

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 3 jenis kitosan yang didapatkan dari Institut Pertanian Bogor (IPB), Universitas Sumatra Utara (USU), dan Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN).

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 berbagai deasetilasi

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 3 jenis kitosan, yaitu:

1. Kitosan yang berasal dari Institut Pertanian Bogor (IPB) dengan derajat deasetilasi 80,45%⁽⁴⁴⁾, yang selanjutnya akan disebut sebagai kitosan A.
2. Kitosan yang berasal dari Universitas Sumatra Utara (USU), yang selanjutnya akan disebut sebagai kitosan B.
3. Kitosan yang berasal dari Badan Tenaga Nuklir Nasional (BATAN) dengan derajat deasetilasi 72-82%, berat molekul 7-8kDa, kadar air < 10%, kelarutan dalam asam asetat 1% adalah 0,02g/mL⁽⁴⁵⁾, selanjutnya akan disebut sebagai kitosan C.

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.⁽⁴⁶⁾ Dalam penelitian ini, koloni jamur akan dihitung secara klinis dengan satuan CFU/mL.

4.5.5 Sabouraud Dextrose 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 *Saboraud 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

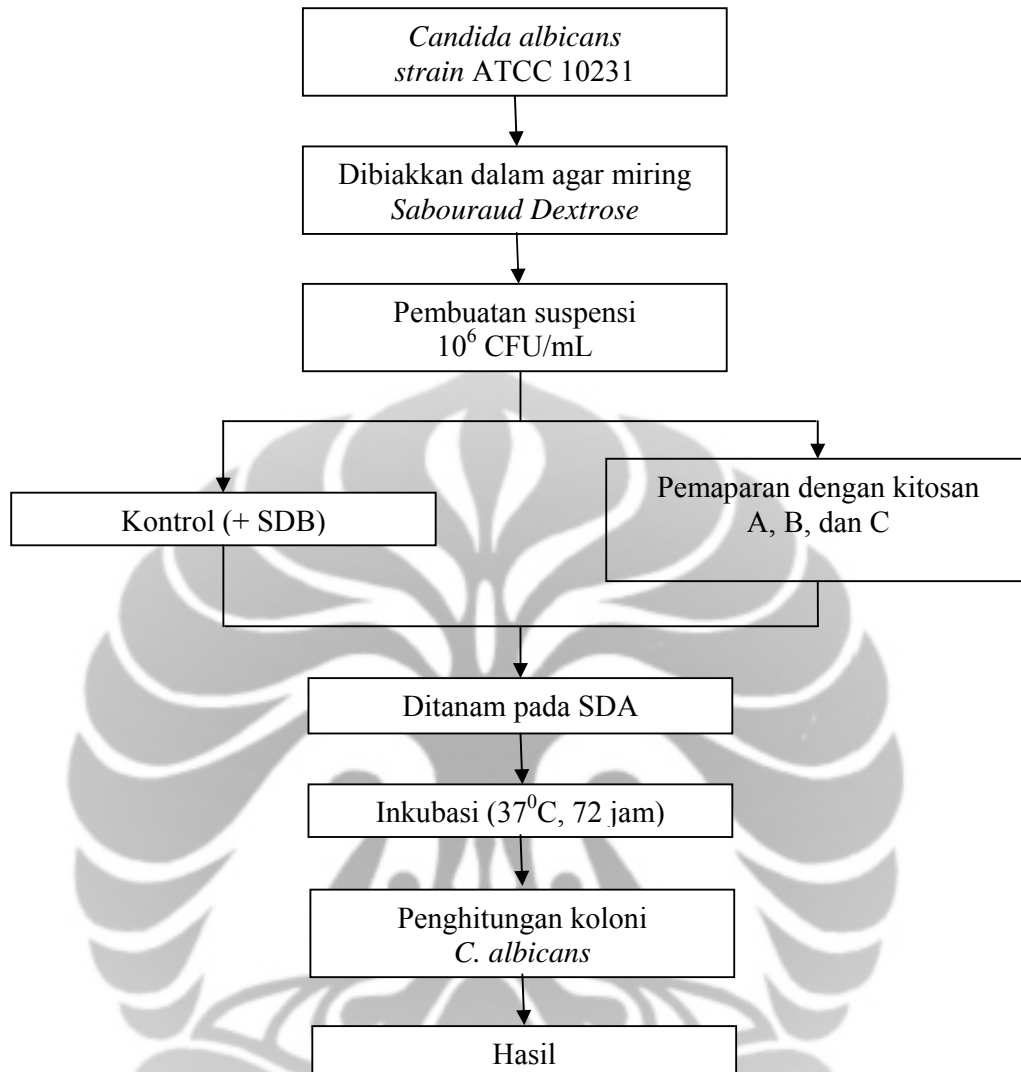
1. Pipet Pasteur
2. Pipet Eppendorf 1-10 μL
3. Pipet Eppendorf 100-1.000 μL
4. Tips 10 μL
5. Tips 1.000 μL
6. Eppendorf Tube
7. Petri Disk
8. Baken Glass
9. Labu Erlenmeyer
10. Tabung reaksi
11. Gelas ukur
12. Kapas
13. Aluminium foil
14. Bunsen
15. Sengkelit
16. Spreader
17. Timer
18. Centrifuge (Legend 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 Dekstrose Agar* (SDA)
2. *Sabouraud Dekstrose Broth* (SDB)
3. Asam asetat 1%
4. PBS 10%
5. Ethanol 95%
6. Kitosan A (Bubuk)
7. Kitosan B (Bubuk)
8. Kitosan C (Bubuk)
9. *Aqua Bidestilata*
10. *Candida albicans* ATCC 10231

4.6.3 Alur Penelitian



4.6.4 Cara Kerja

4.6.4.1 Persiapan Alat dan Bahan

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Tips, *tube Eppendorf*, dan PBS disterilisasi 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 52 g bubuk SDA dengan 800 mL *Aqua Bidestilata* (takaran sesuai petunjuk)
- Campur 422,5 mg bubuk SDB dengan 6500 μL *Aqua Bidestilata* (takaran sesuai petunjuk)
- SDA dan SDB disterilisasi dan dipanaskan dengan otoklaf 121°C , dibiarkan mendingin hingga suhu 50°C
- Tuang SDA ke dalam beberapa cawan petri, SDB disimpan dalam lemari pendingin

c. Pengenceran Asam Asetat

Cara pembuatan asam asetat 1%:

- Campur 28 μL asam asetat 100% dengan 2772 μL *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 μL , dibuat dengan cara:

- Bubuk kitosan A, B, dan C, masing-masing sebanyak 18,5 mg dilarutkan dalam 925 μL asam asetat 1%
- Homogenisasi dengan menggunakan *vortex mixer* dan *vortex epis*

e. Pembuatan Larutan Kitosan dengan Berbagai Konsentrasi

Larutan kitosan A, B, dan C masing-masing dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,1% dibuat dengan cara mencampurkan larutan induk kitosan 2% dengan SDB.

- Larutan kitosan 1%: 500 μL larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 500 μL SDB

- Larutan kitosan 0.5%: 250 μL larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 750 μL SDB
- Larutan kitosan 0.25%: 125 μL larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 875 μL SDB
- Larutan kitosan 0.1%: 50 μL larutan induk kitosan 2% dicampur dengan 950 μL 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 μL dari *tube Eppendorf A*, masukkan ke dalam *tube Eppendorf B* yang berisi 990 μL 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

- Siapkan 13 *tube Eppendorf* yang masing-masing berisi:
 - Larutan kitosan A, dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,1% sebanyak 990 μL

- Larutan kitosan B, dengan konsentrasi 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,1% sebanyak 990 μ L
- Larutan kitosan C, 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*⁽⁴⁷⁾.
- 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 Saphiro 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⁽¹⁴⁾.

4.8 Uji Lolos Etik

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