

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

4.2 Subjek Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah *C. albicans* yang diperoleh dari usapan (*swab*) lesi mukosa mulut subjek, yaitu 1 orang pasien klinik Penyakit Mulut Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo, berusia 62 tahun, dengan diagnosa kanker nasofaring dan terkena kandidiasis oral setelah menjalani terapi radiasi. Lesi kandidiasis oral pada pasien di mukosa bukal kanan belum menerima terapi antifungal.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian: *C. albicans* isolat klinis dan *strain* laboratorik ATCC 10231 yang dibiakkan pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA).

Panen dan inokulasi *C. albicans* dilakukan pada hari ke 2.

Penghitungan jumlah koloni *C. albicans* sebelum diberi paparan *xylitol* dilakukan pada hari ke 2 setelah pembiakannya di SDA.

Penghitungan jumlah koloni *C. albicans* setelah diberi paparan *xylitol* dilakukan 2 hari setelah penanamannya di SDA, yaitu pada hari ke 5 untuk paparan *xylitol* 3 hari dan hari ke 9 untuk paparan *xylitol* 7 hari.

4.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

Kriteria inklusi:

- Penderita kandidiasis oral
- Menandatangani *informed consent*

Kriteria eksklusi:

- Daerah lesi telah dioles antifungal

- Telah mengonsumsi antifungal sistemik
- Menolak ikut penelitian

4.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

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

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

Alat:

- Kaca mulut
- Alat sentrifugasi
- Inkubator
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Ose dan sengkeli
- Cawan petri
- Eppendorf *tube*
- Tips biru dan kuning
- Pipet Eppendorf
- Water Bath
- Orbital Shaker
- Timbangan Ohaus Adventurer (dalam gram)
- Timbangan Ohaus Explorer (dalam miligram)
- Tabung Erlenmeyer
- Gelas Beker
- Lemari pendingin (*freezer* pada kulkas)
- Lemari pendingin -20°C
- Mikroskop
- *Microscope slide* dan *object glass*

Bahan:

- *Candida albicans* isolat klinis (Klinik Penyakit Mulut RSUPNCM)
- *Candida albicans* strain laboratorik ATCC 10231 (Laboratorium Mikrobiologi, FK UI)
- *Wooden cotton bud*
- *Container cotton bud* steril
- *CHROMagar* (Laboratorium Parasitologi, FK UI)
- Sarung tangan dan masker steril
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Akuades
- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Laboratorios Conda, S.A., Pronadisa®)
- *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) (Laboratorios Conda, S.A., Pronadisa®)
- *Xylitol* (PT Lotte Indonesia)
- *Fetal Bovine Serum* (FBS) (Biowest, South America)

4.7 Variabel Penelitian

Variabel terikat: jumlah koloni *C. albicans* dalam serum.

Variabel bebas: *xylitol*.

4.8 Definisi Operasional

a. *C. albicans* isolat klinis

Spesies *C. albicans* yang dibiakkan dari usapan lesi mukosa mulut pasien (*oral swab*) yang terdiagnosa menderita kandidiasis oral dan belum menerima terapi antifungal. Teknik usap (*swab*) dilakukan dengan mengusapkan *wooden cotton bud* steril pada daerah lesi, dengan sedikit penekanan tanpa melukai mukosa.

b. *C. albicans* strain laboratorik

C. albicans strain ATCC (*American Type Culture Cell*) 10231 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

c. Jumlah pembentukan koloni (*Colony Forming Unit*)

Banyaknya koloni *C. albicans* pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang dihitung 2 hari pasca pembiakannya di SDA.

d. *Xylitol*

Xylitol bubuk dengan rumus kimia $C_5H_{12}O_5$ yang diperoleh dari PT. Lotte Indonesia yang telah dibuat menjadi larutan dengan konsentrasi 1%, 5%, 10% dengan pelarut *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB).

e. Konsentrasi *xylitol*

Banyaknya gram *xylitol* yang terlarut dalam 100 ml SDB. Karena massa jenis *xylitol* 1,52 gr/ml, maka untuk membuat larutan *xylitol* konsentrasi x %, dilarutkan 1,52 x gram dalam 100 ml SDB. Dengan demikian pada penelitian ini untuk larutan *xylitol* 1% sebanyak 20 ml, dibutuhkan 0,304 gram bubuk *xylitol* dan 19,8 ml SDB. Untuk larutan *xylitol* 5% sebanyak 20 ml, dibutuhkan 1,52 gram bubuk *xylitol* dan 19 ml SDB. Dan untuk larutan *xylitol* 10% sebanyak 20 ml, dibutuhkan 3,04 gram bubuk *xylitol* dan 18 ml SDB. Untuk larutan 0% dibutuhkan 20 ml SDB.

f. Serum

Dalam penelitian ini digunakan FBS (*Fetal Bovine Serum*) aktif dan inaktif. Serum FBS inaktif adalah yang telah dipanaskan pada suhu 65°C selama 30 menit, untuk menginaktifkan faktor komplemen serum.

4.9 Cara Kerja Penelitian

4.9.1 Pengambilan Sampel *C. albicans* Isolat Klinis dari Subjek Penelitian

1. *Wooden cotton bud* steril disiapkan, disimpan dalam kontainernya yang telah diberi label identitas pasien.
2. Regio mukosa mulut dengan lesi kandidiasis oral diusap 1 arah dengan sedikit penekanan tanpa melukai mukosa menggunakan *wooden cotton bud* steril.
3. *Wooden cotton bud* yang telah mengandung usapan mukosa mulut dimasukkan ke kontainernya dan dibawa ke laboratorium.

4.9.2 Pemiakan *C. albicans* Isolat Klinis pada CHROMagar untuk Identifikasi

Sebelum digunakan, media CHROMagar disimpan dalam keadaan tidak terkena cahaya. *Wooden cotton bud* yang mengandung usapan mukosa mulut lesi kandidiasis diulaskan pada media CHROMagar, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari.

4.9.3 Persiapan Media SDA dan SDB

SDA atau SDB dalam penelitian ini dibuat dengan cara melarutkan bubuk SDA atau SDB dalam akuades dengan perbandingan 65 gram per 1 liter. Larutan dipanaskan sampai suhu 121°C dalam autoklaf, kemudian dituang ke cawan petri atau ke tabung reaksi untuk SDA. Sebelum digunakan, media SDA disimpan dalam lemari pendingin 4°C.

4.9.4 Konfirmasi Identifikasi *C. albicans* dengan Uji Pembentukan *Germ Tube* dan Pigmentasi Koloni dalam CHROMagar

1. Alat dan bahan yang digunakan untuk melakukan konfirmasi *C. albicans* yaitu 1 ml FBS, *microscope slide* dan *object glass*, serta mikroskop cahaya.
2. Setelah dikultur 2 hari, CHROMagar yang mengandung *C. albicans* dikeluarkan dari inkubator. Identifikasi spesies *C. albicans* ditentukan berdasarkan morfologi dan pigmentasi koloni, sesuai ketentuan yang ditetapkan pabrik pembuat CHROMagar. Pada penelitian ini *C. albicans* membentuk koloni berbentuk bulat dengan warna hijau pucat.
3. Dari CHROMagar tersebut diambil sejumlah koloni yang menampakkan warna hijau pucat untuk dilakukan uji pembentukan *germ tube*. Koloni yang diambil kemudian dipaparkan dengan serum, lalu diinkubasi selama 2 jam dengan suhu 37°C.
4. Setelah 2 jam, koloni *C. albicans* tersebut diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40 kali. Gambaran kelompok sel-sel ragi dengan pemanjangan filamentosa membentuk *germ tube* tanpa konstiksi pada pangkalnya, menandakan spesies *C. albicans*.

4.9.5 Kultur *C. albicans* Isolat Klinis dan *Strain* ATCC pada Tabung Reaksi Agar Miring

1. Koloni yang teridentifikasi sebagai *C. albicans* dikultur pada media SDA miring. Seluruh prosedur dilakukan di dekat api untuk menjaga kesterilan media kultur.

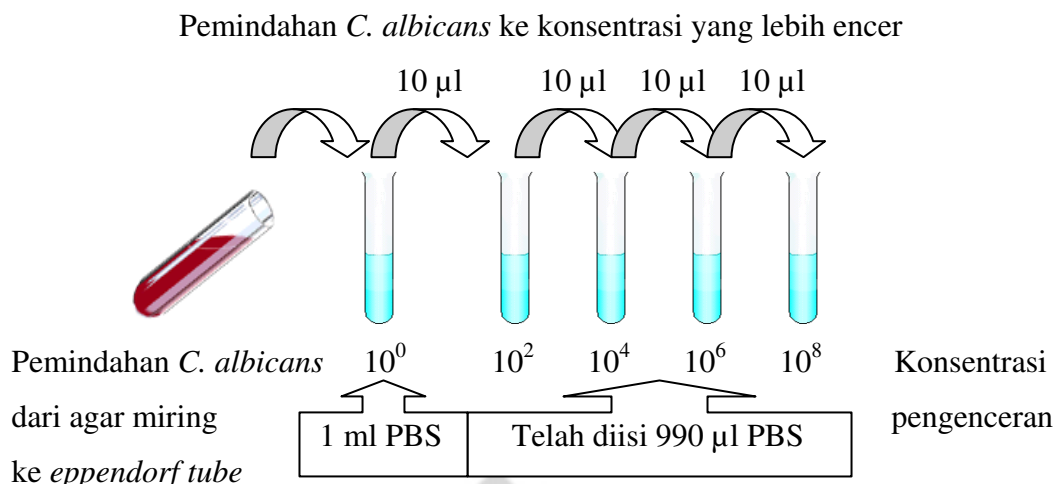
2. Tabung reaksi media SDA miring ditutup dengan kapas steril, diberi label identitas sampel dan tanggal penanaman, dan disimpan di dalam inkubator bersuhu 37°C.
3. Setelah 2 hari dalam media agar miring, dilakukan pengenceran sampai 10⁸.
4. Lakukan juga prosedur kultur yang sama untuk *C. albicans strain* ATCC 10231.

4.9.6 Pembuatan Larutan *Xylitol* 1%, 5%, dan 10%

Pembuatan larutan *xylitol* 1%, 5%, dan 10% dilakukan dengan cara melarutkan bubuk *xylitol* ke dalam media SDB di dalam *Eppendorf tube* dengan cara penghitungan seperti telah dijelaskan pada sub bab 4.8. Larutan *xylitol* kemudian disterilkan dengan cara dimasukkan ke dalam autoklaf. Larutan *xylitol* steril disimpan dalam suhu kamar sampai digunakan.

4.9.7 Pembuatan Suspensi *C. albicans* hingga Pengenceran 10⁸

1. Alat dan bahan yang digunakan untuk melakukan pengenceran dan paparan *xylitol* yaitu *Eppendorf tube*, larutan PBS, cawan petri, dan pipet. Untuk masing-masing *strain C. albicans* (isolat klinis atau ATCC) diperlukan 13 *eppendorf tube*, yaitu 5 *eppendorf tube* untuk pengenceran, dan 8 *eppendorf tube* yang tutupnya telah diganti dengan kapas steril untuk paparan *xylitol*.
2. Setelah 2 hari dibiakkan dalam tabung reaksi SDA miring, *C. albicans* dimasukkan ke dalam *eppendorf tube* pertama yang berisi 1 ml PBS (pengenceran 10⁰).
3. Setelah dihomogenisasi menggunakan mikropipet, 10 µl *C. albicans* dipindahkan ke *eppendorf tube* kedua yang berisi 990 µl PBS (pengenceran 10²). Ulangi tahap ini sampai diperoleh pengenceran 10⁸.
4. Dari *eppendorf tube* terakhir (pengenceran 10⁸), 10 µl *C. albicans* dipindahkan ke SDA cawan petri. Prosedur ini dilakukan 2 kali sehingga didapat duplo SDA cawan petri hasil pengenceran. Kedua cawan petri disimpan dalam inkubator bersuhu 37°C. Penghitungan jumlah koloni dilakukan 2 hari kemudian. Hasil penghitungan tersebut merupakan nilai jumlah koloni awal sebelum diberi paparan *xylitol*.



Gambar 4.1. Proses Pengenceran *C. albicans*

Semua prosedur dilakukan di dekat api untuk menjaga kesterilannya. Prosedur pengenceran dan penanaman yang sama dilakukan juga untuk *C. albicans strain* ATCC.

4.9.8 Pemaparan *C. albicans* dengan *Xylitol*

1. 8 *ependorf tube* yang tutupnya sudah diganti dengan kapas steril disiapkan, diberi label konsentrasi *xylitol* (0%, 1%, 5%, 10%) dan 2 durasi paparan (3 dan 7 hari). Tiap *ependorf tube* tersebut diisi dengan larutan *xylitol* yang telah dihomogenisasi, sebanyak 990 µl.
2. Dari suspensi *C. albicans* pengenceran 10^4 yang telah dihomogenisasi, diambil 10 µl untuk dipindahkan ke masing-masing *ependorf tube* berisi larutan *xylitol*.
3. Kedelapan *ependorf tube* berisi *C. albicans* dalam media yang mengandung *xylitol* tersebut disimpan di dalam suhu kamar selama 3 hari dan 7 hari, untuk kemudian dilakukan uji resistensi *C. albicans* dalam serum.

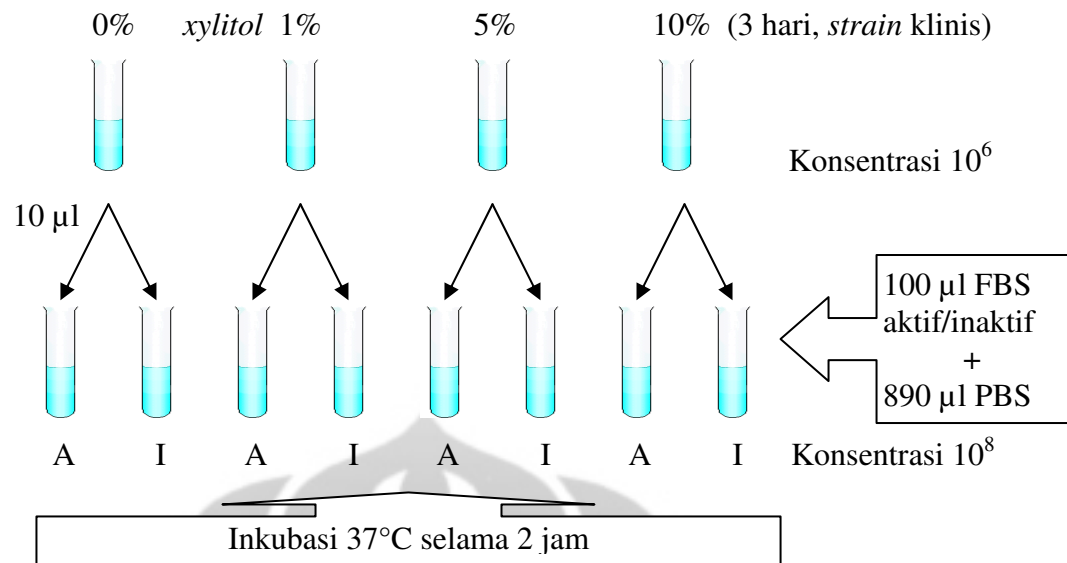
4.9.9 Persiapan Serum Aktif dan Inaktif

Untuk keperluan uji resistensi *C. albicans* dalam serum setelah pemaparan *xylitol* 3 hari dan 7 hari, diperlukan sekitar 2 ml serum aktif dan 2 ml serum inaktif. Inaktivasi komplemen larutan *Fetal Bovine Serum* (FBS) dilakukan dengan cara inkubasi pada suhu 65°C selama 30 menit. *Eppendorf tube* yang

berisi serum aktif dan serum inaktif disimpan dalam lemari pendingin -20°C sampai digunakan.

4.9.10 Uji Resistensi *C. albicans* dalam Serum Pasca Pemaparan *Xylitol*

1. Alat dan bahan untuk uji resistensi *C. albicans* dalam serum adalah *ependorf tube* berisi *C. albicans* dalam media yang mengandung *xylitol* berusia 3 hari atau 7 hari, *ependorf tube* berisi serum FBS aktif dan inaktif, SDA dalam cawan petri, larutan PBS, *ependorf tube* kosong, serta tips biru dan kuning untuk *pipetting*.
2. Keempat *ependorf tube* berisi *C. albicans* dalam media mengandung *xylitol* dimurnikan dari medianya dengan prosedur sebagai berikut:
 - a. Tutup kapas diganti dengan tutup *ependorf tube* steril kemudian disentrifugasi, selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm.
 - b. Setelah pembuangan supernatan, ke dalam tiap *ependorf tube* ditambahkan PBS sampai volume larutan menjadi 1 ml, lalu dihomogenisasi, kemudian disentrifugasi seperti prosedur (a).
 - c. Prosedur poin (b) diulang, kemudian dilakukan pembuangan supernatan, dan ke dalam tiap *ependorf tube* ditambahkan PBS sampai volume larutan menjadi 1 ml.
3. Dari tiap *ependorf tube* tersebut diambil 10 μl untuk dipaparkan dengan serum aktif dan 10 μl untuk dipaparkan dengan serum inaktif. Dengan demikian di dalam tiap *ependorf tube* mengandung 10% serum (aktif atau inaktif) yaitu 890 μl PBS, 10 μl suspensi *C. albicans*, dan 100 μl serum.
4. Larutan *C. albicans* dalam serum dimasukkan dalam inkubator bersuhu 37°C selama 2 jam.
5. Setelah 2 jam, *ependorf tube* dikeluarkan dari inkubator. Dari tiap *ependorf tube* diambil 10 μl untuk ditanam dalam SDA cawan petri. Prosedur tersebut dilakukan duplo. *C. albicans* dalam media SDA tersebut kemudian dimasukkan dalam inkubator 37°C selama 2 hari.
6. Lakukan prosedur yang sama untuk *C. albicans strain* ATCC 10231.



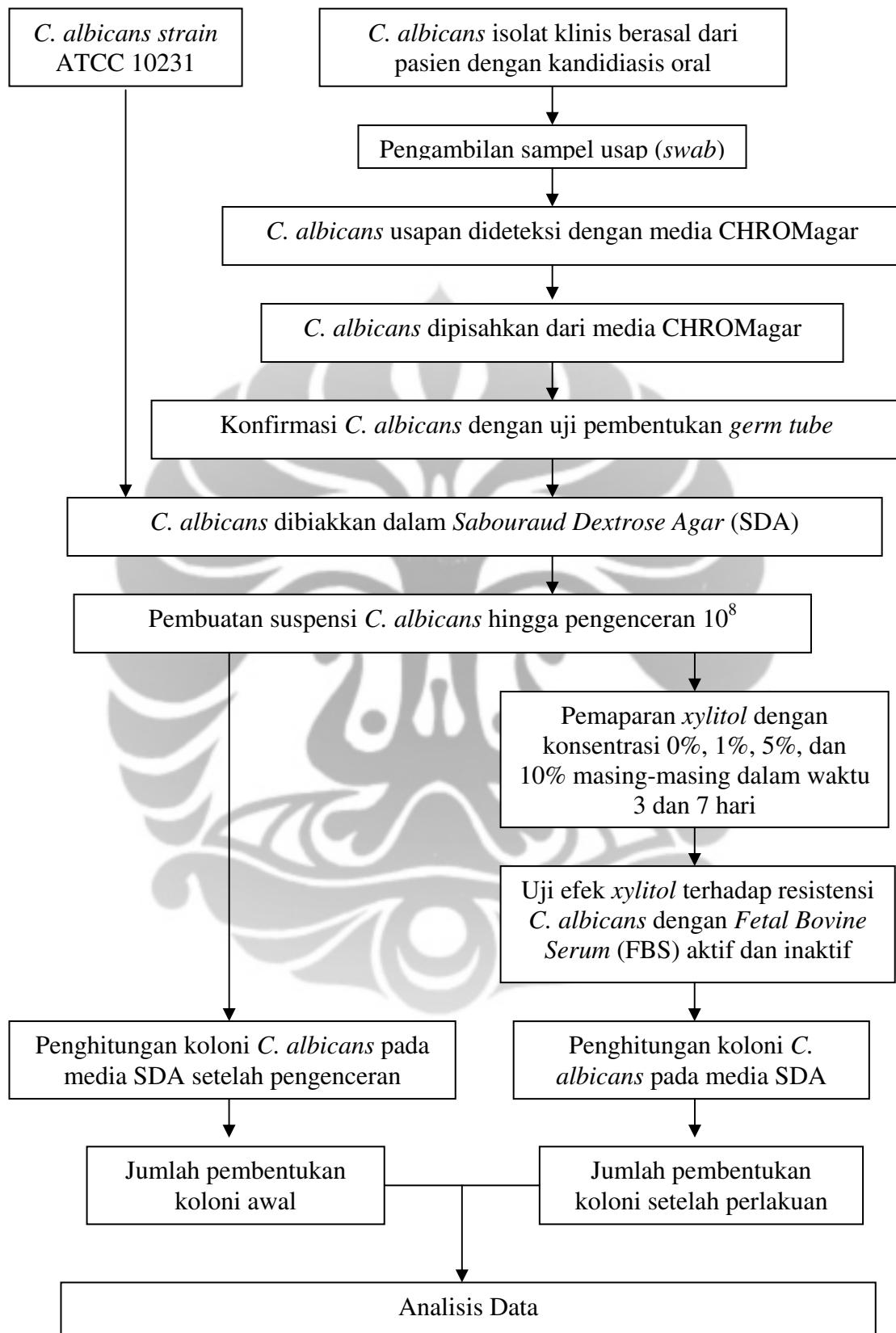
A = serum aktif, I = serum inaktif

Gambar 4.2. Uji Resistensi *C. albicans* dalam Serum Aktif dan Inaktif

4.9.11 Penghitungan Jumlah Koloni *C. albicans*

Setelah 2 hari, cawan petri berisi *C. albicans* yang telah terpapar *xylitol* selama 3 atau 7 hari dikeluarkan dari inkubator dan dilakukan penghitungan jumlah koloni. Hasil penghitungan dicatat dalam satuan CFU/ml. Prosedur yang sama dilakukan terhadap sampel *C. albicans strain* ATCC 10231.

4.10 Alur Penelitian



4.11 Analisis Data

Pengujian normalitas data menggunakan uji Shapiro-Wilk dilakukan pada 4 kelompok data, yaitu data jumlah koloni *C. albicans* isolat klinis durasi 3 dan 7 hari, serta data *strain* ATCC durasi 3 dan 7 hari. Analisis hubungan konsentrasi *xylitol* dengan jumlah koloni *C. albicans* diuji dengan *one-way* ANOVA dengan α 0,05.

