

## BAB 3

### METODE PENELITIAN

#### 3.1 ALAT DAN BAHAN PENELITIAN

Alat dan bahan untuk penelitian material coating shunt antibakteri menggunakan kitosan dan heparin pada Table 3.1 sebagai berikut.

**Table 3. 1 Alat dan Bahan Penelitian**

Keterangan	Alat	Bahan
Pembuatan larutan kitosan	Neraca digital, gelas beaker, botol, spatula, batang pengaduk, alumunium foil, mikropipet, gelas ukur, <i>magnetic stirrer</i> , dan <i>hot plate</i>	Kitosan cangkang udang dan larutan asam asetat dengan konsentrasi 1% (v/v)
Proses coating	Pinset, <i>cotton bud</i> , hair dryer, gelas beaker, dan cawan petri	Potongan pipa foley berlapis standar (silikon) berdiameter 14 Fr dipotong 3 cm, alkohol, aquades, dan inviclot heparin natrium injeksi 5000 IU
Pengujian FTIR	Nicolet Avatar 360 IR	Bubuk kitosan dan sampel shunt yang telah dilapisi kitosan dengan variasi 0,2%; 1%; dan 5%
Uji Anti Bakteri	Erlenmeyer, tabung reaksi, kapas, cawan petri, mikropipet dan tip, bunsen, jarum ose, inkubator, oven, autoklaf dan laminar air flow	Kultur bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> dan media padat nutrient agar, dan media cair nutrient broth
Uji Hemolisis	Tabung EDTA K3, <i>centrifuge</i> , <i>vortex mixer</i> , tabung sentrifugasi 15mL, tabung ulir, inkubator, mikropipet dan tip, dan spektrofotometer UV-Vis	Darah kelinci, larutan hemoglobin C (Drabkin's reagent), Phospate Buffer Saline (PBS), <i>water for injection</i> (WFI)

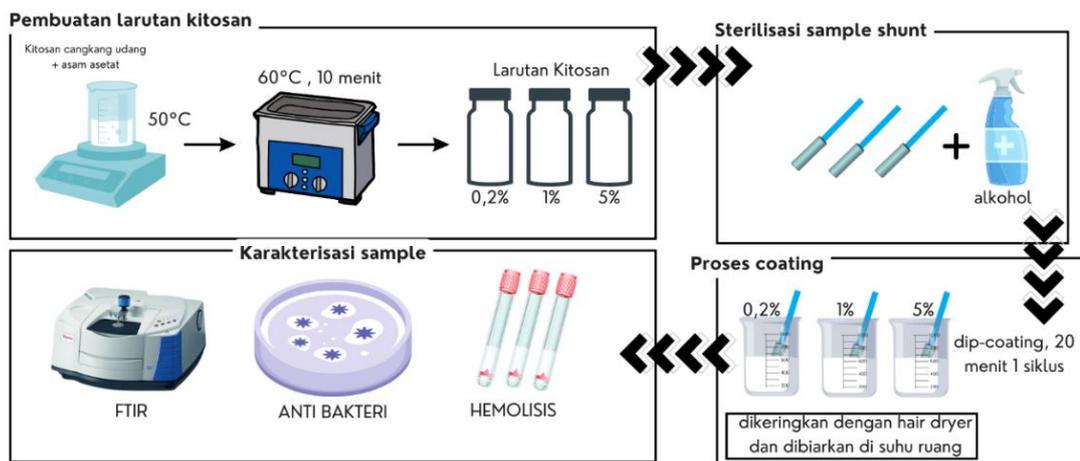
Alat yang digunakan untuk proses pembuatan larutan kitosan sebagai material coating, yaitu neraca digital, gelas beaker, botol, spatula, batang pengaduk, alumunium foil, mikropipet, gelas ukur, *magnetic stirrer*, dan *hot plate*. Alat yang digunakan untuk proses *coating*, yaitu pinset, *cotton bud*, hair dryer, gelas beaker,

dan cawan petri. Alat untuk pengujian FTIR menggunakan Nicolet Avatar 360 IR. Alat untuk uji antibakteri yaitu, erlenmeyer, tabung reaksi, kapas, cawan petri, mikropipet dan tip, bunsen, jarum ose, inkubator, oven, autoklaf dan laminar air flow. Alat untuk uji hemolisis yaitu, tabung EDTA K3, *centrifuge*, *vortex mixer*, tabung sentrifugasi 15mL, tabung ulir, inkubator, mikropipet dan tip, dan spektrofotometer UV-Vis.

Bahan yang digunakan untuk proses pembuatan larutan kitosan sebagai material coating yaitu, kitosan cangkang udang dan larutan asam asetat dengan konsentrasi 1% (v/v). Bahan yang digunakan untuk proses *coating* potongan pipa foley berlapis standar (silikon) berdiameter 14 Fr dipotong 3 cm, alkohol, aquades, dan inviclot heparin natrium injeksi 5000 IU. Bahan untuk uji antibakteri yaitu, kultur bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan media padat nutrient agar, dan media cair nutrient broth. Bahan untuk uji hemolisis yaitu, darah kelinci, larutan hemoglobin C (Drabkin's reagent), Phosphate Buffer Saline (PBS), *water for injection* (WFI).

### 3.2 PROSEDUR PENELITIAN

Proses pembuatan material *coating* antibakteri *shunt* menggunakan kitosan dan heparin adalah ditunjukkan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Metode Penelitian

### **3.2.1 Persiapan potongan pipa foley berlapis standar (silikon)**

Pipa foley berlapis standar (silikon) berukuran diameter 14 Fr (Well Lead Medical CO., LTD, China) dipotong sepanjang 3 cm. Lalu, potongan silikon direndam dalam larutan alkohol untuk sterilisasi yang mana menghilangkan kontaminan yang ada, dan kemudian dicuci dengan jumlah yang banyak dari air. Kateter yang telah steril kemudian dikeringkan di suhu ruang menggunakan *hair dryer* dan didiamkan dalam suhu ruang.

### **3.2.2 Pembuatan larutan kitosan**

Sebanyak 0,2 g kitosan cangkang udang dilarutkan dalam 100 ml larutan asam asetat dengan konsentrasi 1%, untuk menghasilkan larutan kitosan dengan konsentrasi 0,2% (b/v). Sebanyak 1 g kitosan cangkang udang dilarutkan dalam 100 ml larutan asam asetat dengan konsentrasi 1%, untuk menghasilkan larutan kitosan dengan konsentrasi 1% (b/v). Sebanyak 5 g kitosan cangkang udang dilarutkan dalam 100 ml larutan asam asetat dengan konsentrasi 1%, untuk menghasilkan larutan kitosan dengan konsentrasi 5% (b/v). Kemudian, larutan kitosan dimasukkan ke dalam gelas beaker dan diletakkan di atas *hot plate* untuk diaduk menggunakan *magnetic stirrer* dan diaduk perlahan pada suhu 50 °C hingga larut, dan didiamkan pada suhu kamar. Untuk larutan 5% dihomogenkan menggunakan ultrasonicator bath pada suhu 60°C selama 10 menit. Larutan disimpan dalam lemari pendingin sampai digunakan.

### **3.2.3 Proses coating**

*Shunt* silikon disterilkan menggunakan alkohol untuk menghilangkan kontaminan dan kotoran, lalu dikeringkan dalam suhu ruang. *Shunt* silikon kemudian dicelupkan ke dalam larutan kitosan 0,2% selama 20 menit pencelupan dalam 1 siklus dan kemudian dikeringkan menggunakan *hair dryer* dan dibiarkan dalam suhu ruang. *Shunt* silikon untuk sampel kedua kemudian dicelupkan ke dalam larutan kitosan 1% selama 20 menit pencelupan dalam 1 siklus dan kemudian dikeringkan menggunakan *hair dryer* dan dibiarkan dalam suhu ruang. Sampel ketiga perlakuan yang sama *shunt* silikon dicelupkan ke dalam larutan kitosan 5% selama 20 menit pencelupan dalam 1 siklus dan kemudian dikeringkan

menggunakan *hair dryer* dan dibiarkan dalam suhu ruang. *Coating* kitosan dilakukan untuk pengujian FTIR dan anti bakteri. Setelah didapatkan hasil terbaik dari pengujian tersebut dilakukan *coating* dengan heparin (Inviclot heparin injeksi 5000 IU) dengan variasi sample yaitu, kontrol, heparin-kitosan, dan kitosan-heparin dilakukan *coating* dengan metode yang sama untuk selanjutnya di uji hemolisis.

### 3.2.4 Uji FTIR (Fourier Transform Infra Red)

Uji FTIR bertujuan hanya untuk melihat adanya gugus fungsi kitosan yang menempel sebagai *coating* pada model *shunt*. FTIR yang digunakan adalah Nicolet Avatar 360 IR di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro di Semarang. Sampel model *shunt* dipotong dan diberi label nama untuk kemudian dikirim untuk diuji. Sampel diuji spektrum infra-rednya pada bilangan gelombang  $4000-200\text{ cm}^{-1}$  [25]. Hasil data dari uji FTIR akan diolah menggunakan *excel* dan origin untuk dibandingkan data serapannya dengan jurnal referensi.

### 3.2.5 Uji Anti Bakteri

Uji Antibakteri menggunakan kultur bakteri *Staphylococcus aureus* yang biasa dijumpai pada pasien hidrosefalus saat menggunakan *shunt* sebagai bakteri gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri yang biasa dijumpai pada kasus infeksi di rumah sakit sebagai bakteri gram negatif [31]. Kultur bakteri akan ditempatkan pada media cair *Nutrient Broth*, uji bakteri dilakukan dengan tujuan melihat aktivitas bakteri dan mengamati pengaruh material kitosan-heparin sebagai kandidat material antibakteri pada proses *coating shunt*. Mula-mula media untuk bakteri disiapkan menggunakan media padat yaitu nutrient agar (NA) sebanyak 2 g dilarutkan dalam 100 mL aquades dan media cair nutrient broth (NB) sebanyak 0,16 g dilarutkan dalam 20 mL aquades disiapkan. Media kemudian disterilisasi ke dalam autoklaf selama 15 menit dalam suhu  $121^{\circ}\text{C}$ . Selama media disterilisasi, alat disterilisasi menggunakan oven. Kemudian bakteri diinokulasi ke dalam nutrient broth (NB) menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam, 1 ml NB di tuang ke dalam 25 ml NA pada setiap satu cawan petri menggunakan mikropipet dan ditunggu hingga media mengeras. Setelah mengeras sample *shunt* di letakkan pada media dan diinkubasi selama 24 jam. Masing-masing cawan petri berisikan dua sampel *shunt*. Kemudian diamati

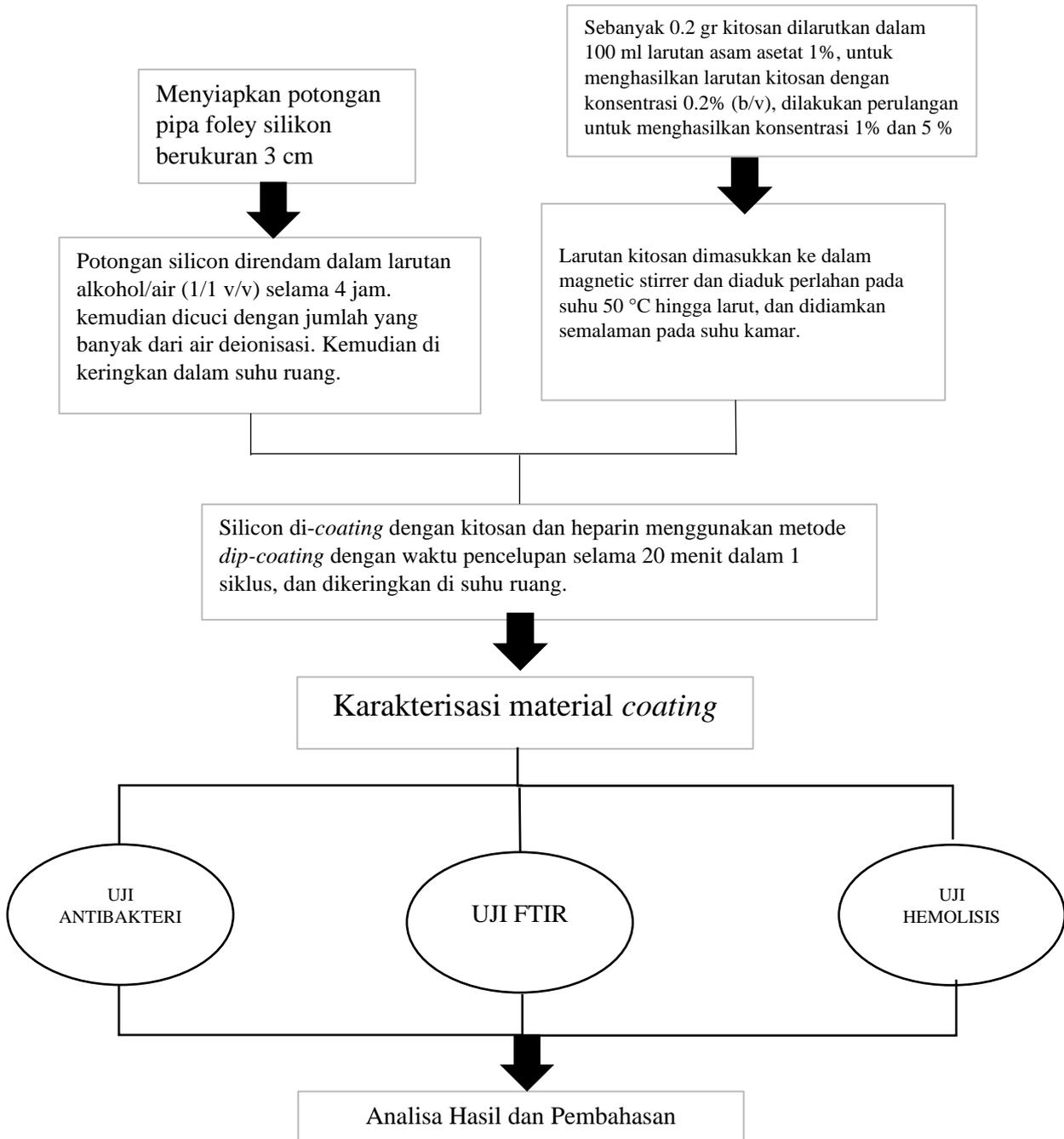
zona bening disekitar *shunt* dan diukur diameternya secara vertikal, horizontal, dan diagonal. Kemudian dilihat zona hambatnya menggunakan persamaan 1 [27].

### 3.2.6 Uji Hemolisis

Uji hemolisis dilakukan untuk melihat adanya pembekuan darah atau tidak dari sampel yang telah dibuat. Mula-mula disiapkan darah kelinci sehat yang diambil dari arteri telinga kelinci oleh dokter hewan sebagai objek uji yang diletakkan pada tabung EDTA K3. Darah antikoagulasi disentrifugasi pada 3000 rpm selama 10 menit dan dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak lima kali dalam mesin centrifuge untuk menghapus serum dan mendapatkan sel darah merah (RBC). Kemudian RBC yang telah dihasilkan diencerkan menggunakan PBS dengan rasio RBC:PBS 1:7. Lalu 0,2 mL RBC encer ditambahkan 0,8 mL WFI dengan rasio 1:4 sebagai kontrol positif, 0,2 mL RBC encer ditambahkan 0,8 mL PBS dengan rasio 1:4 sebagai kontrol negatif, dan sampel kemudian dimasukkan ke dalam 0,2 mL RBC encer yang ditambahkan 0,8 mL PBS, masing masing diinkubasi pada suhu 37°C selama 2 jam. Lalu di sentrifugasi pada 2000 rpm selama 5 menit. Lalu 1 mL supernatan dari masing masing tabung ditambahkan 1 mL drabkin's reagent dan dibaca absorbansinya pada 540 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dilihat persentase hemolitik (HP)nya menggunakan persamaan 2[29]. Penentuan derajat hemolitik dilakukan dengan memperhatikan indeks hemolitik (%) menurut ASTM F756-13. Singkatnya, indeks hemolitik 0%-2% dianggap non-hemolitik, 2%-5% dianggap sedikit hemolitik, dan di atas 5% dianggap hemolitik [32]. Oleh karena itu, sampel dengan konsentrasi kitosan 5% yang memiliki indeks hemolitik 0% dikatakan non-hemolitik.

### 3.3 SKEMA PENELITIAN

Adapun tahapan dalam pelaksanaan penelitian pembuatan kitosan-heparin sebagai *coating* material *shunt* anti bakteri pada penderita hidrosefalus.



Gambar 3. 2 Skema Penelitian