

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

4.2 Sumber Data

- *C. albicans* strain ATCC 10231 yang diperoleh dari Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- *C. albicans* usapan (*swab*) dari lesi mukosa mulut seorang pasien klinik Penyakit Mulut Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo, dengan kriteria inklusi:
 - Penderita kandidiasis oral
 - Menandatangani *informed consent*

Kriteria eksklusi:

- Menolak ikut penelitian

Pasien tersebut menderita kanker nasofaring dan terkena kandidiasis oral setelah menjalani terapi radiasi, dengan lesi pada bagian mukosa bukal kanan tanpa pengobatan antifungal.

4.3 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, antara bulan Agustus sampai Oktober 2008.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat:

- Kaca mulut
- Alat sentrifugasi
- Inkubator

- Otoklaf
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Sengkelit
- Cawan petri
- Eppendorf *tube* (1,5 ml *tube*)
- Tip Eppendorf
- Pipet Eppendorf
- Penangas Air (*Water Bath*)
- *Orbital Shaker*
- Timbangan Ohaus *Adventurer*
- Timbangan Ohaus *Explorer*
- Labu Erlenmeyer
- Gelas Beker
- Lemari pendingin
- Pembakar Bunsen
- Mikroskop
- Kaca benda dan kaca tutup

Bahan:

- *C. albicans* isolat klinis dari klinik Penyakit Mulut Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo
- *C. albicans strain ATCC 10231* dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- *Wooden cotton bud*
- *Container cotton bud*
- *CHROMagar* dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia
- *Fetal Bovine Serum (FBS)*, merk Biowest

- Sarung tangan dan masker
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebagai larutan isotonis yang digunakan dalam pembuatan suspensi *C. albicans*
- Akuades
- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), merk Laboratoris Conda, SA. Pronadisa, merupakan media tumbuh padat *C. albicans* dengan komposisi 40 g/L dekstrosa, 10 g/L pepton, dan 15 g/L *bacteriological agar* (agar bakteriologis)
- *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB), media tumbuh cair *C. albicans*, merk Laboratoris Conda, SA. Pronadisa dengan komposisi 20 g/L dekstrosa dan 10 g/L pepton
- *Xylitol* dari PT. Lotte Indonesia

4.5 Variabel Penelitian

- Variabel terikat : jumlah koloni *C. albicans* isolat klinis dan *strain ATCC 10231*.
- Variabel bebas: konsentrasi dan durasi pemaparan *xylitol*.

4.6 Definisi Operasional

- a. Jamur uji / sampel
C. albicans isolat klinis yang berasal dari usapan lesi mulut pasien kandidiasis oral yang belum diberi antifungal.
- b. Jamur pembanding
C. albicans strain American Type Culture Cell (ATCC) 10231 yang diperoleh dari Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- c. *Xylitol*
Bubuk putih bersifat higroskopis (rumus kimia $C_5H_{12}O_5$), diperoleh dari PT. Lotte Indonesia yang telah dibuat menjadi larutan dengan konsentrasi 1%, 5%, 10% dengan pelarut SDB.

d. Konsentrasi *xylitol*

Banyaknya gram *xylitol* yang terlarut dalam 100 ml SDB, yaitu nilai persentase larutan yang dikalikan dengan massa jenis *xylitol* 1,52 gr/ml.

e. *Colony Forming Unit* (CFU)

Merupakan ukuran yang digunakan untuk menyatakan jumlah koloni *C. albicans* yang tumbuh pada media SDA dalam cawan petri. Koloni jamur yang terbentuk dihitung dengan satuan CFU/ml.⁷⁶

4.7 Cara Kerja

- Setiap alat dan bahan yang digunakan disiapkan dalam keadaan steril.

4.7.1 Pengambilan Sampel dari Subyek Penelitian

- Siapkan *wooden cotton bud* steril, lengkapi identitas pasien pada *container*-nya.
- Sampel diambil dari *swab* seorang pasien klinik Penyakit Mulut RSCM yang memenuhi kriteria inklusi (menderita kandidiasis oral) dan eksklusi.
- Sebelum dilakukan pengusapan, isi *container* dengan 1 ml PBS.
- Penderita dimohon untuk membuka mulutnya, cari daerah lesi dengan bantuan kaca mulut. Usap daerah tersebut satu arah dengan tekanan ringan tanpa melukai mukosa.
- Celupkan usapan ini ke dalam *container* yang berisi 1 ml PBS, bawa ke laboratorium.

4.7.2 Persiapan Media Perbenihan

- Media perbenihan *C. albicans* yang digunakan adalah SDA dan SDB siap pakai yang telah disterilkan.
- Dibuat larutan SDA dengan perbandingan 65 g bubuk SDA yang dilarutkan dalam 1000 ml akuades.
- Kemudian dibuat larutan SDB dengan perbandingan 6,5 g bubuk SDB yang dilarutkan dalam 100 ml akuades, yang akan digunakan untuk melarutkan ekstrak *xylitol*.

- Setelah penimbangan dengan timbangan *Ohaus*, dilakukan pencampuran antara bubuk SDA/SDB dan akuades dalam labu Erlenmeyer, dikocok hingga merata. Labu Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil.
- Sterilisasi dan pemanasan selama 2 jam dilakukan dengan menggunakan otoklaf pada suhu 121° C, dan dibiarkan mendingin hingga suhu 50° C.
- Labu Erlenmeyer yang berisi larutan SDA tersebut diletakkan di atas *Orbital Shaker* beberapa saat agar tidak mengental.
- Kemudian larutan SDA tersebut dituang ke dalam cawan petri masing-masing 20 ml dan ke dalam tabung reaksi yang ditutup dengan kapas steril (untuk agar miring) kira-kira 5 ml sebagai media perbenihan padat, lalu dibiarkan pada suhu ruang.
- Tahap penuangan larutan SDA di atas dilakukan di dekat pembakar Bunsen untuk menjaga kesterilan media perbenihan.
- Larutan SDB yang berada dalam labu Erlenmeyer disimpan di dalam lemari pendingin, dan dikeluarkan bila akan digunakan.

4.7.3 Persiapan Media Coba

- Pindahkan SDB dari lemari pendingin ke penangas air dengan suhu 37°C dan diamkan selama 2 menit.
- Timbang bubuk *xylitol* untuk mendapatkan konsentrasi 1%, 5%, dan 10% sebagai berikut.
 - SDB tanpa *xylitol* (kontrol) : 20 ml SDB
 - SDB dengan kandungan *xylitol* 1% : 0,304 gr *xylitol* dilarutkan dalam 19,8 ml SDB. Cara perhitungan : volume campuran SDB dan *xylitol* yang diperlukan 20 ml. Untuk mendapatkan kandungan *xylitol* 1%, maka volume *xylitol* yang diperlukan diperoleh dengan cara $1\% \times 20 \text{ ml} = 2 \text{ ml}$. Untuk mendapatkan massa yang akan dilarutkan dalam SDB, maka volume yang diperlukan diperoleh dengan cara $2 \text{ ml} \times 1,52 \text{ gr/ml}$ (berat jenis *xylitol*) = 0,304 gr.
 - SDB dengan kandungan *xylitol* 5% : 1,52 gr *xylitol* dilarutkan dalam 19 ml SDB

- SDB dengan kandungan *xylitol* 10% : 3,04 gr *xylitol* dilarutkan dalam 18 ml SDB
- Masing-masing konsentrasi larutan tersebut ditempatkan dalam 4 botol kecil yang sudah diberi label lalu dihomogenisasi dengan *vortex mixer*.
- Sterilisasi dan pemanasan dilakukan dengan menggunakan otoklaf selama 2 jam pada suhu 121° C, dan dibiarkan mendingin hingga suhu 50° C.
- Setelah disterilisasi, masing-masing konsentrasi larutan SDB dan *xylitol* tersebut disimpan pada suhu ruang.

4.7.4 Identifikasi *C. albicans* dengan CHROMagar dan Serum

4.7.4.1 CHROMagar

- Identifikasi pertama *C. albicans* dilakukan dengan media CHROMagar.
- Sampel diusapkan pada media CHROMagar, diinkubasi pada media CHROMagar pada suhu 37°C selama 48 jam.
- Morfologi dan pigmentasi jamur uji diidentifikasi setelah 48 jam sesuai petunjuk pabrik pembuat CHROMagar (berwarna hijau).

4.7.4.2 Serum

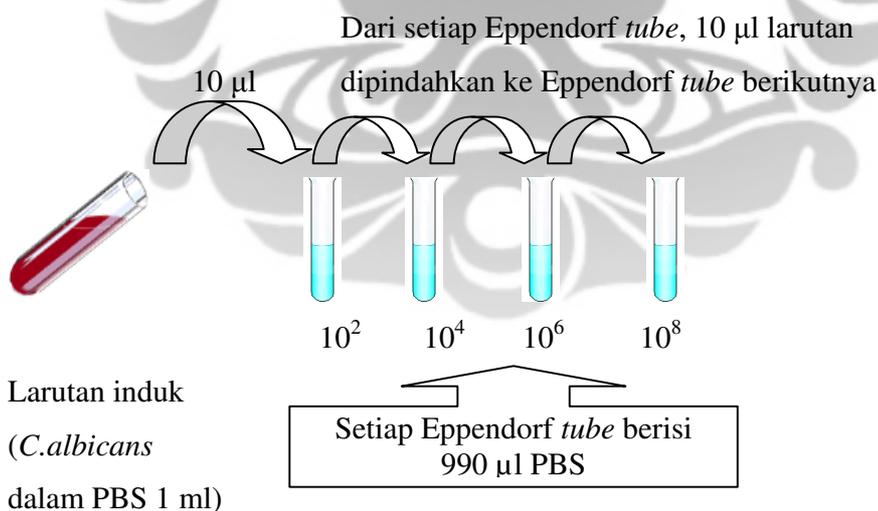
- Identifikasi *C. albicans* juga dilakukan dengan pemaparan serum untuk melihat pembentukan *germ tube*.
- Siapkan *C. albicans* berumur 48 jam yang tumbuh pada CHROMagar, serum yang berasal dari FBS, kaca benda, kaca tutup, dan mikroskop.
- FBS diambil dari lemari pendingin pada (-20°C), diamkan pada suhu kamar sampai bekuan FBS mencair.
- Dengan pipet Eppendorf ambil 10 µl FBS, teteskan di atas kaca benda. Dengan ujung sengkelit yang telah dibakar diambil sedikit koloni *C. albicans* dari CHROMagar berumur 48 jam. Setelah dicampur dengan 10 µl FBS, lalu ditutup dengan gelas tutup.

- Sediaan ini diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam, setelah itu diperiksa di bawah mikroskop dengan pembesaran 10 x 10 dan 10 x 45 untuk melihat pembentukan *germ tube*.
- *C. albicans strain* ATCC 10231 ditanam dalam media CHROMagar dan serum sebagai pembanding untuk *C. albicans* isolat klinis.
- Koloni *C. albicans* baik isolat klinis maupun *strain* ATCC 10231 yang diidentifikasi positif baik pada CHROMagar maupun serum diambil dengan sengkeli untuk masing-masing dibiak pada SDA miring.
- Sebelum koloni *C. albicans* isolat klinis atau *strain* ATCC 10231 tersebut diambil, sengkeli dipanaskan sehingga kawat berwarna merah, didinginkan pada agar di pinggir cawan petri. Masing-masing koloni diambil sedikit untuk kemudian digoreskan pada SDA miring dan ditutup kembali.
- Setiap tahap dilakukan di dekat pembakar Bunsen untuk menjaga kesterilannya.
- Pada label masing-masing tabung reaksi tertera nama *C. albicans* isolat klinis atau *strain* ATCC serta tanggal penanamannya. Tabung-tabung ini kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

4.7.5 Membuat Suspensi *C. albicans* hingga Pengenceran 10⁸ kali

- Dengan pipet Eppendorf, 1 ml PBS dimasukkan ke dalam Eppendorf *tube*.
- Biakan *C. albicans* isolat klinis dari SDA miring berumur 48 jam dikerok dengan sengkeli. Sebelum pengerokan, sengkeli dipanaskan di atas pembakar Bunsen sampai kawat berwarna merah kemudian didinginkan pada SDA di pinggir tabung reaksi. Kerokan koloni *C. albicans* ini lalu dimasukkan ke dalam Eppendorf *tube* yang berisi 1 ml PBS, kemudian dihomogenisasi.
- Untuk pengenceran ini, disiapkan 4 Eppendorf *tube* yang masing-masing diberi label A₁–A₄, tanggal, dan konsentrasi.
- Kemudian setiap Eppendorf *tube* diisi dengan 990 µl PBS dengan menggunakan pipet Eppendorf.

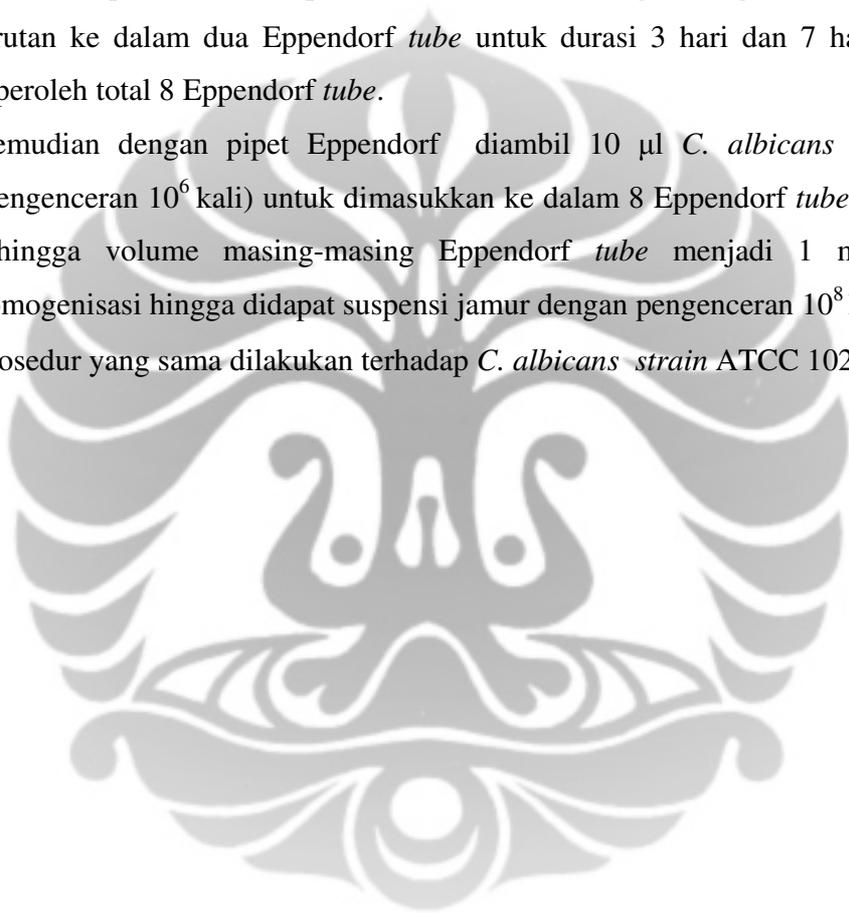
- Setelah itu dari 1 ml larutan induk *C. albicans* isolat klinis di atas diambil 10 μ l, dicampur dengan 990 μ l PBS dalam Eppendorf tube no A₁ lalu dihomogenisasi hingga didapatkan suspensi *C. albicans* dengan pengenceran 10² kali.
- Dari Eppendorf tube no A₁ ini kemudian diambil 10 μ l, masukkan ke dalam Eppendorf tube A₂ yang telah berisi 990 μ l PBS, dihomogenisasi hingga didapatkan suspensi *C. albicans* dengan pengenceran 10⁴ kali.
- Untuk mendapatkan pengenceran hingga 10⁸ kali, prosedur pengenceran ini dilanjutkan terhadap Eppendorf tube no A₃ dan A₄.
- Dari Eppendorf tube terakhir (pengenceran 10⁸) diambil 10 μ l suspensi *C. albicans* ini, teteskan ke dalam cawan petri berisi SDA lalu diratakan dengan sudip.
- Prosedur yang sama dilakukan untuk *C. albicans* strain ATCC 10231.
- 10 μ l suspensi *C. albicans* baik isolat klinis maupun strain ATCC 10231 (pengenceran 10⁸) ditanam secara duplo dalam SDA, diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam.
- Kemudian penghitungan jumlah koloni *C. albicans* baik isolat klinis maupun strain ATCC 10231 dengan pengenceran 10⁸ ini dilakukan, sehingga jumlah koloni isolat klinis dan strain ATCC 10231 diperoleh.



Gambar 4.1. Proses Pengenceran *C. albicans* hingga Pengenceran 10⁸ kali

4.7.6 Pemaparan *C. albicans* dalam Media Coba (SDB dan *Xylitol* 1%, 5%, dan 10%)

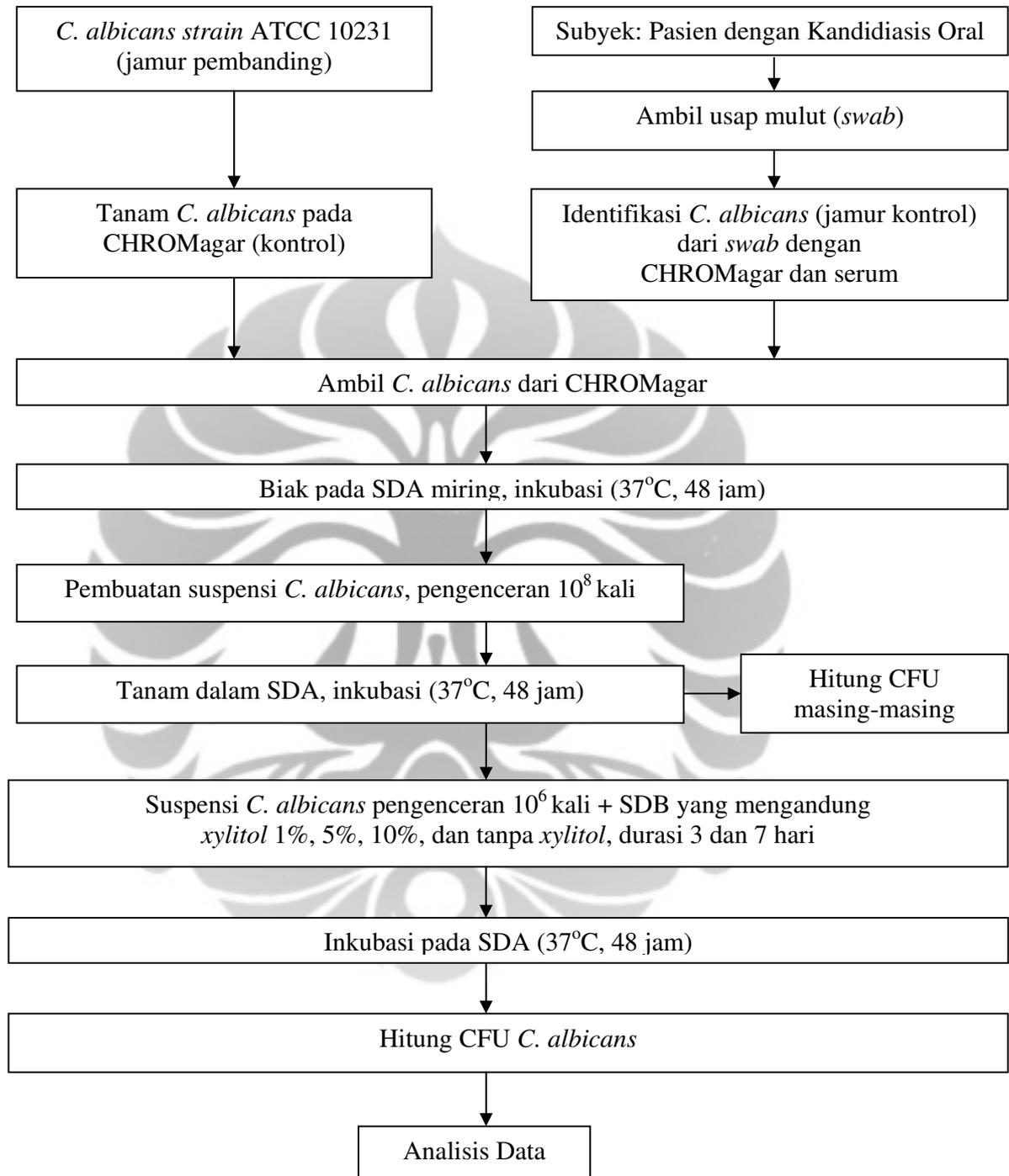
1. Siapkan Eppendorf *tube* yang berisi 1 ml suspensi *C. albicans* isolat klinis yang sudah diencerkan 10^6 kali.
 2. Siapkan 4 botol kecil berisi 20 ml media coba (SDB tanpa *xylitol* dan SDB + *xylitol* 1%, 5%, 10%) yang telah dibuat pada butir 4.7.3.
 3. Dari ke empat konsentrasi pada butir 2 di atas, masing-masing ditambahkan 990 μ l larutan ke dalam dua Eppendorf *tube* untuk durasi 3 hari dan 7 hari, sehingga diperoleh total 8 Eppendorf *tube*.
 4. Kemudian dengan pipet Eppendorf diambil 10 μ l *C. albicans* dari butir 1 (pengenceran 10^6 kali) untuk dimasukkan ke dalam 8 Eppendorf *tube* pada butir 3 sehingga volume masing-masing Eppendorf *tube* menjadi 1 ml. Lakukan homogenisasi hingga didapat suspensi jamur dengan pengenceran 10^8 kali.
- Prosedur yang sama dilakukan terhadap *C. albicans strain* ATCC 10231.



- Prosedur pembilasan ini dilakukan sebanyak 3 kali sampai didapat Eppendorf *tube* yang berisi 1 ml PBS yang mengandung *C. albicans* baik isolat klinis maupun *strain* ATCC 10231.
- Kemudian untuk setiap Eppendorf *tube* yang sudah dibilas tersebut, penanaman dilakukan secara duplo dalam cawan petri berisi 20 ml SDA.
- Sepuluh μ l suspensi *C. albicans* diambil dengan pipet Eppendorf dari setiap Eppendorf *tube* lalu dimasukkan ke cawan petri yang berisi SDA, kemudian diratakan dengan sudip.
- Setelah itu, semua cawan petri tersebut diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam untuk dihitung jumlah pembentukan koloni *C. albicans* masing-masing.
- Prosedur yang sama dilakukan untuk pemaparan *xylitol* durasi 7 hari.



4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Uji yang digunakan untuk menganalisis data-data yang telah didapatkan dari hasil penelitian meliputi uji Saphiro Wilk dan uji *General Linear Model* (GLM) Univariat. Untuk menguji normalitas sebaran data dengan jumlah sampel yang kecil, digunakan uji Saphiro Wilk. Tes normalitas data ini dilakukan untuk menentukan uji yang akan digunakan pada tahap berikutnya. Selanjutnya digunakan uji GLM Univariat dengan derajat kemaknaan 5% (α 0,05) untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna antara kelompok data yang dianalisis.

