

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik.

4.2 Sumber Data

Sampel dalam penelitian ini adalah usapan (*swab*) dari lesi mukosa mulut subyek kasus, yaitu seorang pasien klinik Penyakit Mulut Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo, dengan kriteria inklusi:

- Penderita kandidiasis oral
- Menandatangani *informed consent*

Kriteria eksklusi:

- Daerah lesi telah dioles antifungal
- Telah mengonsumsi antifungal sistemik
- Menolak ikut penelitian

4.3 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Pengambilan sampel dilakukan di klinik Penyakit Mulut Rumah Sakit Umum Pusat Nasional Cipto Mangunkusumo, pada bulan Agustus 2008. Penelitian dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia, antara Agustus sampai Oktober 2008.

4.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat:

- Kaca mulut
- Alat sentrifugasi
- Inkubator
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Sengkelit

- Cawan petri
- Eppendorf *tube*
- Tips biru dan kuning
- Pipet Eppendorf
- *Water Bath*
- *Orbital Shaker*
- Timbangan Ohaus *Adventurer*
- Timbangan Ohaus *Explorer*
- Tabung Erlenmeyer
- Gelas Beker
- Lemari pendingin (*freezer* pada kulkas)
- Lemari pendingin -20°C
- Api Bunsen

Bahan:

- *C. albicans* isolat klinik (Klinik Penyakit Mulut RSUPNKM)
- *C. albicans strain* ATCC 10231 (Laboratorium Mikrobiologi FKUI)
- *Wooden cotton bud* (Departemen Penyakit Mulut FKG UI)
- *Container cotton bud* steril
- *CHROMagar* (Laboratorium Parasitologi FKUI)
- Sarung tangan dan masker steril
- *Phosphate Buffer Saline* (PBS)
- Akuades (Laboratorium Biologi Oral FKG UI)
- *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA dari Conda Lab, Pronadisa[®])
- *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB dari Conda Lab, Pronadisa[®])
- D-Glukosa (Merck Lab)
- *Fetal Bovine Serum* (Biowest, South America)

4.5 Variabel Penelitian

Variabel terikat: Jumlah koloni *C. albicans*

Variabel bebas: glukosa (0%, 1%, 5%, 10%) dan durasi (3 hari dan 7 hari)

4.6 Definisi Operasional

a. *C. albicans* isolat klinik

Spesies *C. albicans* yang dibiakkan dari usapan lesi mukosa mulut pasien (*oral swab*) yang terdiagnosis 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 ATCC 10231

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

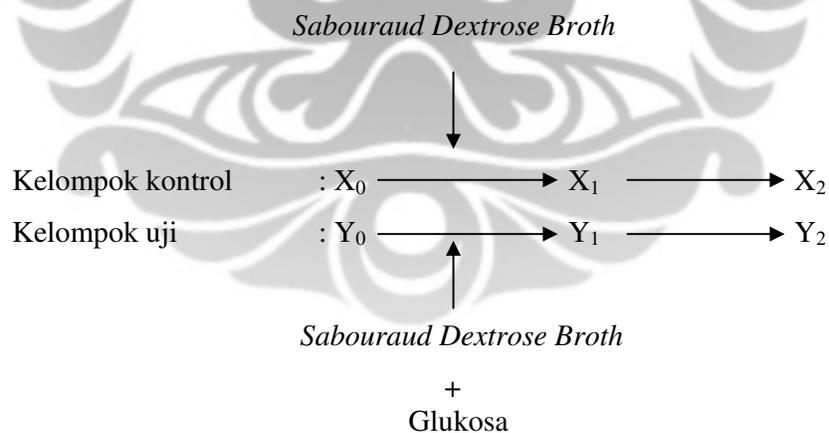
c. Pertumbuhan *C. albicans*

Banyaknya koloni *C. albicans* pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dengan satuan *Colony-Forming Unit* (CFU/ml).

d. Konsentrasi glukosa

Jumlah gram glukosa yang dilarutkan di dalam 100 ml akuades.

4.7 Desain Penelitian



Keterangan:

X₀ : *C. albicans* dikultur dalam *Sabouraud Dextrose Broth* murni tanpa glukosa

X₁ : Jumlah CFU *C. albicans* per ml setelah dikultur 3 hari dalam *Sabouraud Dextrose Broth*

- X_2 : Jumlah CFU *C.albicans* per ml setelah dikultur 7 hari dalam *Sabouraud Dextrose Broth*
- Y_0 : *C. albicans* dikultur dalam *Sabouraud Dextrose Broth* mengandung glukosa
- Y_1 : Jumlah CFU *C. albicans* per ml setelah dipaparkan glukosa dengan konsentrasi 1%, 5%, dan 10% dalam durasi 3 hari
- Y_2 : Jumlah CFU *C. albicans* per ml setelah dipaparkan glukosa dengan konsentrasi 1%, 5%, dan 10% dalam durasi 7 hari

4.8 Cara Kerja Penelitian

4.8.1 Pengambilan Sampel dari Subyek Penelitian

Wooden cotton bud steril disiapkan, dan dilengkapi dengan identitas pasien pada bagian *container*-nya. Kemudian dengan kaca mulut, daerah yang telah ditentukan (lesi kandidiasis oral) dibuka hingga terlihat jelas. Daerah tersebut diusap dengan usapan satu arah dengan sedikit penekanan tanpa melukai mukosa. *Wooden cotton bud* yang telah berisi spesimen dimasukkan ke *containe* yang telah diisi dengan 1 ml PBS, untuk dibawa ke laboratorium.

4.8.2 Identifikasi *C. albicans* dengan CHROMagar dan Serum

Siapkan media CHROMagar yang tersimpan dalam keadaan tidak terkena cahaya. Sampel usap subyek dari *wooden cotton bud* diulaskan di atas media CHROMagar. Kemudian sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 hari. Morfologi dan pigmentasi jamur uji diidentifikasi sesuai petunjuk pabrik pembuat CHROMagar (berwarna hijau).

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 *Fetal Bovine Serum* (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 sengkeli 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*. Pada *C. albicans strain* 10231 juga dilakukan hal yang sama untuk digunakan sebagai pembandingan untuk *C. albicans* isolat klinik. Koloni kedua *strain C. albicans* yang diidentifikasi positif baik pada CHROMagar maupun serum diambil dengan sengkeliit untuk masing-masing dibiak pada SDA miring.

4.8.3 Persiapan Media Perbenihan dalam Cawan Petri dan Tabung Reaksi Agar Miring

Selama CHROMagar berada di inkubator, dapat dilakukan persiapan untuk media SDA cawan petri dan tabung reaksi agar miring, yang akan digunakan pada saat CHROMagar dikeluarkan dari inkubator. Penghitungan jumlah kebutuhan media SDA cawan petri dan tabung reaksi yang akan digunakan selama penelitian. Dibutuhkan 34 cawan petri dan 1 tabung reaksi. Setiap cawan petri berisi 20 ml dan 1 tabung reaksi berisi 5 ml. Berarti total dibutuhkan 685 ml. 1 L SDA membutuhkan 65 gram bubuk SDA. Berarti untuk pembuatan 685 ml SDA dibutuhkan 44,525 gram bubuk SDA. Larutan SDA dipanaskan dan disterilisasi dalam otoklaf. Kemudian larutan SDA dituang ke dalam 34 cawan petri dan 1 tabung reaksi yang sudah disiapkan. Tabung reaksi lalu dimiringkan. Pendinginan yang ideal berlangsung sekitar 1 hari. Setelah mengeras keesokan harinya, 34 cawan petri ini disimpan di dalam lemari pendingin.

4.8.4 Kultur *C. albicans* Isolat Klinik dan *Strain* ATCC 10231 pada Tabung Reaksi Agar Miring

Setelah 2 hari, CHROMagar dikeluarkan dari inkubator. Isolat jamur diidentifikasi sesuai dengan morfologi dan pigmentasi koloni, menurut ketentuan yang ditetapkan pabrik pembuat CHROMagar yaitu *C. albicans* berwarna hijau muda. Setelah *C. albicans* teridentifikasi, diambil koloninya dengan sengkeliit, lalu dikultur pada tabung reaksi berisi SDA miring. Semua prosedur dilakukan di dekat api bunsen untuk menjaga kesterilan. Tabung reaksi diberi nama dan tanggal penanaman masing-masing untuk *C. albicans* isolat klinik dan *strain*

ATCC 10231. Pertumbuhan *C. albicans* dilakukan di dalam inkubator bersuhu 37°C selama 2 hari.

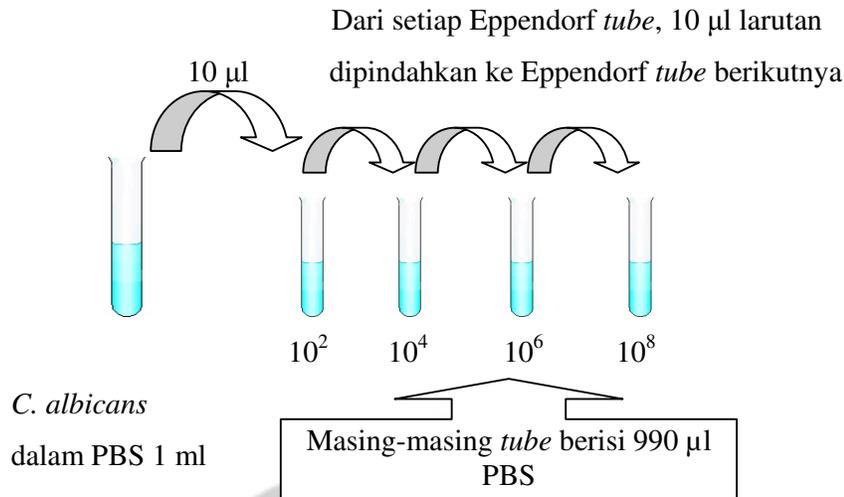
4.8.5 Pembuatan Larutan Glukosa 1%, 5%, dan 10% dalam SDB

Selama menunggu pertumbuhan *C. albicans* dalam SDA miring, dilakukan pembuatan larutan glukosa 1%, 5%, dan 10% untuk dipaparkan dengan *C. albicans*. Digunakan SDB agar *C. albicans* dapat tetap hidup selama 3 hari dan 7 hari pemaparan dengan glukosa di dalam Eppendorf *tube*. Disiapkan 20 ml larutan untuk masing-masing konsentrasi glukosa. Untuk larutan glukosa 1%, dibutuhkan 0,2 gram bubuk glukosa dilarutkan dengan 20 ml SDB. Untuk larutan glukosa 5%, dibutuhkan 1 gram bubuk glukosa dilarutkan dengan 20 ml SDB. Dan untuk larutan glukosa 10%, dibutuhkan 2 gram bubuk glukosa dilarutkan dengan 20 ml SDB. Untuk kontrol (0%) hanya dibutuhkan 20 ml SDB. Total keperluan SDB adalah 80 ml.

4.8.6 Penghitungan CFU/ml *C. albicans* sebelum Dipaparkan Glukosa

Semua alat dan bahan untuk pengenceran dan pemaparan glukosa disiapkan. Disiapkan Eppendorf *tube* dan larutan PBS untuk keperluan pengenceran, 2 cawan petri untuk penanaman *C. albicans*, serta tips biru dan kuning untuk keperluan *pipeting*.

Setelah 2 hari diinkubasi pada SDA miring, seluruh koloni *C. albicans* diambil dengan sengkeli dari tabung reaksi, lalu dimasukkan ke dalam Eppendorf *tube*. Eppendorf *tube* ini disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 10.000 rpm dan suhu sekitar 28°C. Supernatan dibuang, lalu PBS ditambahkan ke Eppendorf *tube* yang berisi pelet, sampai volumenya 1 ml. Setelah itu dilakukan homogenisasi, kemudian diambil 10 µl dari Eppendorf *tube* pertama, lalu dimasukkan ke dalam Eppendorf *tube*, lalu dihomogenisasi sehingga diperoleh pengenceran 10² kali. Prosedur yang sama dilakukan sampai pengenceran 10⁸ kali didapat. Ilustrasinya sebagai berikut:



Gambar 4.1. Skema Pengenceran untuk Perhitungan Koloni *C. albicans*

Dari Eppendorf *tube* terakhir (10^8 kali), diambil masing-masing 10 μ l untuk ditanam ke SDA cawan petri secara duplo untuk mendapatkan hasil rata-rata dari pertumbuhan *C. albicans*. Kedua cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C , penghitungan dilakukan 2 hari kemudian. Semua prosedur dilakukan di dekat api Bunsen untuk menjamin kesterilannya.

4.8.7 Pemaparan *C. albicans* Isolat Klinik dan *C. albicans* Strain ATCC 10231 dengan Glukosa

Disiapkan 16 Eppendorf *tube* yang ditutup dengan kapas steril, masing-masing ditandai dengan ke 4 konsentrasi glukosa (kontrol, 1%; 5%; dan 10%) dan 2 durasi pemaparan (3 dan 7 hari). Lalu tiap Eppendorf *tube* diisi dengan larutan glukosa dan SDB sesuai dengan konsentrasinya, sebanyak 990 μ l. Kemudian Eppendorf *tube* dengan pengenceran 10^6 dari prosedur pengenceran diatas digunakan untuk pemaparan glukosa, sehingga hasil akhirnya adalah pengenceran 10^8 kali. Eppendorf *tube* 10^6 ini dihomogenisasi kembali, lalu diambil 10 μ l sebanyak 8 kali untuk dimasukkan ke dalam 8 Eppendorf *tube* bertutup kapas yang sudah berisi glukosa. Kedelapan Eppendorf *tube* ini disimpan di dalam suhu kamar.

Prosedur yang sama seperti diatas dilakukan pada 8 Eppendorf *tube* lainnya untuk pemaparan glukosa (kontrol, 1%, 5%, dan 10%) dengan 2 durasi pemaparan (3 dan 7 hari) pada *C. albicans strain* ATCC 10231.

4.8.8 Perhitungan Jumlah Koloni pasca Pemaparan Glukosa

C. albicans isolat klinik dan *strain* ATCC 10231 yang telah dipaparkan dengan glukosa selama 3 dan 7 hari kemudian disenrifugasi untuk didapatkan peletnya. Setelah didapatkan pelet, kemudian pelet tersebut ditambahkan PBS sampai volumenya 1 ml dalam Eppendorf *tube*. Kemudian dari Eppendorf *tube* tersebut diambil 10 μ l secara duplo untuk ditanam di SDA selama 2 hari. Setelah 2 hari, dihitung koloni *C. albicans* yang tumbuh. Hitung dan catat jumlah koloni *C. albicans* setiap cawan.

4.9 Analisis Data

Data-data yang dihasilkan pada penelitian ini kemudian dianalisis dengan uji Shapiro-Wilk (karena ukuran sampel yang digunakan kecil) yaitu salah satu uji yang bertujuan melihat apakah suatu data mengikuti distribusi normal atau tidak. Selanjutnya akan diuji kesamaan variansi data menggunakan Levene-test. Karena data mengikuti distribusi normal dan memiliki variansi yang relatif sama maka dapat dilakukan uji statistika parametrik, yaitu analisis ANOVA dua arah.

4.10 Alur Penelitian

