

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratorik yang dilakukan secara *in vitro*.

4.2 Sampel Penelitian dan Bahan Uji

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sediaan *Candida albicans* ATCC 10231 yang didapatkan dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Sedangkan bahan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kitosan yang berasal dari Institut Pertanian Bogor (IPB).

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dari bulan November 2008 sampai Desember 2008.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Kitosan dengan konsentrasi 0,1%, 0,25%, 0,5% dan 0,1%.

4.4.2 Variabel Terikat

Jumlah koloni *Candida albicans* dalam media kultur.

4.5 Definisi Operasional

4.5.1 Jamur uji

C. albicans yang digunakan didapat dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jamur ditanam dalam agar miring *Sabouraud Dextrose*, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37⁰C.

4.5.2 Kitosan

Glukosamin yang berkaitan dengan polimer β -1, 4, merupakan derivat kitin yang terdeasetilasi. Dalam penelitian ini digunakan kitosan dalam bentuk bubuk yang berasal dari IPB (Institut Pertanian Bogor) dengan derajat deasetilasi 80,45%.⁽⁵⁰⁾

4.5.3 Asam Asetat

Asam karboksilat sederhana yang digunakan sebagai pelarut kitosan. Dalam penelitian ini, digunakan asam asetat 1%.

4.5.4 Colony Forming Unit (CFU)

Merupakan ukuran untuk menyatakan jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dalam cawan petri⁽⁵¹⁾. Dalam penelitian ini, koloni jamur akan dihitung secara klinis dengan satuan CFU/mL.

4.5.5 Sabouraud Dekstrose Agar (SDA)

Media pertumbuhan *Candida albicans* dalam bentuk agar, merk Pronadisa dengan komposisi 40 g/L dekstrosa, 10g/L pepton, dan 15g/L *bacteriological agar* (agar bakteriologis).

4.5.6 Sabouraud Dekstrose Broth (SDB)

Media pertumbuhan *Candida albicans* dalam bentuk cair, merk Pronadisa dengan komposisi 20g/L dekstrosa dan 10g/L pepton.

4.5.7 Phosphate Buffered Saline (PBS)

Larutan isotonis yang sering digunakan dalam penelitian biologis; mengandung natrium klorida, natrium fosfat, kalium klorida, dan kalium fosfat. Dalam penelitian ini, PBS digunakan dalam pembuatan suspensi *Candida albicans*.

4.6 Alat, Bahan, dan Cara Kerja

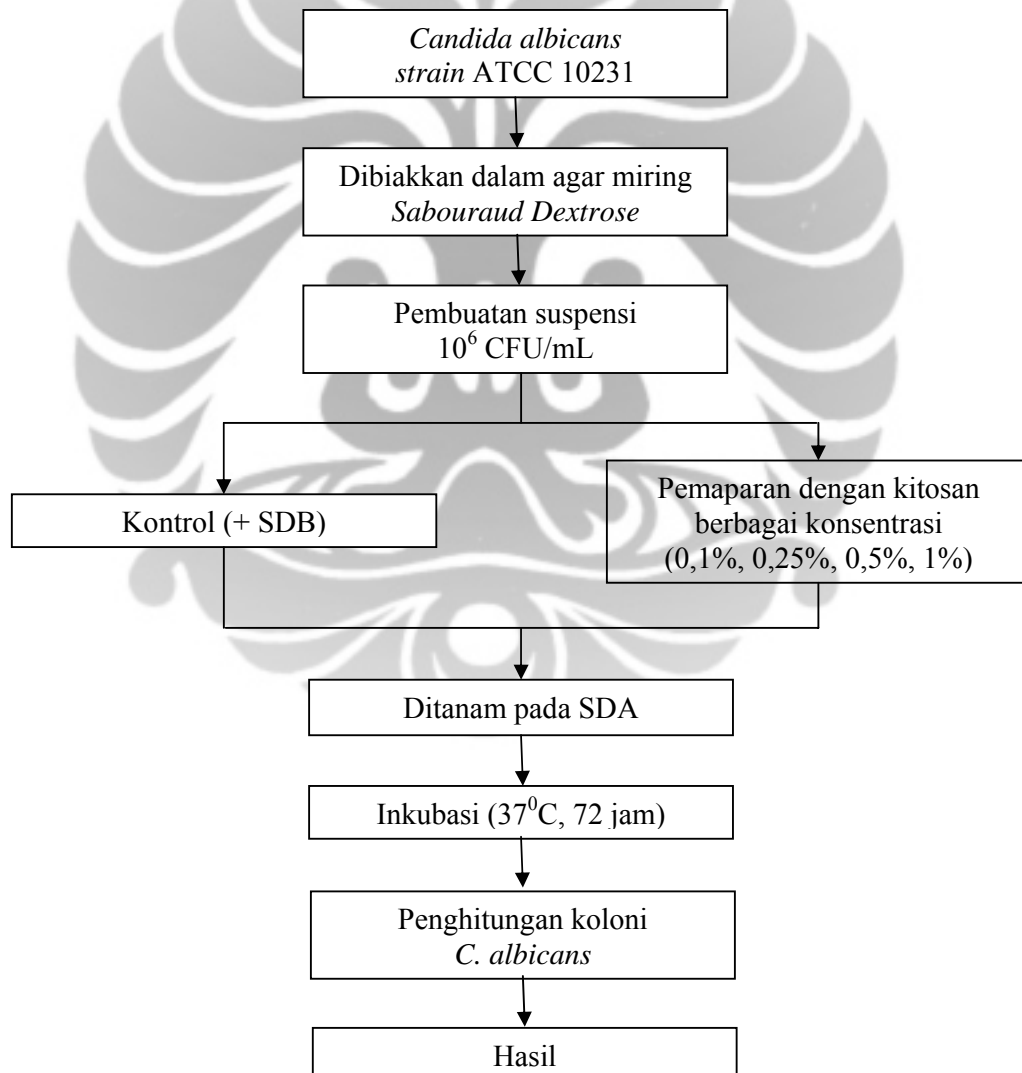
4.6.1 Alat

1. Pipet Pasteur
2. Pipet Eppendorf 1-10 μL
3. Pipet Eppendorf 100-1.000 μL
4. Tips 10 μL
5. Tips 1.000 μL
6. Eppendorf Tube
7. Petri Disk
8. Baken Glass
9. Labu Erlenmeyer
10. Tabung reaksi
11. Gelas ukur
12. Kapas
13. Aluminium foil
14. Bunsen
15. Sengkelit
16. Spreader
17. Timer
18. Centrifuge (Legend RT, Sorvall)
19. Lemari pendingin
20. Ruang laminar/Cabinet (ESCO Micro PTE LTD.)
21. Inkubator (Inco 2, Memmert)
22. Neraca
23. Rotary Shaker
24. Water bath
25. Microscope cahaya (Olympus Tokyo)
26. Label
27. Marker
28. Penggaris
29. Rak Tube

4.6.2 Bahan

1. *Sabouraud Dektrose Agar* (SDA)
2. *Sabouraud Dektrose Broth* (SDB)
3. Asam asetat 1%
4. PBS 10%
5. Ethanol 95%
6. Kitosan
7. *Aqua Bidestilata*
8. *Candida albicans* ATCC 10231

4.6.3 Alur Penelitian



Universitas Indonesia

4.6.4 Cara Kerja

4.6.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Tips, *tube Eppendorf*, dan PBS di sterilisasi dengan otoklaf pada suhu 121⁰C selama 20 menit.

b. Pembuatan Medium Kultur

Medium perbenihan *Candida albicans* yang digunakan adalah SDA dan SDB. Pembuatannya sebagai berikut:

- Campur 19,5 g bubuk SDA dengan 300 mL *Aqua Bidestilata* (takaran sesuai petunjuk)
- Campur 266,5 mg bubuk SDB dengan 4100 μ L *Aqua Bidestilata* (takaran sesuai petunjuk)
- SDA dan SDB disterilisasi dan dipanaskan dengan otoklaf 121⁰C, dibiarkan mendingin hingga suhu 50⁰C
- Tuang SDA ke dalam beberapa cawan petri, SDB disimpan dalam lemari pendingin

c. Pengenceran Asam Asetat

Cara pembuatan asam asetat 1%:

- Campur 10 μ L asam asetat 100% dengan 990 μ L *Aqua Bidestilata* (sesuai dengan rumus pengenceran $\rightarrow C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$)
- Homogenisasi
- Tutup dengan kapas

d. Pembuatan Larutan Induk Kitosan

Jumlah larutan induk kitosan 2% yang diperlukan sebanyak 925 μ L, dibuat dengan cara:

- Bubuk kitosan sebanyak 18,5 mg dilarutkan dalam 925 μ L asam asetat 1%
- Homogenisasi dengan menggunakan *vortex mixer* dan *vortex epis*

e. Pembuatan Larutan Kitosan dengan Berbagai Konsentrasi

Larutan kitosan dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,1% dibuat dengan cara mencampurkan larutan induk kitosan 2% dengan SDB.

- Larutan kitosan 1%: 500 μ L larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 500 μ L SDB
- Larutan kitosan 0.5%: 250 μ L larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 750 μ L SDB
- Larutan kitosan 0.25%: 125 μ L larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 875 μ L SDB
- Larutan kitosan 0.1%: 50 μ L larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 950 μ L SDB
- Semua larutan kitosan yang telah dibuat, dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex mixer* dan *vortex epis*.

4.6.4.2 Pengenceran *Candida albicans*

Untuk setiap perlakuan dibutuhkan jumlah *Candida albicans* yang sama, sehingga perlu dilakukan pengenceran *Candida albicans* yang telah dibiakkan pada SDA.

Pengenceran dilakukan dengan cara:

- Ambil 3 sengkeli *Candida albicans* dari sediaan SDA
- Masukkan ke dalam 1 mL larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dalam *tube Eppendorf A*
- Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit
- Buang larutan *supernatant*
- Tambahkan PBS hingga 1 mL
- Homogenisasi dengan menggunakan *vortex mixer* dan *vortex epis*
- Untuk mendapatkan larutan *Candida albicans* 10^2 , ambil 10 μ L dari *tube Eppendorf A*, masukkan ke dalam *tube Eppendorf B* yang berisi 990 μ L PBS dan dihomogenisasi
- Lakukan tahap di atas hingga didapatkan larutan *Candida albicans* 10^6

4.6.4.3 Pemaparan *Candida albicans* dengan Larutan Kitosan dan Penghitungan Jumlah Koloni⁽⁵²⁾

- Siapkan 5 *tube Eppendorf* yang masing-masing berisi:
 - Larutan kitosan A, dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,1% sebanyak 990 μ L
 - Kontrol, yang berisi 990 μ L SDB
- Ke dalam semua *tube Eppendorf*, masukkan masing-masing 10 μ L larutan *Candida albicans*
- Tutup *tube Eppendorf* dengan kapas, kocok pada suhu 37⁰ C selama 3 jam di dalam penangas air, kemudian kocok selama 6 jam dalam *rotary shaker*.⁽⁵²⁾
- Sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit
- Buang larutan *supernatant*
- Tambahkan PBS hingga 1 mL pada setiap *tube Eppendorf*
- Homogenisasi
- Ambil 30 μ L dari setiap *tube Eppendorf* untuk dibiakkan pada 3 petri disk (10 μ L pada setiap disk)
- Inkubasi dengan suhu 37⁰ selama 3 hari
- Hitung koloni pada hari ke-3

4.7 Analisis Data

Uji yang digunakan untuk menganalisis data-data yang telah didapatkan dari hasil penelitian meliputi uji Shapiro Wilk, uji Varians Levene's, uji One Way ANOVA dan Post Hoc. Untuk menguji normalitas sebaran data dengan jumlah sampel yang kecil, digunakan uji Shapiro Wilk. Selanjutnya, digunakan uji Varians Levene's untuk menguji homogenitas data. Uji One Way ANOVA dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna pada beberapa kelompok data. Uji Post Hoc dilakukan untuk menguji kemaknaan antara dua kelompok data secara spesifik.⁽⁵³⁾

4.8 Uji Lolos Etik

Penelitian yang dilakukan telah dinyatakan lolos etik berdasarkan Surat Keterangan Lolos Etik Nomor: 35/Ethical Clearance/FKGUI/XI/2008