 15 menit.

2. Inokulasi suspensi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Suspensi dibuat dengan menggunakan ose steril untuk mengambil bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, selanjutnya dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah terdapat media *Tryptose Phosphate Broth* dan dimasukkan kedalam *anaerobic jar*, inkubasi didalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C.

3. Uji Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran dengan cara Kirby Baurer. Suspensi bakteri yang telah memenuhi standar 10^8 CFU/ml diambil menggunakan mikropipet, setelah itu dituangkan pada permukaan media *blood agar* pada setiap cawan petri. Pipet pasteur modifikasi yang telah steril digunakan untuk meratakan bakteri yang telah disuspensi pada permukaan media *blood agar*, dimasukan ke dalam *anaerobic jar* dan diinkubasi selama 24 jam. Cawan petri dibagi menjadi 3 bagian dan dibuat lubang sumuran dengan diameter 6 mm. Aplikasikan larutan uji *chlorhexidine* 0,2% dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3 %, *chlorhexidine* 0,2 % dan *aquades* steril sebagai kontrol negative pada lubang sumuran. Cawan petri yang sudah berisi bakteri uji dan larutan irigasi dimasukkan ke dalam *anaerobic jar*, dilanjutkan proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.



Gambar 1. Pengaplikasian bahan dalam media *Blood Agar*

Keterangan :

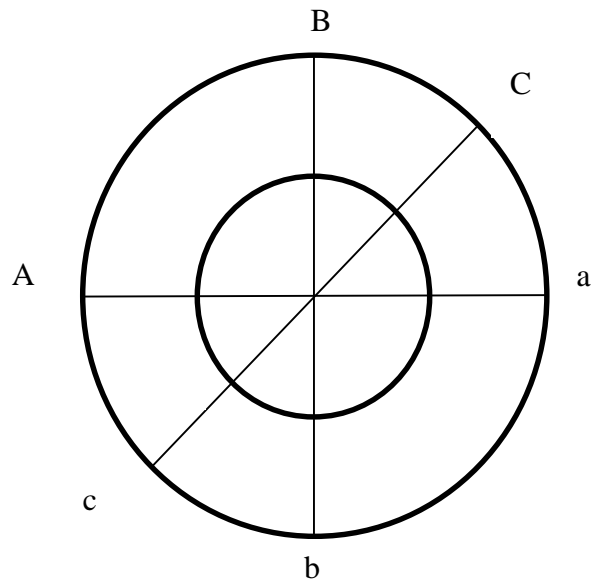
A : *Chlorhexidine* 0,2 % + *Hydrogen peroxide* 3%

B : *Chlorhexidine* 0,2%

C : Aquades steril

4. Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal dapat diukur setelah diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dan diukur menggunakan *sliding caliper* dengan ketelitian 0,01 mm. Cara membaca hasil zona radikal adalah dengan mengukur daerah disekitar sumuran yang sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri.



Gambar 2. Diagram Pengukuran Zona Radikal

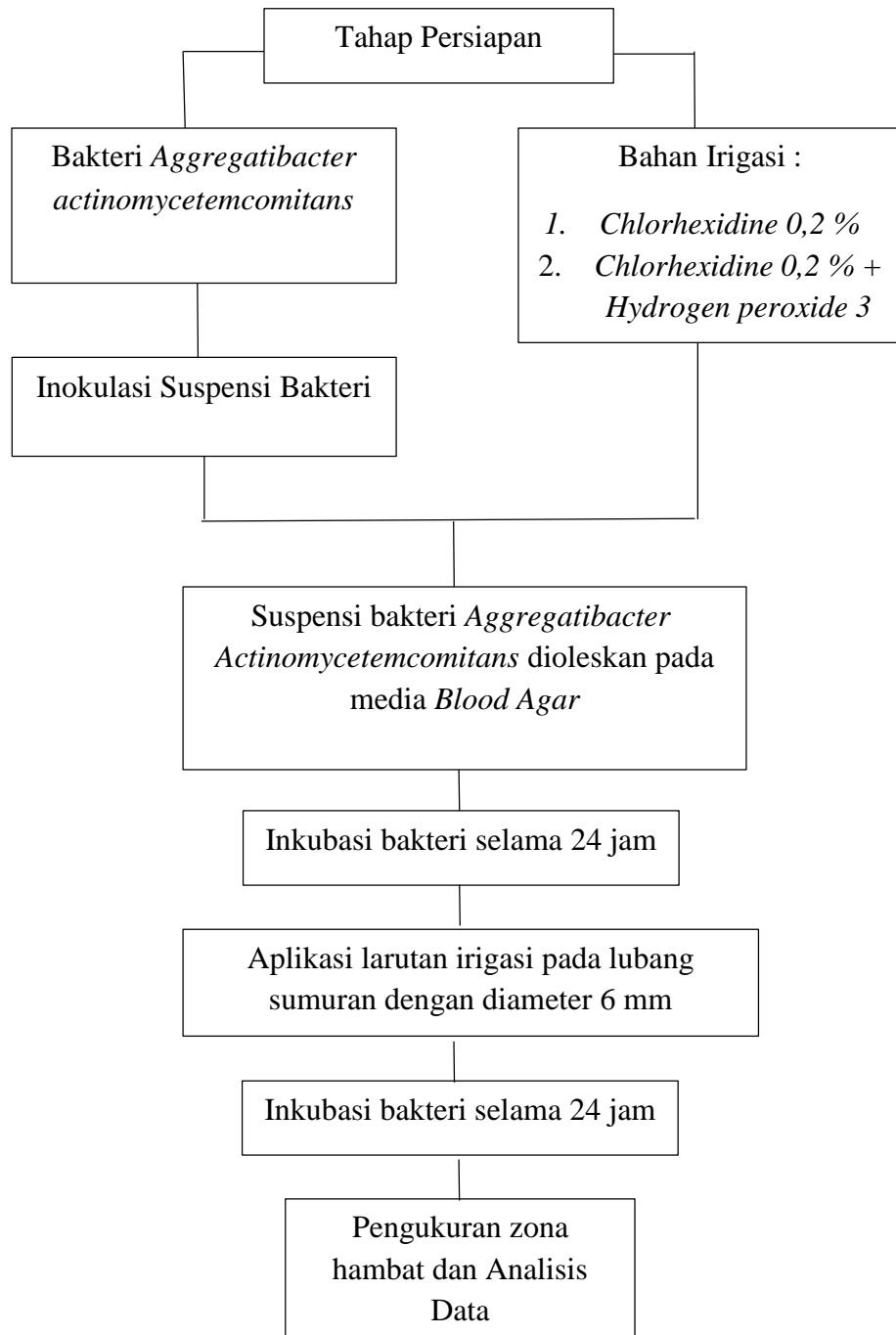
Keterangan:

Aa, Bb, Cc: Titik zona radikal

$$\text{Zona radikal} = \frac{(Aa) + (Bb) + (Cc)}{3}$$

Mengukur zona radikal yaitu dengan mengambil garis horizontal s (garis A dan a). Garis selanjutnya yaitu mengambil garis vertikal (B dan b), lalu mengambil garis dengan sudut 45° diantara A dan B (C dan c). Hasil akhir dari pengukuran zona radikal adalah pengukuran pertama ditambah pengukuran kedua dan ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga, setelah itu diberi perlakuan yang sama pada setiap disk sumuran (Hudzicki, 2009).

H. Kerangka Penelitian



I. Analisis Data

Data hasil penelitian mengenai pengaruh penggunaan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* uji statistik diawali dengan melakukan uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui apakah sampel yang diambil berasal dari sampel yang terdistribusi normal. Apabila data memiliki distribusi normal, maka perhitungan akan dilanjutkan dengan menggunakan *One Way ANOVA*, untuk menentukan perbedaan dari setiap masing-masing kelompok uji dilanjutkan dengan melakukan uji *Multiple Comparison* menggunakan *Dunnett T (2-sided)*. Namun, jika data memiliki distribusi tidak normal maka perhitungan yang akan digunakan adalah *Kruskal – Wallis*.