

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris.

B. Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Larutan irigasi *chlorhexidine* 0.2% yang dikombinasikan dengan *hydrogen peroxide* 3%, *chlorhexidine* 0.2%, dan kontrol negatif (aquades steril). Tiap kelompok perlakuan dilakukan 6 kali pengulangan. Sehingga sampel dalam penelitian ini berjumlah 18 sampel, yang dibagi menjadi 3 kelompok perlakuan.

2. Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan adalah biakan bakteri anaerob yang didapat dari sulkus gingiva manusia.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi

Penelitian uji larutan irigasi *chlorhexidine* 0.2% yang dikombinasikan dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan biakan bakteri anaerob sulkus gingiva dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY.

2. Waktu

Waktu penelitian ini dilakukan pada bulan November 2017 – 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. Kontrol negatif (Aquades steril)

2. Variabel terpengaruh

Biaka bakteri anaerob sulkus gingiva.

3. Variabel terkendali

- a. Larutan irigasi *chlorhexidine* 0.2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%
- b. Media pembiakan bakteri
- c. Konsentrasi bakteri anaerob sulkus gingiva
- d. Suhu inkubator 37° C
- e. Cara mengaplikasi bakteri pada media *Blood agar*

E. Definisi Operasional

1. Bahan irigasi: larutan yang berisi antibakteri
2. Larutan irigasi yang digunakan adalah *chlorhexidine* 0,2% dan *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3%

3. Biakan bakteri anaerob sulkus gingiva didapat dari sulkus gingiva manusia yang di swap menggunakan paper point
4. Media yang digunakan adalah media *Blood agar*
5. Kontrol negatif menggunakan aquades
6. Pengukuran zona radikal dengan menggunakan *sliding caliper* dengan ketelitian 0,01mm.

F. Instrumen Penelitian

1. Alat penelitian

- a. Autoklaf untuk sterilisasi alat (Hiramaya, Jepang)
- b. Cawan petri untuk meletakkan media *Blood agar* sebagai penanaman bakteri dan digunakan untuk media tumbuh koloni bakteri (Pyrex Iwaki, Jepang)
- c. Inkubator yang digunakan untuk menginkubasi biakan bakteri anaerob sulkus gingiva (Mommert, Jerman)
- d. Pipet dan mikropipet digunakan untuk mengambil larutan (Pyrex Iwaki, Jepang)
- e. *Anaerobic jar* digunakan untuk menginkubasi bakteri anaerob
- f. Pipet pasteur yang dimodifikasi untuk meratakan biakan bakteri anaerob sulkus gingiva pada media *Blood agar*
- g. *Sliding caliper* digunakan untuk mengukur diameter disk pada cawan petri
- h. Tabung reaksi dan erlenmeyer digunakan untuk suspensi bakteri (Pyrex Iwaki, Jepang)

- i. *Handscone*, masker steril dan jas lab sebagai alat pelindung diri

2. Bahan penelitian

- a. *Chlorhexidine 0,2%* (Minosep)
- b. *Hydrogen peroxide 3%* (Glucosite)
- c. Biakan bakteri anaerob sulkus gingiva
- d. Media *Blood agar*
- e. Media *Tryptose broth*
- f. *Aquadest* steril (Brataco, Indonesia)
- g. Cakram (Oxoid, Indonesia)

Jalannya Penelitian

1. Tahap persiapan:

- a. Perijinan penggunaan laboratorium

Membuat surat izin penggunaan Laboratorium Mikrobiologi

FKIK UMY untuk penggunaan selama penelitian berlangsung

- b. Mempersiapkan sampel uji

- Mengurus surat etika penelitian pada program studi pendidikan dokter gigi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta

- Mempersiapkan media, bahan uji dan bakteri uji

- c. Sterilisasi alat

Alat uji bakteri yang terbuat dari kaca disterilkan dengan

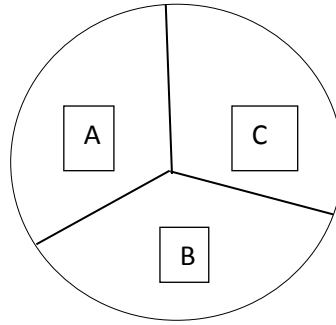
autoclave pada suhu 121 °C selama 20 menit.

2. Inokulasi suspensi bakteri pada media agar

Beberapa koloni bakteri diambil dari biakannya, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi media Tryptose Phosphate Broth. Tabung reaksi yang sudah ditambahkan bakteri dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan diinkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

3. Uji Daya Antibakteri

Uji daya antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi cakram. Suspensi bakteri yang telah memenuhi standar 10^8 CFU/ml diambil menggunakan mikro pipet, 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* pada setiap cawan petri secara merata, setelah itu tunggu ± 24 jam, selanjutnya pada tiap cawan petri dibagi menjadi 3 bagian yang nantinya akan diberikan kertas cakram. Kertas cakram dengan diameter 6 mm direndam dalam larutan uji *chlorhexidine* 0,2% dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3 %, *chlorhexidine* 0,2 % dan *aquades* steril sebagai kontrol negative selama ± 1 jam dengan menggunakan cawan petri. Kertas cakram yang telah direndam dengan larutan uji di letakkan pada media *Blood agar* dengan menggunakan pinset. Cawan petri yang sudah berisi bakteri uji dan kertas cakram dimasukkan ke dalam *anaerob jar*, dilanjutkan proses inkubasi selama ± 24 jam pada suhu 37°C.



Gambar 1. Pengaplikasian bahan dalam media *Blood agar*

Keterangan :

A : *Chlorhexidine* 0,2 % dikombinasi *hydrogen peroxide* 3%

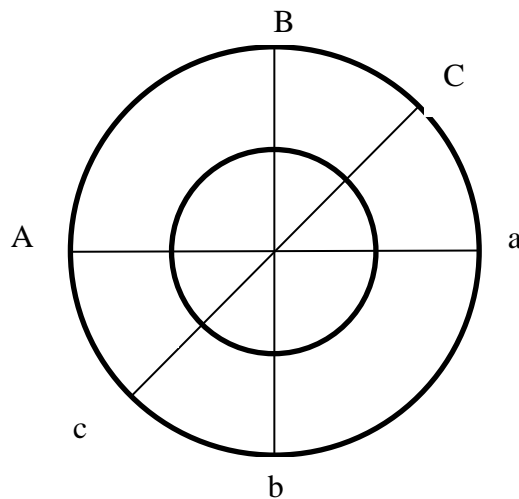
B : *Chlorhexidine* 0,2 %

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 disk yang sama sekali tidak ditemukan pertumbuhan bakteri. Mengukur zona radikal yaitu dengan mengambil garis horizontal (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). Setelah itu diberi perlakuan yang sama pada setiap disk cakram.

Pengukuran pertama dilakukan dengan mengukur diameter garis horizontal (A dan a), pengukuran kedua dengan mengukur diameter garis vertikal (B dan b), pengukuran ketiga dengan mengukur diameter 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 (Hudzicki.,2009)



Gambar 2. Diagram Pengukuran Zona Radikal

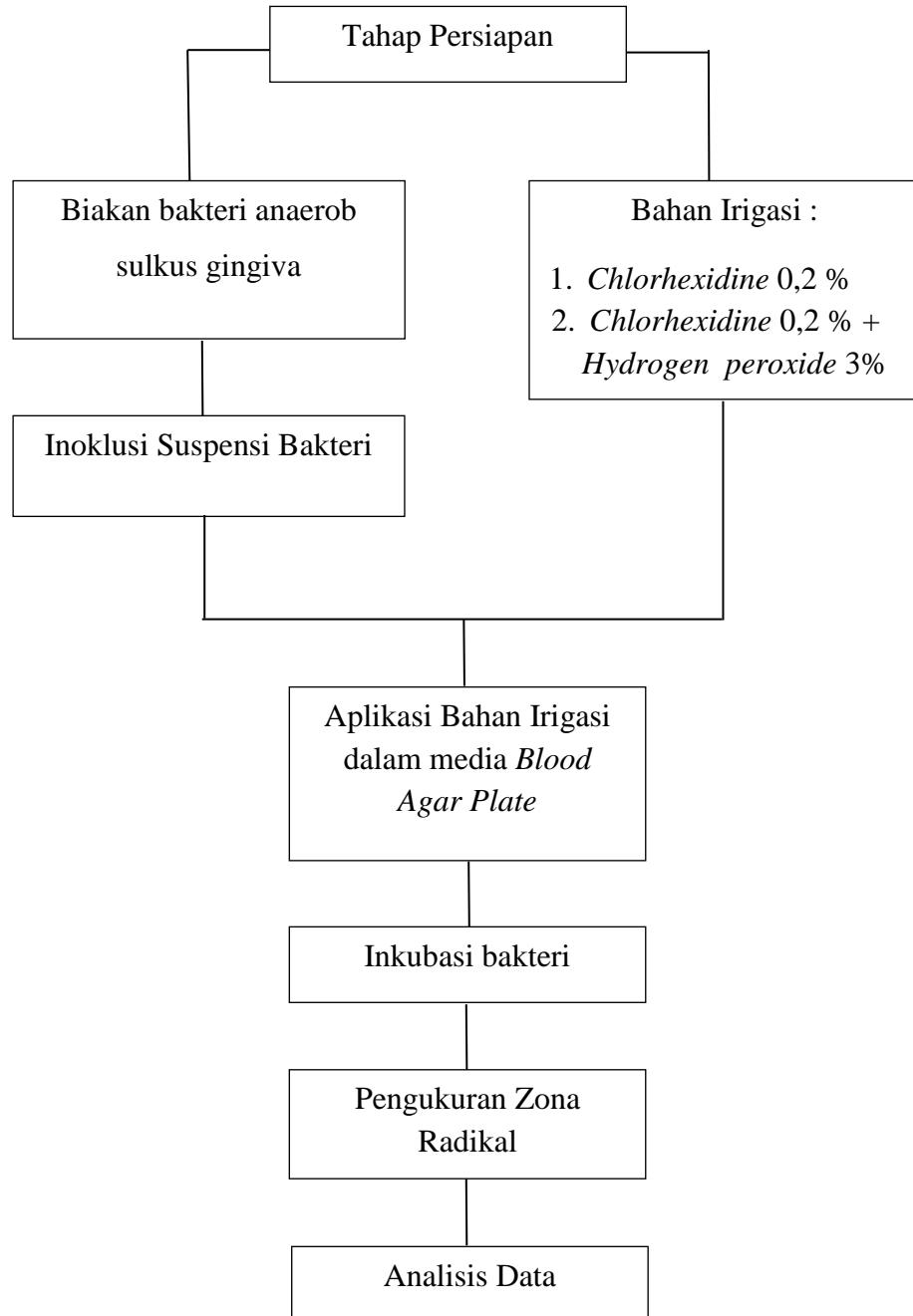
Keterangan:

Aa,Bb, Cc: Titik zona radikal

Rumus menghitung zona radikal :

$$\frac{(Aa) + (Bb) + (Cc)}{3}$$

G. Kerangka Penelitian



H. Analisa Data

Data hasil penelitian mengenai pengaruh penggunaan larutan irigasi *chlorhexidine* 0,2% yang dikombinasi dengan *hydrogen peroxide* 3% terhadap pertumbuhan biakan bakteri anaerob sulkus gingiva 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 dilakukan dengan menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji *Multiple Comparison* menggunakan *Dunnett T (2-sided)* untuk menentukan perbedaan dari setiap masing-masing kelompok uji. Namun, jika data memiliki distribusi tidak normal maka perhitungan yang akan digunakan adalah *Kruskal – Wallis*.