

## BAB 4

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian ekperimental secara *in vitro* dengan *post test only control group design* untuk menguji pengaruh efek antifungi berbagai konsentrasi *whhey kefir* susu kambing terhadap adesi *C. albicans* pada akrilik.

Pengulangan dirancang dengan rumus sebagai berikut (Solimun, 2001):

$$(p-1) (n-1) \geq 15$$

$$6-1 (n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$6n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan:

p = Jumlah perlakuan (0, 50, 100, 150, 200, 250  $\mu$ L/ml)

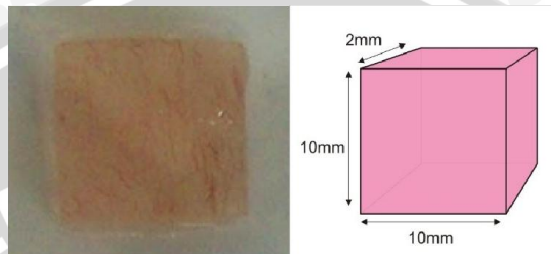
n = Jumlah pengulangan yang diperlukan

Jadi pada penelitian ini akan diberikan 6 macam perlakuan dan 4 kali pengulangan.

#### 4.2. Sampel Penelitian

Sampel untuk penelitian ini adalah jamur *C. albicans* dan lempeng akrilik *heat cured. C. albicans* yang digunakan adalah No. Reg. 91 Spt. Diperoleh dari isolat sputum penderita kandidiasis sistemik di RSSA Malang, yang telah diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Akrilik *heat cured* yang digunakan dalam penelitian ini berbentuk balok dengan kriteria ukuran 10 x 10 x 2 mm (Kumar *et al.*, 2011), sebanyak 24 buah, dengan permukaan yang halus, datar, rata, tidak porus dan warna homogen.



**Gambar 4.1** Lempeng akrilik

#### **4.3. Variabel Penelitian**

##### **4.3.1. Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi *whey kefir* susu kambing yang dibuat bervariasi. Dibuat 6 macam konsentrasi yaitu 0 $\mu$ L/ml (kontrol positif), 50 $\mu$ L/ml, 100 $\mu$ L/ml, 150  $\mu$ L/ml dan 200  $\mu$ L/ml dan 250  $\mu$ L/ml yang telah ditentukan berdasarkan penelitian terdahulu (lampiran 1).

##### **4.3.2. Variabel Tergantung**

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah sel *C. albicans* yang menempel pada permukaan lempeng akrilik setelah perlakuan.

#### **4.4. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Peternakan, laboratorium LSIH Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret 2014 sampai bulan Juni 2014.

#### **4.5. Alat dan Bahan Penelitian**

##### **4.5.1 Alat dan Bahan untuk pembuatan *Whey Kefir***

Kefir susu kambing diperoleh dari produksi perusahaan kefir rumah tangga (Koperasi Murni Sejahtera) di Desa Ampelgading Kabupaten Malang. Pengambilan *whey* dari kefir susu kambing yaitu dengan dihangatkan pada suhu 37°C, kemudian disentrifugasi pada 2500rpm, selama 15 menit (Radiati *et al.*, 2012), supernatan yang diperoleh disaring dengan milipore (0,20  $\mu$ M) dan kemudian dipasteurisasi, sehingga diperoleh *whey* kefir yang steril.

##### **4.5.2. Alat dan Bahan Untuk Identifikasi Fungi dan Pewarnaan Gram**

Bahan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB dilakukan Identifikasi *germinating tube*, Alkohol 70%, alkohol 95%, kristal violet, lugol, safranin, aquadest, minyak emersi, kertas pengisap, media Sabouraud dektrosa, kapas dan kertas saring.

##### **4.5.3. Alat dan Bahan Untuk Pembuatan Material Akrilik**

Master model dari stainless steel bentuk balok dengan panjang 150 mm, lebar 10 mm dan tebal 2 mm, pot porselen, kuvet besar, vibrator, mangkok karet, spatula, *hydraulic bench press*, pres besar, pisau malam, pisau gips, pisau model, penggaris dan kuas.

Resin akrilik *heat cured* (merk: QC-20), bahan separasi (Could mould seal), gips tipe 3, gips tipe 2, akuades steril, vaselin, kertas gosok no.400 dan 600, *pumice*.



#### 4.6 Definisi Operasional

- a. Bibit kefir merupakan matriks yang terdiri atas bakteri asam laktat dan khamir yang diikat oleh polisakarida dan komponen metabolik yang lain (enzim dan protein) (Radiati, dkk.,2012)
- b. Kefir susu kambing adalah susu kambing yang difermentasi dengan bibit kefir.
- c. Isolat *C. albicans* adalah jamur yang berasal dari sputum penderita dengan kode isolat No. Reg. 91 yang ditanam pada agar miring SDA.
- d. Standar kepadatan *C. albicans* adalah jumlah kandida per ml sampel yang digunakan dalam percobaan dengan standar  $10^5$  CFU/ml (Feldeman *et al.*, 2012).
- e. *MIAC* adalah *Minimal Inhibitory Adherence Concentration* yaitu konsentrasi minimal (pengenceran tertinggi) yang memberikan 50% penghambatan adhesi *C. albicans* pada akrilik.
- f. SEM adalah Scaning Electron Microscope yaitu tipe mikroskop elektron yang memproduksi gambar sampel dengan memindai melalui sinar elektron terfokus.

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Tahap dalam prosedur penelitian ini adalah: persiapan *whey kefir* susu kambing, persiapan lempeng akrilik *heat cured*, persiapan suspensi *C. albicans*, pengamatan mikroskopis yang meliputi identifikasi fungi dengan teknik pewarnaan gram dan uji aktivitas penghambatan adhesi.

#### 4.7.1 Pembuatan Sampel Lempeng Akrilik *Heat Cured*

##### a. Persiapan *mould* untuk pembuatan sampel

Disediakan *master* model yang terbuat dari stainless steel bentuk balok dengan panjang 150 mm, lebar 10 mm, dan tebal 2 mm. Gips tipe 2 dengan perbandingan air : bubuk = 50 ml : 100 gram (McCabe, 2008). Pertama dilakukan penanaman *master* tersebut dalam kuvet dengan menggunakan gips tipe 3 dengan perbandingan 100 gr bubuk dengan 30 ml air. Gips diaduk selama 30 menit kemudia dimasukkan kedalam kuvet dan diletakkan diatas *vibrator*. Setelah terisi penuh, *master* tadi diolesi *vaselin* kemudian ditanam dalam kuvet yaitu  $\frac{1}{2}$  dari kuvet sebanyak 5 buah untuk masing masing kuvet, lalu ditunggu sampai *setting*. Setelah mengeras permukaan gips dihaluskan dengan kertas gosok sampai halus, kemudian diolesi *vaselin* sampai merata. Selanjutnya dilakukan pengisian kuvet lawan dengan menggunakan gips tipe 3 dan dilakukan pengepresan dengan *hydrolic bench press*, ditunggu sampai *setting*. Kemudian dilakukan pembukaan kuvet dengan pisau gips, *master* dilepaskan dari kuvet dan permukaan gips dibersihkan dari *vaselin* dengan mengalirkan air panas. Setelah kuvet dingin permukaan gips diulas dengan *could mould seal* secara merata dan ditunggu sampai kering.

##### b. Pembuatan sampel resin akrilik

Pengisian resin akrilik menggunakan perbandingan *powder* dan *liquid* sesuai anjuran pabrik yaitu 4,8 gr dengan 2 ml (merk: QC-20). Pengadukan dilakukan pada pot porselen, setelah mencapai fase *dough stage* adonan akrilik tersebut dimasukkan ke dalam kuvet dan dilakukan pengepresan agar

kelebihan akrilik dapat mengalir keluar. Kuvet dibuka dan kelebihan akrilik dipotong menggunakan pisau malam atau pisau model. Selanjutnya kuvet ditutup kembali dan dilakukan pengepresan. Kuvet dipindahkan ke dalam *press* dan dilakukan proses *curing* yang diawali perebusan air dengan suhu kamar hingga mendidih  $\pm$  30 menit. Kemudian kuvet dimasukkan selama 20 menit. Resin akrilik memerlukan waktu selama 20 menit untuk proses polimerisasi (Anusavice, 2003). Kemudian api dimatikan dan dibiarkan sampai mendingin (suhu kamar). Selanjutnya sampel dikeluarkan dari kuvet dan dilakukan pemotongan panjang menjadi berukuran 10 x 10 x 2 mm kemudian dilakukan pemolesan menggunakan amplas No 400 dan 600 di bawah air mengalir. Setelah itu menggunakan macam macam stone untuk menghaluskan dan untuk mengkilapkan menggunakan mesin pemoles dengan *pumice* untuk menghaluskan dan *kryte* untuk mengkilapkan.

#### 4.7.2 Persiapan *Whey* Kefir Susu Kambing dan Suspensi *C. albicans*

Persiapan kefir susu kambing disentrifugasi selama 15 menit. Diambil bagian supernatannya kemudian dipasteurisasi (sediaan *whey* steril). Persiapan akrilik dengan menyeterilkan dalam *autoclaf* selama 15 menit. Persiapan suspensi *C. albicans* dengan mengidentifikasi terlebih dahulu suspensi yang didapat kemudian membuat sediaan  $10^5$  CFU/ml dalam *Sabouraud Dextrose*.



#### 4.7.3 Pemeriksaan Mikroskopis

Pengamatan mikroskopis meliputi identifikasi fungi dan uji aktivitas penghambatan adhesi. Tahapan dalam melakukan identifikasi kandida dilakukan sebagai berikut:

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan diatas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.
2. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas obyek ditambah sedikit biakan *C. albicans* yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas obyek dan diratakan.
3. Sediaan diangin-anginkan, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan diatas api. Kemudian ditetesi dengan kristal violet selama satu menit sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
4. Sediaan ditetesi dengan lugol selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
5. Sediaan ditetesi dengan alkohol 95% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Sediaan ditetesi safranin selama setengah menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
8. Sediaan dilihat dibawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 100x.
9. Hasil positif: *C. albicans* tercat ungu (gram positif).

Tahapan melakukan uji adhesi:

1. Lempeng akrilik *heat cured* dikeluarkan dari tabung.
2. Lempeng akrilik *heat cured* dicuci lembut sebanyak 2 kali menggunakan NaCl fisiologis.
3. Lempeng akrilik *heat cured* diangin-anginkan.
4. Lempeng akrilik *heat cured* ditetaskan larutan kristal violet dan didiamkan selama 1 menit.
5. Lempeng akrilik *heat cured* dicuci dengan air mengalir secara perlahan sampai cat tercuci semua, keringkan dengan di angin-anginkan.
6. Lempeng akrilik *heat cured* ditetesi oleh larutan iodium dan didiamkan selama 1 menit, kemudian cuci dengan air mengalir lalu dikeringkan.
7. Melunturkan dengan larutan alkohol selama 30 menit dan langsung dicuci dengan air mengalir kemudian mengering anginkan.
8. Meneteskan larutan safranin dan membiarkan selama 2 menit, cuci dengan air mengalir dan anginkan.
9. Letakkan Lempeng akrilik *heat cured* pada gelas objek dan siap dilakukan pengamatan.

#### **4.7.4 Uji Pengaruh Whey Kefir Terhadap Adhesi *C. albican* Pada Lempeng Akrilik Heat Cured**

1. Lempeng akrilik *heat cured* yang masuk dalam kriteria penilaian ini adalah Lempeng akrilik *heat cured* yang berukuran (10x10x2 mm) direndam kemudian



dicuci dengan NaCl 0,85% dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2. Kultur *C. albicans* yang digunakan  $10^5$  CFU/ml
3. Percobaan dilakukan sebanyak (6 x 4 tabung reaksi), masing-masing berisi lempeng akrilik *heat cured* secara berurutan ditambahkan *whey* (0, 50, 100, 150, 200 dan 250  $\mu$ L/ml), dan dimasukkan satu ml suspensi *C. albicans* ( $10^5$  CFU/ml), kemudian inkubasi pada suhu 37° C selama 2 jam (Karaagaciloglu *et al.*,2008),
4. Dicuci dengan NaCl sebanyak 2 kali, ditetesi larutan identifikasi gram, dikeringkan dan kemudian pengamatan dapat dilakukan pada sel-sel *C. albicans* yang beradesi pada akrilik.

#### 4.8 Alur Kerja Penelitian

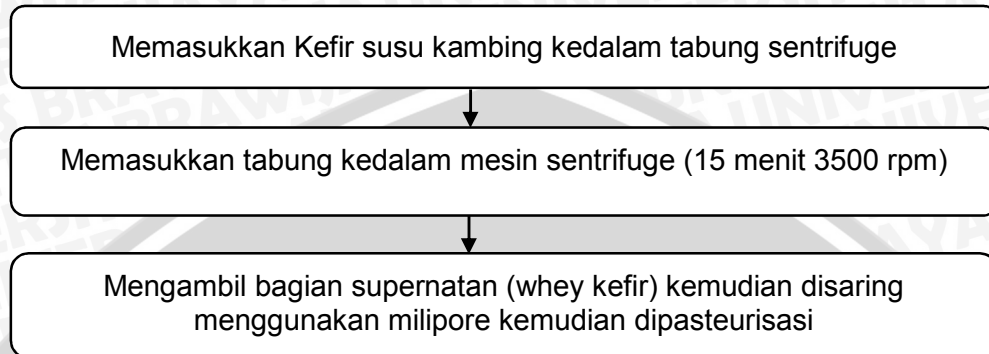
##### 4.8.1 Persiapan *C. albicans*

Dilakukan uji germinating tube pengamatan dibawah mikroskop

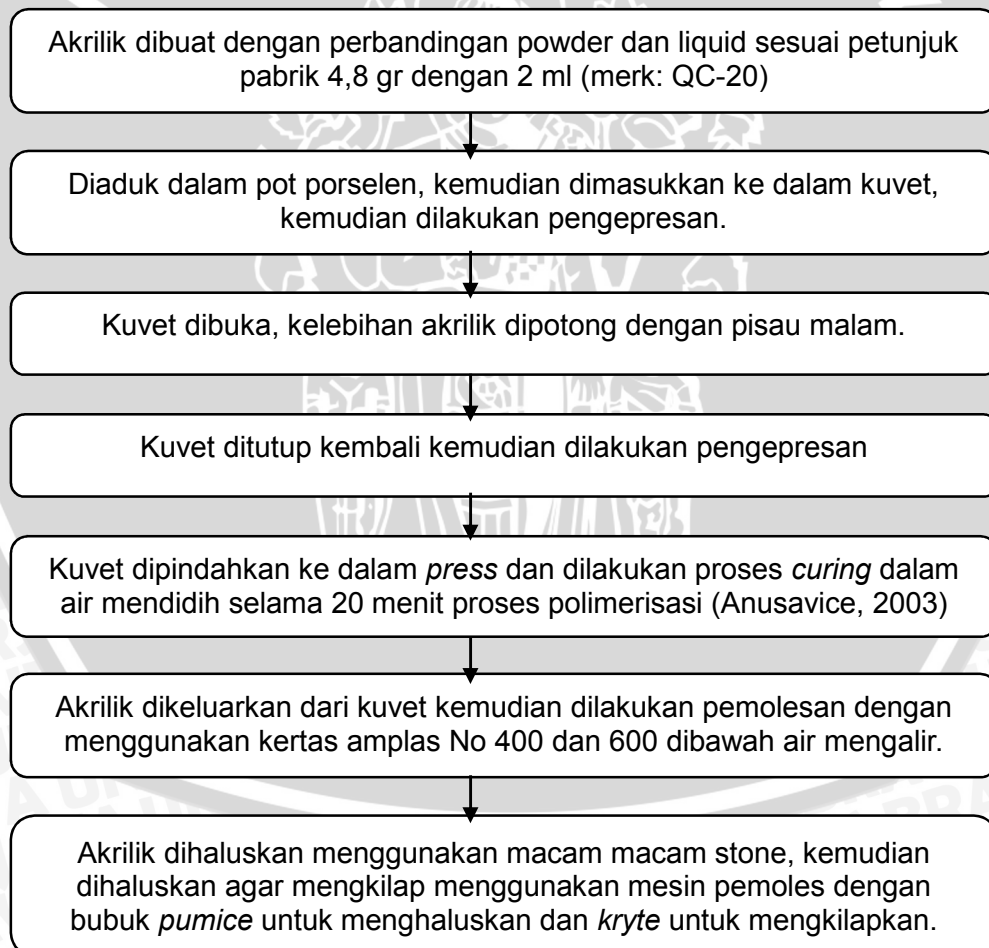
Identifikasi dengan tes pewarnaan gram. (Hasil positif: *C. albicans* berwarna ungu).

Pembuatan suspensi *C. albicans*  $10^5$  CFU/ml.

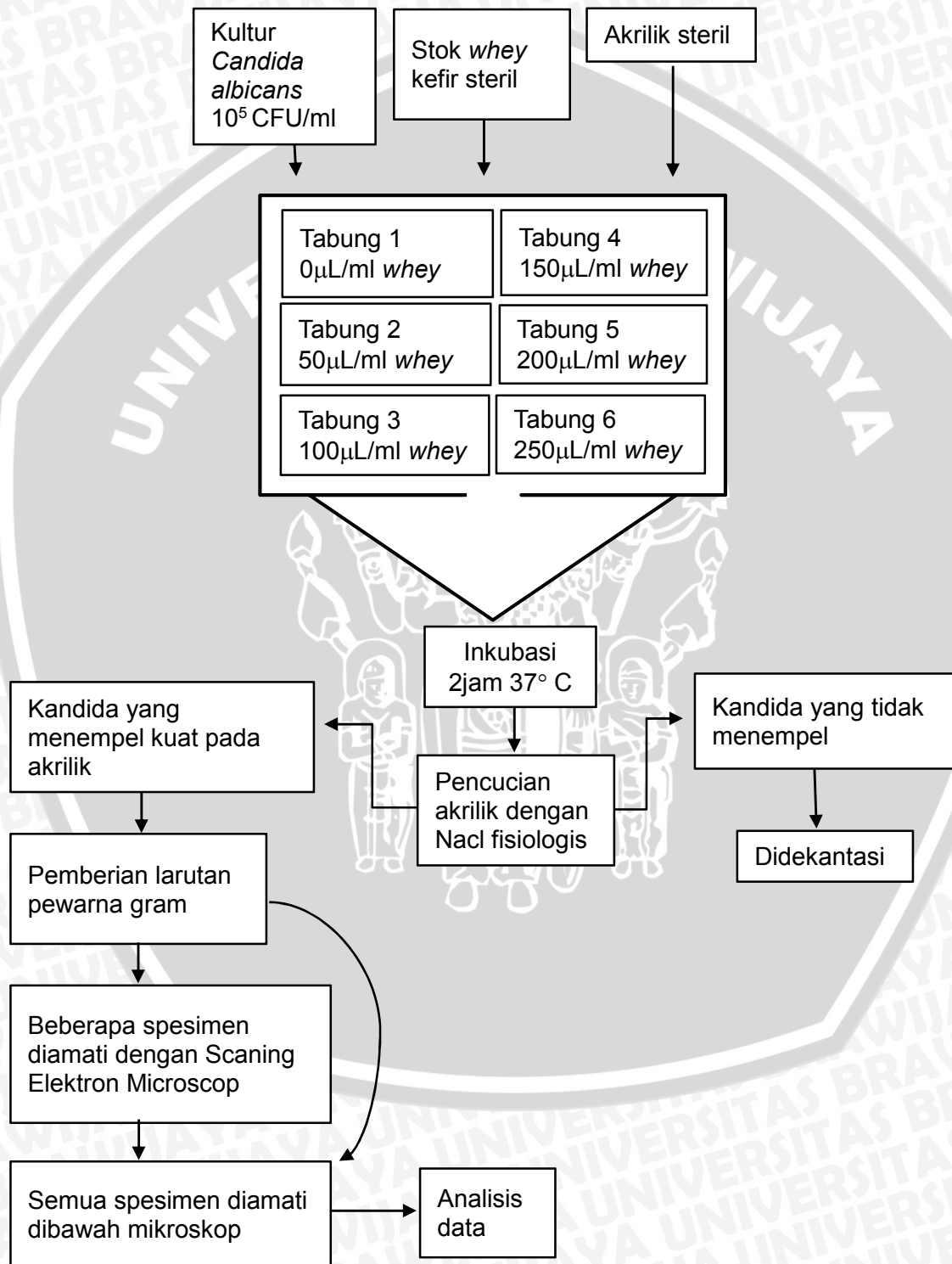
#### 4.8.2 Pembuatan *Whey Kefir*



#### 4.8.3. Persiapan Lempeng Akrilik *Heat Cured*



4.8.4 Uji Efek Antiadhesi





#### 4.9 Analisis Hasil Pengamatan

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kualitatif dan kuantitatif. Data kualitatif didapatkan dengan melihat ada tidaknya sel kandida pada permukaan akrilik. Data kuantitatif didapatkan dengan menghitung jumlah sel kandida yang beradhesi pada permukaan akrilik menggunakan *software* Image Raster.

Uji statistik yang digunakan untuk data kuantitatif adalah uji normalitas dan homogenitas *Kruskal wallis*, uji *Mann whitney*, Uji *Korelasi Spearmen*. Analisa data dilakukan dengan menggunakan *software* analisa statistik (Dahlan, 2008)

