

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experimental design post test control only* dengan pengulangan yang sesuai dengan rumus pengulangan. Metode penelitian yaitu dengan dilusi tabung yang meliputi pencampuran kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* secara *in vitro*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juli- November 2016.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya dan telah dilakukan identifikasi ulang di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang sebelum dilakukan penelitian.

4.3.1 Pengulangan Sampel

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

Keterangan:

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini berdasarkan perhitungan rumus (Loektito, 1998) didapatkan pengulangan:

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

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 2,8$$

(Dibulatkan ke atas menjadi 3)

Setelah dilakukan perhitungan, maka pengulangan yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak tiga kali pengulangan.

4.3.2 Variabel Penelitian

4.3.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah konsentrasi kitosan hasil deasetilasi yang dibuat larutan uji sebesar 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; dan 65%.

4.3.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah kadar bunuh minimum (KBM) bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

4.4 Alat dan Bahan

4.4.1 Penyediaan Kulit Udang

Bahan yang digunakan adalah kulit udang yang diperoleh dari pabrik pengolahan udang beku di Semarang, Jawa Tengah. Pemilihan kulit udang berdasarkan kulit udang yang masih segar.

4.4.2 Alat dan Bahan Pembuatan Kitosan Hasil Deasetilasi Kulit Udang

Alat yang digunakan untuk proses deasetilasi kulit udang antara lain (Kurniasih, 2009; Ramadhan, 2010):

1. Kompor listrik
2. Termometer
3. Beaker glass
4. Spektrofotometer FTIR
5. Alat press pelet
6. Flokulator
7. Screener
8. Crusher
9. Timbangan elektrik

Bahan yang digunakan untuk pembuatan kitosan hasil deasetilasi antara lain:

1. Kulit udang
2. Natrium hidroksida (NaOH)
3. Asam klorida
4. Natrium hipoklorit (NaOCl)

Emulsifier yang digunakan dalam persiapan kitosan untuk uji KHM adalah *carboxymethyl cellulose* (CMC) yang sudah dibuktikan sterilitasnya dengan penelitian pendahuluan.

4.4.3 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

4.4.3.1 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

1. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. *Anaerobic jar*
3. Bahan pewarnaan Gram (kristal, violet, lugol, alkohol 96%, safranin)
4. *Nutrient Broth*
5. Ose
6. Kertas penghisap
7. Kapas
8. Minyak emersi
9. Mikroskop
10. Gelas objek
11. Tabung reaksi
12. Lampu spiritus

4.4.3.2 Alat dan Bahan untuk Tes Katalase

1. Gelas objek
2. Pipet
3. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
4. Anaerobic jar
5. Larutan H₂O₃ 3%

4.4.3.3 Alat dan Bahan untuk Tes Oksidase

1. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. Kertas filter
3. Reagen oksidase *tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida* 1% (Kovac)

4.4.3.4 Alat dan Bahan untuk Uji Hemolisis

1. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. *Blood Agar Plate* (BAP)
3. Inkubator

4.4.3.5 Alat dan Bahan untuk Agar MacConkey

1. Isolat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
2. *Anaerobic jar*
3. Medium *MacConkey* agar
4. Inkubator

4.4.3.6 Alat dan Bahan Uji Biokimia Menggunakan *Microbat™ Kit*

1. Tabung reaksi
2. Mikro pipet
3. *Holding Tray*

4.4.4 Alat dan Bahan untuk Metode Dilusi Tabung

- Alat dan bahan untuk pembuatan larutan kitosan (Nurainy dkk., 2008):

1. Kitosan hasil deasetilasi kulit udang
2. *Carboxymethyl cellulose* (CMC)

Alat dan bahan untuk pembuatan media pertumbuhan bakteri (Mpila, 2012):

Alat :

1. Erlenmeyer
2. *Stirer*
3. *Aluminium foil*
4. Tabung reaksi
5. *Autoclave*
6. Timbangan

Bahan :

1. *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
2. *Aquades*

Alat dan Bahan Pembuatan Media Uji dengan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

1. *Mueller Hinton Agar* (MHA)
2. *Aquadest*
3. Labu Erlenmeyer
4. *Autoclave*
5. Cawan Petri

4.5 Definisi Operasional

1. Kulit udang yang digunakan berasal dari pabrik pengolahan udang beku di Semarang, Jawa Tengah.

2. Kitosan diperoleh dari metode deasetilasi dilakukan dengan pengerjaan secara bertahap dalam larutan NaOH 50% tingkat spesifikasi teknik (*technical grade*) rasio massa kitin dan larutan 1:20 (b/v), pada suhu 120°C yang dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Politeknik Negeri Malang.
3. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya. Bakteri uji diidentifikasi ulang di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Uedokteran Universitas Brawijaya.
4. Potensi antimikroba kitosan diawali dengan metode dilusi tabung. Metode ini menggunakan tabung- tabung yang berisi larutan ekstrak kemudian diencerkan pada media BHIB berturut-turut sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan. Tiap tabung ditanami dengan suspensi bakteri yang mengandung 10^6 CFU/mL sel bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitnas*. Selanjutnya tabung- tabung tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18- 24 jam. Setelah diinkubasi, diamati kekeruhannya untuk menentukan KHM, lalu di biakkan pada media agar padat dan diinkubasi kembali selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati kembali untuk dilakukan penghitungan jumlah koloni bakteri untuk menentukan KBM.
5. Kadar Bunuh Minimum (KBM) merupakan jumlah koloni terkecil pada agar hasil *striking* dari tabung berisi larutan kitosan dan bakteri yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
6. Kelompok kontrol pembanding adalah kelompok yang digunakan sebagai pembanding dengan kelompok perlakuan yang diberi kitosan dalam

berbagai konsentrasi. Kelompok pembanding dalam penelitian ini adalah klorheksidin glukonat 0,2%. Klorheksidin glukonat 0,2% digunakan karena bahan ini digunakan secara topikal dalam mulut, sehingga bersinggungan langsung dengan bakteri. Hal ini sama seperti kitosan yang nantinya akan langsung digunakan secara topikal di dalam mulut.

7. Kelompok perlakuan pengulangan adalah kelompok dengan perapatan konsentrasi dengan konsentrasi 40%; 45%; 50%; 55%; 60%; 65%
8. Kontrol bahan adalah kultur kitosan untuk diuji apakah sudah sesuai dengan standar spesifikasi mutu kitosan yang dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Fakultas Teknik, Politeknik Negeri Malang.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Deasetilasi Kulit Udang

- Deproteinasi kulit udang (Teng, 2012; Tolaimate 2003) :
 1. Kulit udang dibersihkan dan dicuci dengan air.
 2. Kulit udang dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan ukuran kurang lebih 2-3 mm.
 3. Serbuk udang dicampur dengan larutan NaOH 3,5% dengan perbandingan 1:10
 4. Aduk campuran tersebut selama 120 menit pada suhu 60-70°C, campuran ini disebut kitin kasar (*crude chitin*)
 5. Cuci kembali campuran tersebut, untuk memisahkan air dan filtratnya
 6. Keringkan campuran tersebut, lalu beri air dan endapkan

- Demineralisasi Kitin (Teng, 2012; Tolaimate 2003) :
 1. Campurkan endapan hasil deproteinasi dengan larutan HCl 1N dengan rasio 1:15
 2. Aduk selama 60 menit pada suhu 25-30°C
 3. *Crude* kitin lalu dicuci kembali untuk memisahkan air dan filtratnya
 4. Lakukan pengovenan agar air menguap
 5. Hasil dari demineralisasi ini berupa serbuk kitin
- Deasetilasi untuk mendapatkan kitosan (Teng, 2012; Tolaimate 2003) :
 1. Serbuk kitin dicampur dengan larutan NaOH 50% dengan rasio kitin dan larutan adalah 1:20
 2. Aduk campuran tersebut pada suhu 90-100°C dengan variasi waktu 2 x 3 jam, 3 x 3 jam (penghilangan warna dengan natrium hipoklorit/ NaOCl), dan 3 x 3 jam (penghilangan warna dengan aseton).
 3. Cuci campuran tersebut untuk memisahkan air dan filtratnya
 4. Lakukan pengovenan untuk menguapkan air
 5. Hasil dari deasetilasi ini berupa kitosan

4.6.2 Uji Identifikasi Bakteri

4.6.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram menurut penelitian Chaskes *et al.* pada tahun 2015 dapat dilakukan dengan cara :

1. Buat suspensi air suling dan koloni bakteri pada *object glass* dan dikeringkan di udara
2. Sediaan yang telah kering di fiksasi diatas api bunsen

3. Sediaan diberi larutan kristal violet selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir
4. Sediaan diberi larutan lugol selama satu menit, kemudian dibilas dengan air mengalir
5. Sediaan diberi *safranin*, lalu didiamkan selama 30 detik, lalu dibilas dengan air
6. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x.

4.6.2.2 Uji Katalase

Uji katalase merupakan bagian penting dalam identifikasi bakteri. Tes ini untuk mendeteksi enzim katalase dari bakteri. Enzim katalase berfungsi sebagai penetralisir efek bakterisidal dari hidrogen peroksida (H_2O_2). Uji ini dilakukan dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair. Prosedur dari tes katalase ini antara lain (Reiner, 2013):

1. Sediakan perbenihan bakteri pada gelas objek
2. Tetesi sediaan dengan larutan H_2O_2 3%
3. Amati timbulnya gelembung-gelembung udara pada gelas objek
4. Hasil tes katalase pada *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* akan menunjukkan hasil yang positif, dapat diamati melalui timbulnya gelembung-gelembung udara tersebut.

4.6.2.3 Uji Oksidase

Uji oksidase bertujuan untuk mengetahui adanya enzim *cytochrome oxidase* pada bakteri yang diuji. Bakteri yang mengandung enzim tersebut dapat mengoksidase reagen sehingga menghasilkan perubahan warna pada kertas reagen. Prosedur tes oksidase dilakukan dengan mengambil koloni dari media

padat, lalu digoreskan pada kertas filter yang telah diberi reagen oksidase *tetrametil p-fenilendiamin dihidroklorida* 1% (Kovac) dan amati hasilnya. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil positif yaitu terdapat perubahan warna menjadi ungu pada kertas reagen oksidase dalam waktu kurang dari 10 detik (Reynolds, 2012).

4.6.2.4 Uji Hemolisis

Uji hemolisis bertujuan untuk mengetahui sifat hemolisis dari bakteri yang diuji dengan metode *streaking* pada media *Blood Agar Plate* (BAP). Terdapat tiga kriteria hasil uji hemolisis yaitu α , β dan γ . Bakteri yang telah di *striking* pada media BAP diinkubasikan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya. Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* menunjukkan hasil non-hemolisis atau γ^- hemolisis yaitu tidak tampak perubahan warna pada BAP (Aryal, 2015).

4.6.2.5 Kultur pada Agar MacConkey

Kultur pada agar *MacConkey* dilakukan untuk mengisolasi dan membedakan bakteri Gram-negatif. Mekanisme dari uji ini bertujuan untuk melihat perubahan warna pada indikator pH hasil fermentasi laktosa bakteri. Fermentasi laktosa menyebabkan pH di sekitar koloni turun dan menyebabkan perubahan warna pada indikator pH. Bakteri yang memfermentasi laktosa tumbuh sebagai koloni merah atau merah muda. Bakteri yang tidak memfermentasi laktosa tumbuh dengan koloni tidak berwarna dan transparan. Inokulasi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dilakukan dengan metode *streaking* pada medium agar. Agar yang sudah diinokulasi bakteri diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Bila warna media berubah menjadi merah, maka bakteri memfermentasi laktosa. Bakteri

Aggregatibacter actinomycetemcomitans tidak menunjukkan perubahan warna pada media, bakteri tidak memfermentasi laktosa (Batt *et al.*, 2014).

4.6.2.6 Uji Biokimia Bakteri Menggunakan *Microbact*TM Kit

Uji biokimia menggunakan *Microbact*TM meliputi beberapa uji seperti uji *Indole* dan uji reduksi nitrat. Prosedur uji antara lain:

1. Siapkan kultur murni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang telah diidentifikasi selama 18-24 jam
2. Lakukan tes oksidase untuk mengetahui jenis *Microbact*TM kit yang akan digunakan. Bila hasil uji oksidase positif maka menggunakan *Microbact*TM kit 24E (12A (12E) + 12B).
3. Ambil isolat bakteri dan encerkan dalam larutan *saline* sebanyak 5 ml
4. Siapkan *microplate* dan lepaskan lapisan penutupnya
5. Tambahkan empat tetes (kira-kira 100µl) suspensi bakteri pada setiap lubang
6. Tambahkan dua tetes *mineral oil* (MB1093A) pada lubang yang berlingkar hitam
7. Pasang kembali lapisan penutupnya dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C
8. Setelah dilakukan inkubasi, beri reagen yang sesuai pada lubang tertentu (*indole*, reagen nitrat)
9. Amati hasilnya dengan tabel yang tersedia

4.6.3 Persiapan Suspensi Uji *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Pembuatan inokulum bakteri dilakukan dalam beberapa tahap (Sutton, 2011):

1. Persiapkan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dari media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*) yang telah diuji konfirmasi
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,9% steril. Ukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya sebesar 0,1. Hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^8 CFU/mL dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$
3. Setelah diperoleh suspensi sel sebesar 1×10^8 CFU/mL maka sel bakteri dapat langsung digunakan.

4.6.4 Pembagian Kelompok Perlakuan untuk Penelitian Pendahuluan

Kelompok pembanding: kelompok kontrol pembanding yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diberi klorheksidin glukonat 0,2%.

Kelompok kontrol negatif: kelompok kontrol negatif yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tanpa kotosan hasil deasetilasi kulit udang.

Kelompok 1: kelompok perlakuan A yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 25%.

Kelompok 2: kelompok perlakuan B yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 50%.

Kelompok 3: kelompok perlakuan C yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 65%.

Kelompok 4: kelompok perlakuan D yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 80%.

Kelompok 5: kelompok perlakuan E yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 100%.

4.6.5 Pembagian Kelompok Perlakuan untuk Pengulangan

Kelompok pembanding: kelompok kontrol pembanding yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diberi klorheksidin glukonat 0,2%.

Kelompok kontrol negatif: kelompok kontrol negatif yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tanpa kotosan hasil deasetilasi kulit udang.

Kelompok 1: kelompok perlakuan A yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 40%.

Kelompok 2: kelompok perlakuan B yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 45%.

Kelompok 3: kelompok perlakuan C yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 50%.

Kelompok 4: kelompok perlakuan D yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 55%.

Kelompok 5: kelompok perlakuan E yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 60%.

Kelompok 6: kelompok perlakuan F yaitu bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dan diberi perlakuan kitosan hasil deasetilasi kulit udang dengan konsentrasi 65%.

4.6.6 Uji Potensi Kitosan Hasil Deasetilasi Kulit Udang (*Penaeus sp.*) sebagai Antimikroba terhadap *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dengan Metode Dilusi Tabung

- Pembuatan larutan kitosan:
 1. Proses ini menggunakan kitosan dan *carboxymethyl cellulose* (CMC)
 2. Kitosan dibuat dalam beberapa konsentrasi mulai dari 25 hingga 100 persen dengan CMC perbandingan 1:2
 3. Kitosan seberat 1 gram dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 3 ml lalu di vortex hingga larut.
 4. Setelah kitosan larut, CMC dicampurkan sebanyak 0,5 gram dan ditambahkan akuades steril sebanyak 4ml

5. Vortex hingga kitosan dan CMC tercampur merata dan konsistensinya kental

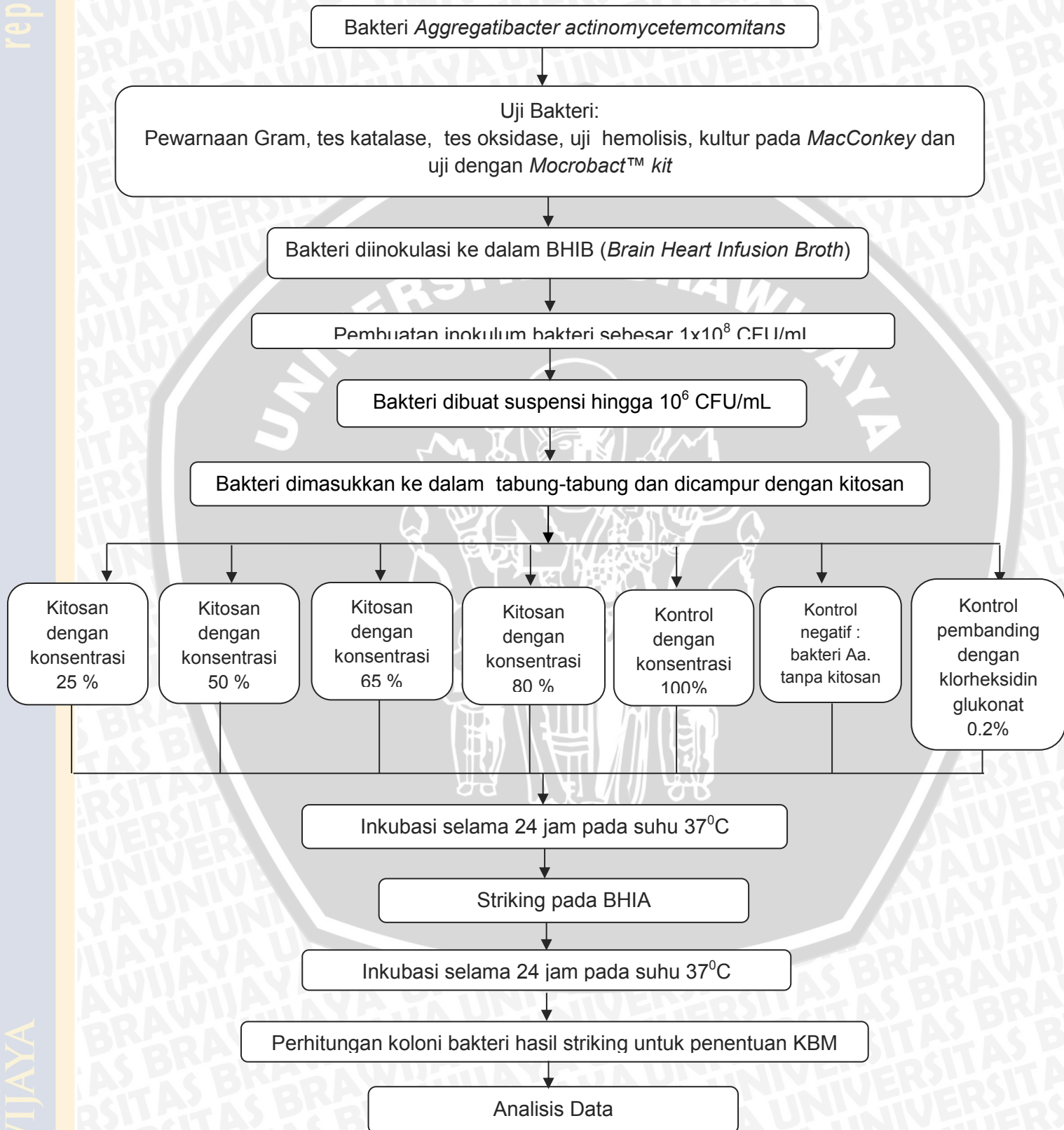
- Metode Dilusi Tabung

Semua tabung yang berisi bakteri dan kitosan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati. Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM), diambil satu ose dari konsentrasi BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*), lalu diinokulasikan pada media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kadar Bunuh Minimum ditentukan pada konsentrasi terkecil dimana pada media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) tidak lagi ditemukan pertumbuhan koloni bakteri (Struthers *et al.*, 2008). Pengujian terhadap masing-masing kelompok uji tersebut diulang sebanyak tiga kali.

4.6.7 Penghitungan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

Kadar bunuh minimum (KBM) ditentukan dengan perhitungan koloni bakteri dari hasil striking pada BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*) (Struthers *et al.*, 2008).

4.7 Skema Alur Penelitian



4.8 Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Uji ini menggunakan uji *Kolmogorov-Sminov* dan uji *Levene*. Bila data normal dan homogen, maka akan menggunakan uji komparasi *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* dilakukan menggunakan *Tukey HSD*. Uji korelasi digunakan untuk melihat ada atau tidaknya korelasi antar variabel dan melihat bentuk korelasinya. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Pearson*. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi kitosan hasil deasetilasi kulit udang (*Penaeus sp.*) terhadap jari-jari zona hambat bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Uji regresi linier dilakukan untuk melihat seberapa besar kontribusi variabel independen dalam menyebabkan perubahan di variabel dependen.

Bila hasil uji normalitas dan homogenitas varian data menunjukkan bahwa data tidak tersebar normal dan atau tidak homogen, maka analisis data yang akan digunakan adalah uji komparasi *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* dilakukan menggunakan *Mann Whitney*. Uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk *Windows*.