

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat

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 dilaksanakan Agustus – Oktober 2018

C. Subyek Penelitian

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

Daya antijamur diketahui dengan melakukan perhitungan kadar hambat minimal (KHM) pada masing-masing ekstrak jintan hitam dan ekstrak daun sirih hijau.

D. Estimasi Besar Sampel

Pada penelitian ini menggunakan rumus Federer untuk perhitungan sampelnya. Rumus perhitungan banyaknya sampel yang digunakan untuk penelitian eksperimen dapat ditulis sebagai berikut

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

Keterangan :

t = banyak kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi yang dilakukan

Perhitungan :

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

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

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

$$2r \geq 17$$

$$r \geq 8,5$$

Berdasarkan perhitungan di atas maka setiap kelompok perlakuan membutuhkan minimal 9 sampel. Pada penelitian ini digunakan 9 sampel pada 3 kelompok perlakuan, sehingga total sampel untuk penelitian ini ada 27 sampel. Subjek penelitian berupa cakram resin akrilik dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm. Sampel penelitian dibagi dalam 3 kelompok, 1 kelompok kontrol negatif, dan 2 kelompok uji, yaitu :

1. Kelompok I : direndam akuades selama 8 jam.
2. Kelompok II : direndam ekstrak jintan hitam 0,25% selama 8 jam.
3. Kelompok III : direndam ekstrak daun sirih hijau 50% selama 8 jam.

E. Identifikasi Variabel

1. Variabel pengaruh
 - a. Ekstrak jintan hitam 0,25%
 - b. Ekstrak daun sirih hijau 50% dan akuades steril

2. Variabel terpengaruh

Pertumbuhan jumlah koloni jamur *Candida albicans* pada basis gigi tiruan resin akrilik

3. Variabel terkendali

- a. Jenis resin akrilik : resin akrilik *heat cured*.
- b. Diameter cakram resin akrilik : 10 mm dengan ketebalan 2 mm berdasarkan ISO 4049 (2000).
- c. Jumlah bahan resin akrilik : 27 buah
- d. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam suspensi *Candida albicans* 24 jam 37°C.
- e. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak jintan hitam 8 jam pada suhu kamar.
- f. Lama perendaman cakram resin akrilik dalam ekstrak daun sirih hijau 8 jam pada suhu kamar.
- g. Lama pengeraman cawan petri dalam inkubator 24 jam pada suhu kamar 37°C.
- h. Suhu autoclave 121° C.

4. Variabel tak terkendali

- a. Kontaminasi bakteri dan jamur lain
- b. Jumlah *Candida albicans* pada resin akrilik
- c. Usia tanaman
- d. Penyebaran suspensi jamur
- e. Kekasaran basis resin akrilik

F. Definisi Operasional

1. Basis dasar gigi tiruan resin akrilik dalam bentuk cakram yang dibuat dari resin akrilik *heat cured* dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm.
2. Cakram resin akrilik yang tidak dipoles merupakan permukaan dalam basis gigi tiruan yang menghadap mukosa rongga mulut atau *fitting surface*.
3. Penyerapan air dan kekasaran permukaan pada permukaan resin akrilik menciptakan tempat perlekatan bagi *Candida albicans*. Peningkatan perlekatan koloni *Candida albicans* pada resin akrilik yang mengakibatkan inflamasi pada mukosa mulut yang terkena trauma.
4. *Candida albicans* merupakan organisme komensal, gram positif, berbentuk oval bertunas. Pertumbuhan *Candida albicans* adalah pertumbuhan jumlah koloni *Candida albicans* yang terlihat pada media *Sabouraud Dextrose Agar*.
5. Suspensi *Candida albicans* 10^8 CFU/ml adalah suatu larutan yang berisi *Candida albicans* yang telah disuburkan dan di encerkan dengan akuades steril sehingga mencapai kekeruhan sesuai standar brown III.
6. Ekstrak jintan hitam dan ekstrak daun sirih hijau adalah sediaan yang cair dari filtrat hasil maserasi dengan pelarut masing masing menggunakan metanol.
7. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang dilakukan dengan bahan simplisia yang dihaluskan dengan bahan pengekstraksi, selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya langsung untuk mencegah reaksi yang dikatalis cahaya atau perubahan warna, dan dikocok kembali

(remaserasi). Maserasi selesai apabila terjadi keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk ke dalam cairan.

G. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat-alat penelitian

- a. Inkubator yang digunakan untuk menginkubasi *Candida albicans* selama 24 jam pada suhu 37°C.
- b. Autoclave untuk mensterilkan alat-alat.
- c. Piring petri digunakan untuk tempat pembiakan *Candida albicans*.
- d. Lampu spritus digunakan untuk mensterilkan ose. Ose di sterilkan digunakan untuk mengambil koloni *Candida albicans*.
- e. Colony counter untuk menghitung koloni *Candida albicans*.
- f. Tabung sentrifuse untuk merendam resin akrilik dalam suspensi *Candida albicans*.
- g. Glas ukur dan spuit injeksi untuk mengukur volume larutan perendaman.
- h. Becker glass digunakan untuk merendam cakram resin akrilik dalam ekstrak jintan hitam dan ekstrak daun sirih hijau.
- i. Sliding calipers untuk mengukur subyek penelitian.
- j. Mikroskop digunakan untuk melihat koloni *Candida albicans*.
- k. Vortex mixer untuk melepaskan *Candida albicans* yang melekat pada cakram resin akrilik.

2. Bahan

- a. Ekstrak jintan hitam dengan konsentrasi 0,25% dan ekstrak daun sirih hijau dengan konsentrasi 50%.

- b. Sediaan jamur *Candida albicans* 10^8 CFU/ml.
- c. Larutan akuades digunakan sebagai kontrol.
- d. Media *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai media penyubur *Candida albicans*.
- e. Cakram resin akrilik dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm sebanyak 27 buah berdasarkan ISO 4049 (2000).
- f. Media *Sabouraud Dextose Agar*.
- g. Alkohol 70% untuk sterilisasi cakram resin akrilik.
- h. Saliva buatan sebagai bahan perlekatan *Candida albicans*.

H. Cara Penelitian

1. Tahap persiapan penelitian
 - a. Pengajuan *ethical clearance*.
 - b. Persiapan pembuatan lempeng resin akrilik
 - 1) Membuat lempeng dari malam merah berbentuk cakram dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm sejumlah 27 cakram dengan menggunakan cetakan malam. Cakram malam merah ini digunakan untuk membuat sampel lempeng resin akrilik yang tidak dipoles.
 - 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) Lempeng 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 pot 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.

c. Persiapan jintan hitam

- 1) Biji serbuk biji jintan hitam seberat 588 gram dicampur dengan metanol lalu diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam kemudian disaring, dan diulang tiga kali.
- 2) Setelah itu dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Corong Buchner* untuk mendapatkan filtratnya.
- 3) Selanjutnya filtrat diuapkan untuk menghilangkan air dan metanol dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70° C.
- 4) Penguapan akan menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan *water bath* suhu 70° C sambil terus diaduk dan didapatkan ekstrak jintan hitam
- 5) Ekstrak jintan hitam kemudian diencerkan dengan dimetil sulfoksida sehingga mencapai konsentrasi 0,25%

d. Persiapan daun sirih hijau

- 1) Serbuk daun sirih hijau seberat 600 gram dicampur dengan metanol lalu diaduk selama 30 menit dan didiamkan selama 24 jam kemudian disaring, dan diulang tiga kali.
- 2) Setelah itu dilakukan filtrasi dengan menggunakan *Corong Buchner* untuk mendapatkan filtratnya.
- 3) Selanjutnya filtrat dievaporasi untuk menghilangkan air dan metanol dengan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 70° C.

4) Penguapan akan menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dituang dalam cawan porselin dan dipanaskan dengan *water bath* suhu 70° C sambil terus diaduk dan didapatkan ekstrak daun sirih hijau.

5) Ekstrak daun sirih hijau kemudian diencerkan dengan dimetil sulfoksida sehingga mencapai konsentrasi 50%.

e. 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 basis resis akrilik.

2. Tahap pelaksanaan penelitian

a. Cakram resin akrilik dengan diameter 10 mm dan ketebalan 2 mm yang berjumlah 27 buah direndam di dalam akuades steril selama 48 jam untuk mengurangi sisa monomer

b. Sterilisasi lempeng resin akrilik menggunakan alkohol 70%

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 *Candida albicans*, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C

- e. Cakram resin akrilik kemudian diambil dengan pinset dan dipindahkan ke dalam ekstrak jintan hitam dan ekstrak daun sirih hijau dan diberi nomor 1-27. Cakram resin akrilik nomor 1-9 di rendam ke dalam akuades steril selama 8 jam, cakram resin akrilik nomor 10-18 di rendam dalam ekstrak jintan hitam dengan konsentrasi 0,25% selama 8 jam, dan cakram resin akrilik 19-27 di rendam dalam ekstrak daun sirih hijau dengan konsentrasi 50% selama 8 jam
- f. Cakram resin akrilik 1-27 diambil dan dimasukkan dalam masing-masing tabung reaksi berisi akuades 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 P^1 (10^{-1}) diperoleh dengan memasukkan 1 ml larutan dari tabung reaksi nomor 1 ke dalam tabung reaksi yang lain berisi 9 ml akuades steril.
 - 2) Pengenceran P^2 (10^{-2}) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P^1 ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril.
 - 3) Pengenceran P^3 (10^{-3}) diperoleh dengan cara memasukkan 1 ml larutan P^2 ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril.
 - 4) Diambil 0,1 ml larutan tes dari pengencer P^3 , lalu ditetaskan pada 1 petri agar *sabouraud* dan dieramkan dalam inkubator selama 48 jam pada suhu $37^{\circ} C$.
 - 5) Hal diatas tersebut dilakukan pada tabung reaksi nomor 2 sampai dengan tabung reaksi nomor 27

g. Setelah dilakukan pengeraman selama 48 jam pada suhu 37° C, dilakukan perhitungan jumlah koloni jamur *Candida albicans* dengan menggunakan alat hitung. Jumlah koloni *Candida albicans* yang diperoleh, digunakan untuk menghitung angka jamur masing-masing konsentrasi ekstrak jintan hitam, ekstrak daun sirih hijau dan larutan kontrol dengan rumus sebagai berikut :

1) Perhitungan angka *Candida albicans* pada masing-masing konsentrasi ekstrak jintan hitam, ekstrak daun sirih hijau, dan larutan kontrol dengan rumus :

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

2) Perhitungan kadar hambat minimal untuk mengetahui daya anti jamur pada masing masing konsentrasi dengan rumus :

$$KHM = \frac{100\% - AJT \times 100\%}{AJK}$$

Keterangan :

AJT : Angka jamur pada konsentrasi tertentu (CFU/ml)

AJK : Angka jamur pada larutan kontrol.

I. Analisis Data

Dalam penelitian ini, jumlah data sampel yang didapatkan kurang dari 50 sehingga 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. Hasil pengujian menggunakan SPSS menunjukkan data tidak berdistribusi

normal maka dilakukan uji hipotesa dengan *mann whitney test* untuk mengetahui perbandingan ekstrak jintan hitam dan ekstrak daun sirih hijau sebagai daya anti jamur terhadap *Candida albicans*.

J. Alur Penelitian

