

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *post-test control group design*.

#### **B. Tempat dan Waktu Penelitian**

##### 1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### 2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober hingga Desember tahun 2017.

#### **C. Sampel Penelitian**

1. Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah biakan bakteri anaerob sulkus gingiva yang berasal dari sulkus gingiva normal manusia.
2. Bahan uji yang digunakan adalah EEP *Apis Trigona* dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%.
3. Percobaan dilakukan pengulangan tiga kali (*triplicate design*) sebagai kontrol terhadap bias perlakuan.

#### D. Identifikasi Variabel Penelitian

##### 1. Variabel Pengaruh

EEP *Apis Trigona* dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%.

##### 2. Variabel Terpengaruh

Aktivitas proteolitik biakan bakteri anaerob sulkus gingiva pada media Tryptose Phosphate Broth dengan gelatin.

##### 3. Variabel Terkendali

- a. Jenis propolis (*Apis Trigona*).
- b. Konsentrasi ekstrak etanol propolis.
- c. Suhu inkubator inokulasi bakteri 37°C.
- d. Suhu inkubator uji hidrolisis gelatin 37°C.
- e. Suhu *freezer* 4°C.
- f. Jenis medium Tryptose Phosphate Broth dengan gelatin.
- g. Biakan bakteri anaerob sulkus gingiva yang berasal dari sulkus gingiva normal manusia.

##### 4. Variabel Tidak Terkendali

- a. Usia penyimpanan propolis dari saat panen.

#### E. Definisi Operasional

1. Aktivitas proteolitik adalah kemampuan bakteri untuk melisiskan protein *host*.
2. Biakan bakteri anaerob diisolasi dari sulkus gingiva normal manusia.

3. Ekstrak etanol adalah proses pemisahan suatu zat menggunakan etanol 40%.
4. Konsentrasi 1% setara dengan 10000  $\mu\text{g}$  EEP dalam satu milliliter media kultur.
5. Kontrol negatif menggunakan aquades steril 40  $\mu\text{l}$ .
6. Kontrol positif menggunakan *doxycycline* 0,0025  $\mu\text{g/mL}$ .
7. Turbiditas bakteri merupakan estimasi jumlah populasi bakteri yang didasarkan pada tingkat kekeruhan.
8. Likuifaksi gelatin merupakan gelatin yang mengalami hidrolisis karena aktivitas proteolitik bakteri.
9. Formulasi media Tryptose Phosphate Broth : *Tryptose* (20 g); *Glucose* (2 g); *Sodium Chloride* (5 g); *Disodium hydrogen phosphate* (2,5 g).
10. Uji Hidrolisis gelatin digunakan untuk mengevaluasi aktivitas proteolitik bakteri.

## **F. Instrumen Penelitian**

1. Alat Penelitian
  - a. Spuit injeksi.
  - b. Spektrofotometer UV Mini 1240 (Simadzu, Australia).
  - c. Inkubator (Memmert, Germany).
  - d. Pipet volume (Pirex Iwaki te-32, Indonesia).
  - e. Mikropipet (Socorex Acura 825, Swiss).
  - f. Anaerobik Jar (Oxoid 3,5 L, UK).
  - g. Rak tabung dan tabung reaksi (Pirex Iwaki te-32, Indonesia).

- h. Labu Erlenmeyer (Pirex Iwaki te-32, Indonesia).
- i. *Autoclave* (Hirayama HVE-50, Jepang).
- j. *Freezer* (Samsung, Korea Selatan).
- k. *Handsocon* (Sensi Gloves, Indonesia).
- l. Masker (Lab Med, Indonesia).
- m. Neraca analitik (Mettler Toledo AL 204, Switzerland)
- n. *Glass beaker* (Pirex Iwaki te-32, Indonesia).
- o. *Glass* ukur (Pirex Iwaki te-32, Indonesia).
- p. *Magnetic Stirrer* (Branstead Cimarex, Malaysia).
- q. *Sliding caliper* (Trichel brand, China)
- r. *Centrifuge* (Hettich EBA 20, Germany)
- s. *Eppendorf* (Biologix, USA).
- t. Kaca arloji.
- u. Sendok stainless.
- v. Propipet (Glasfirn pi pump, Germany).

## 2. Bahan Penelitian

- a. EEP (*Apis trigona*) berbagai konsentrasi.
- b. Biakan bakteri anaerob sulkus gingiva.
- c. Media Tryptose Phosphate Broth.
- d. Powder gelatin.
- e. Anaerogen.
- f. *Doxycycline*.

g. Aquades.

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Tahap Persiapan

#### a. Persiapan Subjek Penelitian

- 1) Mempersiapkan *ethical clearance*
- 2) Mempersiapkan media biakan dan bakteri uji

#### b. Persiapan Alat dan Bahan

#### c. Sterilisasi Alat

Alat disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 20 menit.

### 2. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis

Propolis *Apis trigona* diambil dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunungkidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pembuatan ekstrak etanol propolis dilakukan dengan metode maserasi. Propolis mentah dibersihkan menggunakan aquades steril untuk menghilangkan madunya. Kemudian diperas sehingga propolis terpisah dari aquades pencucian. Selanjutnya propolis dihaluskan menggunakan *blender* hingga menjadi partikel-partikel kecil. Lakukan penimbangan kemudian masukan kedalam *glass beaker*. Maserasi dilakukan dengan menambahkan larutan etanol 40%. Campuran disimpan selama 7 hari pada ruangan gelap tanpa cahaya dan diaduk 2 kali sehari. Langkah selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas kedalam labu Erlenmeyer sehingga diperoleh filtrat saja. Selanjutnya dievaporasi

dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dengan tekanan vakum (<1atm) sehingga diperoleh ekstrak etanol propolis kental dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya 7 tabung EEP (*Apis trigona*) dibuat dalam bentuk alikuot dengan konsentrasi pada tiap-tiap tabung adalah 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%.

### 3. Inokulasi Bakteri

Beberapa koloni bakteri diambil dari strainnya, kemudian dimasukkan kedalam Erlenmeyer yang berisi media Tryptose Phosphate Broth. Erlenmeyer berisi bakteri dimasukan kedalam *anaerobic jar* dan inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

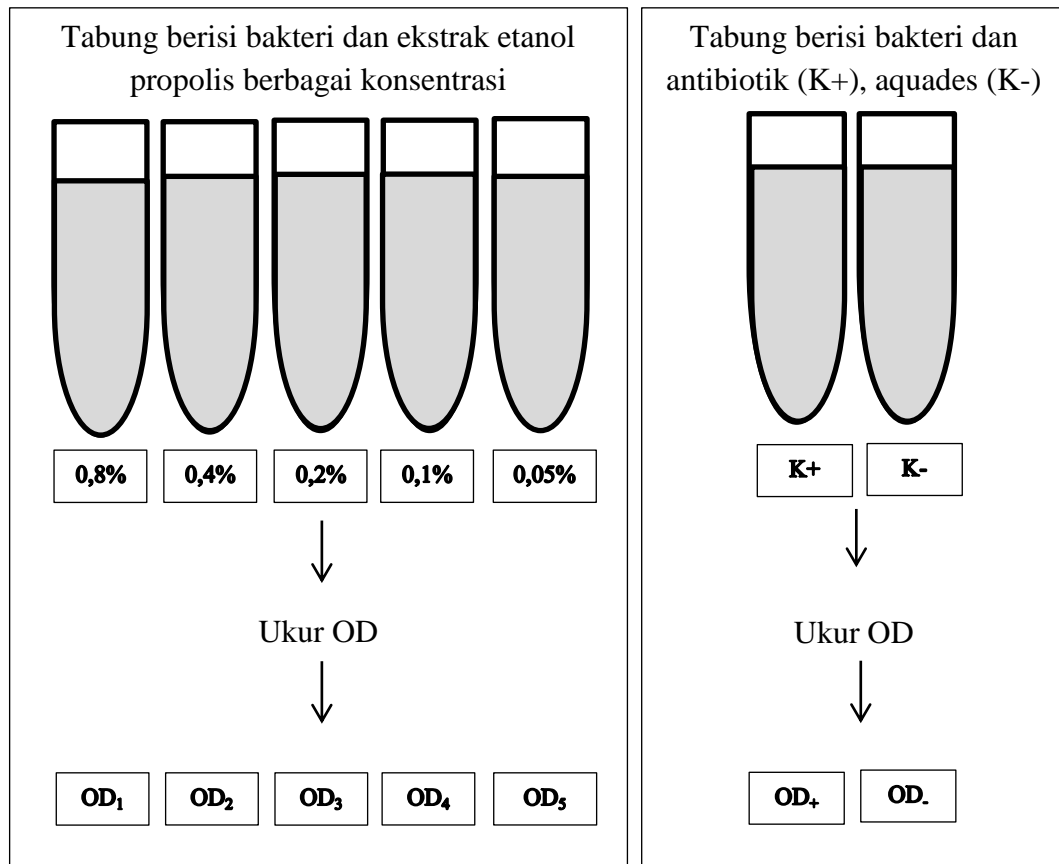
### 4. *Pre-treatment* Bakteri Menggunakan EEP

Menyiapkan 7 tabung reaksi berisi media sebanyak 4,8 ml , tabung pertama diisi dengan *doxycycline* 0,0025 µg/mL sebagai kontrol positif. Lima tabung berikutnya diisi dengan EEP masing-masing dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%. Kemudian tabung terakhir diisi dengan aquades steril 40 µl sebagai kontrol negatif. Selanjutnya masukkan bakteri sebanyak 200µl kedalam semua tabung. Kemudian semua tabung dimasukan kedalam *anaerobic jar* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.

### 5. Uji Spektrofotometer

7 tabung bakteri yang sudah dilakukan *pre-treatment* di uji menggunakan *Ultraviolet-Visible* spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm untuk mendapatkan nilai *Optical Density (OD)*. Hasil

pengukuran OD dijadikan acuan untuk menentukan volume setiap sampel yang merepresentasikan jumlah populasi bakteri. Penentuan volume dilakukan dengan perbandingan OD menggunakan rumus.



**Gambar 1. Skema Pengukuran OD**

$$\begin{aligned}
 OD_2 \times y &= OD_1 \\
 y &= \frac{OD_1}{OD_2} \\
 V_2 &= y \times V_1
 \end{aligned}$$

**Gambar 2. Rumus Menentukan Volume**

Setelah volume setiap sampel telah didapatkan berdasarkan rumus, maka volume sampel yang lebih dari 50 $\mu$ l akan dilakukan pemisahan antara bakteri dan media menggunakan *centrifuge*. Sampel dimasukkan kedalam *eppendorf* kemudian ditutup menggunakan *parafilm* selanjutnya dimasukan kedalam *centrifuge* dengan kecepatan rotasi putaran 5000 rpm selama 10 menit. Setelah bakteri dan media terpisah, maka media diambil menggunakan spuit dan dikembalikan sebanyak 50 $\mu$ l. Langkah selanjutnya bakteri diinjeksikan kedalam gelatin sampai kedalaman  $\frac{3}{4}$  tabung.

#### 6. Uji Hidrolisis Gelatin

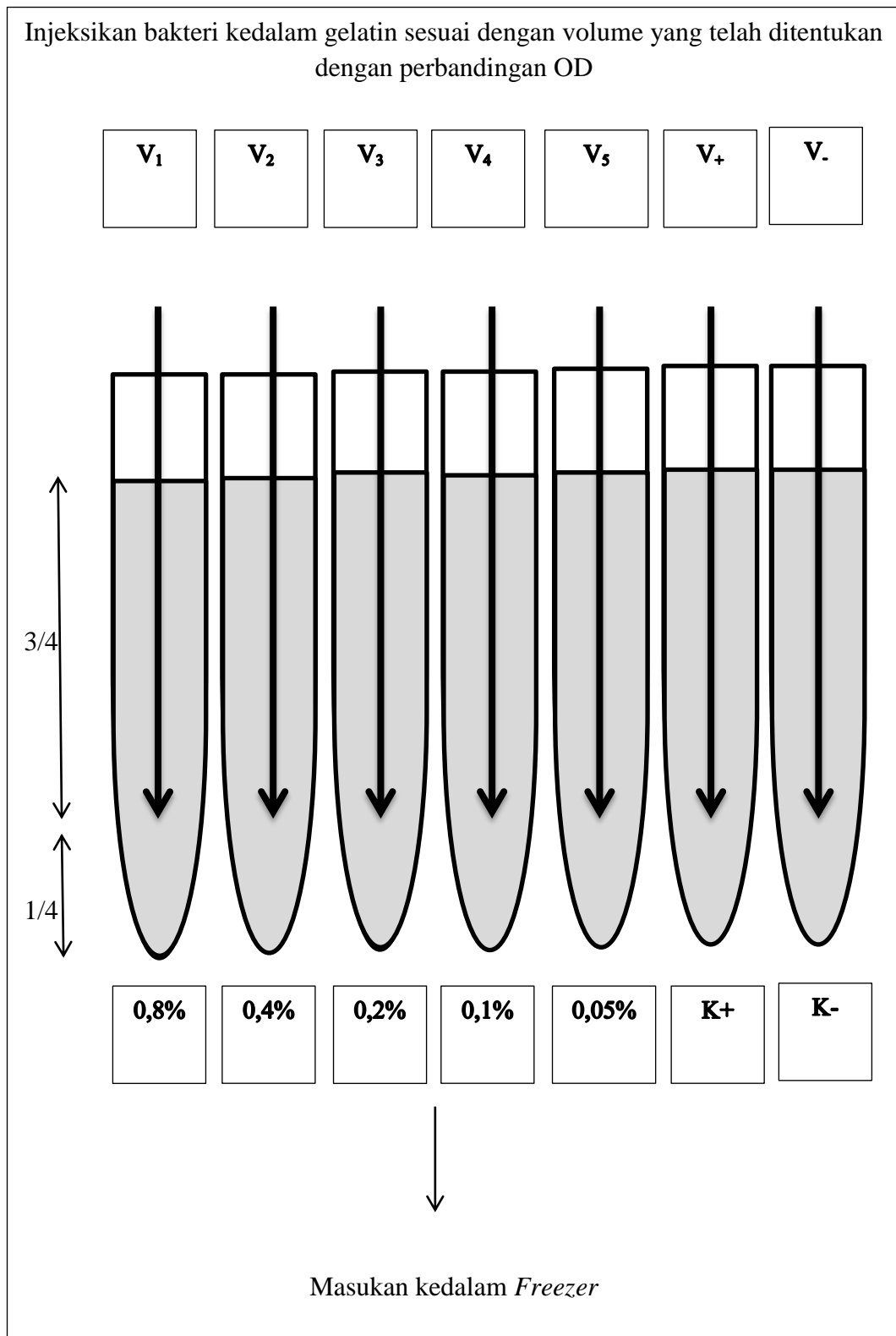
Penelitian ini menggunakan media dengan gelatin untuk mengevaluasi aktivitas proteolitik bakteri. Gelatin yang digunakan harus bersifat padat. Gambar 8 menunjukkan perbandingan gelatin dengan konsentrasi 1%, 3%, 5% dan 8%. Penelitian Grenier dkk (2003) menggunakan gelatin dengan konsentrasi 1%. Gelatin dengan konsentrasi 1%, 3% dan 5% setelah di masukkan kedalam *freezer* masih bersifat cair. Sementara gelatin dengan konsentrasi 8% bersifat padat setelah di masukkan kedalam *freezer*.



**Gambar 3. Gelatin dengan konsentrasi (a) 1%, (b) 3%, (c) 5%, (d) 8%**

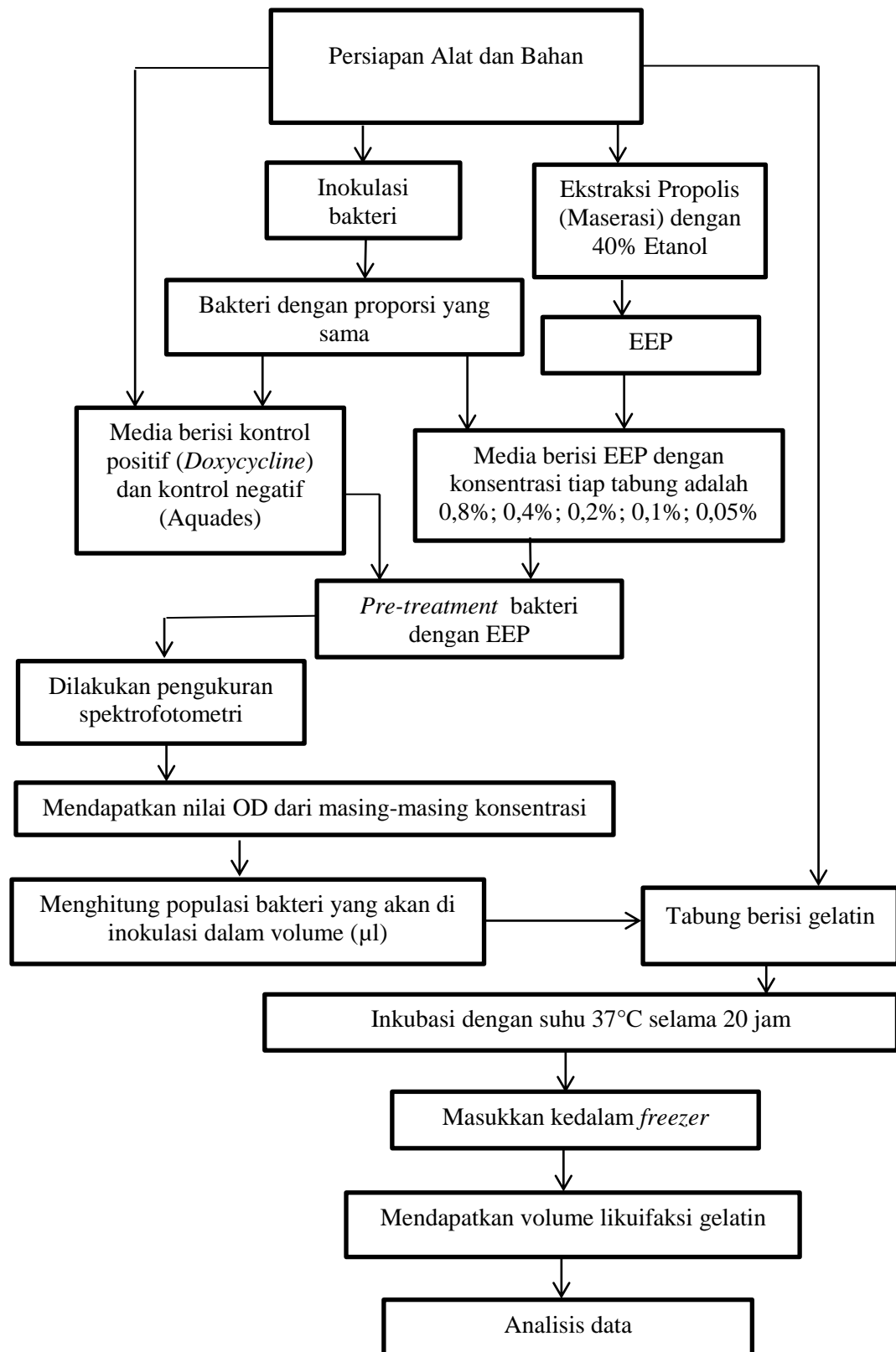


Pengamatan aktivitas proteolitik dilakukan menggunakan 21 tabung media dengan gelatin. Pada penelitian ini menggunakan gelatin dengan konsentrasi 8%. Setiap 3 tabung gelatin akan diinjeksikan bakteri yang sudah dilakukan *pre-treatment* menggunakan EEP dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; 0,05%; *doxycycline* 0,0025 µg/mL dan aquades steril 40 µl. Kemudian bakteri diinjeksikan kedalam gelatin sampai kedalaman  $\frac{3}{4}$  tabung menggunakan spuit. Semua tabung dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 20 jam. Kemudian, semua tabung dimasukkan kedalam *freezer* selama 1 jam. Volume likuifaksi gelatin diukur menggunakan *Sliding caliper*. Hasil pengukuran data dicatat dan di analisis.



**Gambar 4. Skema Uji Hidrolisis Gelatin**

## H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

## I. Analisis Data

Data yang didapat di uji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk karena sampel yang diujikan  $<50$ . Selanjutnya dianalisis menggunakan analisis bivariat dengan uji Spearman karena data non parameterik untuk mengetahui adanya korelasi antara konsentrasi EEP dengan volume likuifaksi gelatin. Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal-Wallis* untuk mengetahui perbedaan nilai rata-rata antar konsentrasi EEP.