

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *post-test only control design*.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Asri Medical Center, Laboratorium Biokimia dan Laboratorium *Molecular and Medical Therapy* Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan .

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli hingga September 2018.

C. Sampel Penelitian

1. Bahan uji yang digunakan adalah Ekstrak Etanol Propolis dari lebah *Apis Trigona* yang diambil dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, dan 10%.
2. Bakteri yang akan diujikan dalam penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang diisolasi terlebih dahulu dari sampel klinis saluran akar saluran akar gigi.

3. Sampel bakteri yang diujikan berjumlah 2 sampel bakteri, yakni bakteri *Enterococcus faecalis* yang di isolasi dari sampel klinis dan bakteri ATCC 29212 *Enterococcus faecalis*.
4. Percobaan dilakukan dengan desain *triplicate* (pengulangan tiga kali) sebagai kontrol bias perlakuan pada uji metabolisme arginin bakteri.
5. Jumlah sampel media pengujian pada penelitian ini berjumlah 30 tabung. Masing-masing sampel bakteri (sampel klinis dan ATCC 29212) terdiri dari 15 tabung yang terbagi dalam 5 kelompok perlakuan yaitu EEP 0,00125%, 0,4%, 10%, kontrol positif, dan kontrol negatif yang tiap perlakuannya dilakukan *triplicate* (3 tabung).

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh:

Ekstrak etanol propolis (EEP) lebah *Apis Trigona* dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, dan 10%.

2. Variabel terpengaruh:

Aktifitas metabolisme arginin bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *arginin dehydrolase broth*.

3. Variable terkendali:

- a. Propolis lebah *Apis Trigona* yang diambil dari tempat yang sama, yaitu dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta.
- b. Isolasi bakteri *Enterococcus faecalis* yang diambil langsung dari saluran akar gigi.

- c. Kontrol bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
 - d. Media *arginin dehydrolase broth*.
 - e. Suhu inkubator 37°C.
 - f. Suhu *freezer* 4°C.
 - g. Kontrol positif berupa *Chlorhexidin digluconate* 2% (Borzini, 2016).
 - h. Kontrol negatif berupa BHI *broth* tanpa perlakuan.
4. Variable tak terkendali
- Lama penyimpanan propolis mentah di peternakan lebah.

E. Definisi Operasional

1. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis menggunakan teknik ekstraksi maserasi dengan pelarut etanol 40%.
2. Konsentrasi Ekstrak Etanol Propolis 1% setara dengan 10000 µg/ml dalam media kultur.
3. Konsentrasi Ekstrak Etanol Propolis yang digunakan adalah 0,00125%, 0,4%, dan 10%. Hal ini dikarenakan EEP 0,00125% memiliki efek sitotoksisitas yang baik, EEP 0,4% memiliki efek yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan EEP 10% memiliki efek yang sangat toksik (Fauzi et al., 2018).
4. Bakteri kontrol *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan kota Yogyakarta.
5. Kontrol positif menggunakan bahan irigasi saluran akar yaitu *Chlorhexidine digluconate* 2% (Borzini, 2016).

6. Nilai OD (*Optical Density*) didapatkan dari pengujian dengan menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Nilai OD tersebut digunakan untuk memperkirakan jumlah populasi bakteri berdasarkan tingkat kekeruhan. Perbandingan dari OD sampel digunakan untuk mengetahui besarnya volume sampel. Jumlah populasi bakteri dipresentasikan oleh besarnya volume sampel.
7. *Preliminary* adalah studi pendahuluan yang dilakukan sebelum penelitian yang sebenarnya dengan tujuan untuk mencari waktu paparan larutan perlakuan yang tepat terhadap sampel bakteri *Enterococcus faecalis*. Lama waktu paparan larutan perlakuan ini di simbolkan dengan t . Hal yang dipertimbangkan dalam menentukan lama waktu paparan larutan perlakuan ini adalah *recovery rate* dari sampel bakteri. Pada *preliminary* ini menggunakan sampel bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dan larutan perlakuan *Chlorhexidine digluconate* 2%
8. Penentuan waktu perlakuan atau t pada penelitian pendahuluan atau *preliminary* adalah 5 menit, 1 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam. Pemilihan waktu tersebut untuk memprediksi *bacterial growing profile Enterococcus faecalis* pada *enriched media*. Pemilihan waktu 1 jam merupakan estimasi dari *initial phase (lag phase)* pada pertumbuhan bakteri. Waktu 6 jam adalah merupakan estimasi dari *exponential phase (log phase)* pada pertumbuhan bakteri. Waktu 12 jam (*over night*) merupakan *optimal growing time* atau *stationary phase* pada pertumbuhan bakteri (Nascimento et al., 2010). Pada paparan waktu 24 jam, larutan perlakuan

telah memberikan efek toksik terhadap sel fibroblas sehingga waktu tersebut dijadikan sebagai titik akhir pada paparan perlakuan (Fauzi *et al.*, 2018). Sedangkan penentuan 5 menit merupakan waktu pengkondisian yang mirip dengan kondisi paparan bahan irigasi pada saluran akar gigi.

9. *Recovery rate* adalah tingkat kemampuan bakteri dalam melakukan pemulihan setelah diberikan paparan perlakuan dalam waktu tertentu. Nilai *recovery rate* merupakan selisih antara nilai OD BHI pasca inkubasi selama 24 jam dan nilai OD pasca resuspensi BHI sebelum inkubasi selama 24 jam.
10. Media yang digunakan untuk kultur dan penyubur mikroorganisme, termasuk bakteri aerob dan bakteri anaerob adalah *Brain Heart Infusion (BHI) broth*.
11. Media yang digunakan untuk mengisolasi bakteri *Enterococcus* adalah *Slanetz and Bartley* agar.
12. Media yang digunakan untuk menguji metabolisme arginin adalah *Arginine Dehydrolase broth*. Media ini mengandung arginin dengan indikator perubahan pH. Ketika ada penggunaan arginine pada media, pH media akan naik dan indikator berubah warnanya. Perubahan warna media dari kuning ke ungu menunjukkan terjadinya metabolisme arginin pada media.
13. Sampel bakteri klinis diambil dari 1 saluran akar dengan penamaan S1, sedangkan pada bakteri kontrol *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diberi nama ATCC.

14. *ImageJ* adalah aplikasi yang digunakan untuk mengkuantifikasi data warna ke data angka.

F. Instrument Penelitian

1. Alat penelitian

- a. *Handscoon* (Sensi Gloves, Indonesia)
- b. Masker (Lab Med, Indonesia)
- c. *Incubator* (Mettler INB 200, Germany)
- d. *Spectrophotometer* (Shimadzu, Jepang) dan kuvet
- e. *Autoclave* (Hirayama HVE-50, Jepang)
- f. *Hotplate* dan *Magnetic Stirrer* (Branstead Cimarex, Malaysia)
- g. *Vortex Mixer* (Stuart Scientific, UK)
- h. *Centrifuge* (Hettich EBA 20, Germany)
- i. *Freezer* (Toshiba, Jepang)
- j. *Parafilm* (Parafilm PM996, USA)
- k. *Analytic balance* (Mettler Toledo AL-204, Switzerland)
- l. Tabung reaksi, Rak Tabung reaksi (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
- m. Glass *beaker*, Glass Ukur (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
- n. Tabung ukur (Vitlab, Jerman)
- o. Petri dish (Iwaki, Jepang)
- p. Pipet *pasteur*
- q. Lampu spirtus dan batang ose
- r. Pinset

2. Bahan penelitian

- a. Ekstrak Etanol Propolis lebah *Apis Trigona* dengan pelarut etanol 40%
- b. Bakteri sampel klinis
- c. Bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
- d. BHI *broth* (Oxoid CM 1135, UK)
- e. *Slanetz and Bartley* agar (Oxoid CM 0377, UK)
- f. *Arginine dehydrolase broth* (HiMedia M619-500G, USA)
- g. Alkohol 70% (AMS, Indonesia)
- h. Kapas dan Aquades
- i. pH *indicator strip* (Macherey-Nagel, Jerman)
- j. *Chlorhexidine digluconate* 2% (Maquira, Brazil)
- k. *Paperpoint* steril (Sure-endo, Korea)

G. Jalannya Penelitian

1. Tahap Persiapan

- a. Persiapan *ethical clearance*
- b. Persiapan ekstraksi propolis
- c. Persiapan subjek penelitian
- d. Pengambilan sampel bakteri klinis dari saluran akar
- e. Persiapan uji bakteri
- f. Persiapan media BHI *broth*
- g. Persiapan media *Arginine Dehydrolase broth*
- h. Persiapan media *Slanetz and Bartley* agar

2. Sterilisasi instrumen penelitian

- a. Sterilisasi seluruh instrumen yang akan digunakan dalam penelitian menggunakan alat sterilisator berupa *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- b. Menjaga sterilitas bahan penelitian dengan penyimpanan yang baik dan meminimalisasi kontaminasi bahan.

3. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis

- a. Propolis mentah yang diambil langsung dari peternakan lebah di Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta dan dilakukan ekstraksi propolis dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 40%.
- b. Propolis yang masih mentah dibersihkan dengan aquades steril untuk memisahkan madu dengan propolisnya. Setelah itu peras hingga propolis terpisah dari aquades yang digunakan untuk pencucian.
- c. Propolis dihancurkan hingga halus dengan menggunakan *blender*. Lakukan penimbangan kemudian masukan propolis yang sudah dihaluskan tersebut kedalam *glass beaker*.
- d. Ekstraksi propolis dengan teknik maserasi dengan menggunakan larutan etanol 40%. Propolis dicampur dengan etanol 40% lalu disimpan selama 7 hari di ruangan yang tidak ada cahaya dan dilakukan pengadukan sebanyak 2 kali dalam sehari.
- e. Penyaringan untuk memisahkan filtrat dari ampas sehingga didapatkan hanya filtratnya saja (tanpa ampas). Evaporasi

menggunakan alat *rotary evaporator* dengan tekanan kurang dari 1 atm pada suhu 45°C hingga didapatkan ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi 100% (kental).

- f. Ekstrak etanol propolis murni tersebut kemudian dibuat menjadi larutan ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi 10%, 0,4%, dan 0,00125% dengan metode pengenceran.

4. Penelitian Pendahuluan (*Preliminary*)

- a. Pembuatan *master suspensi* dengan melakukan inokulasi bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 pada media BHI broth dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37° C.
- b. Mempersiapkan tabung larutan perlakuan sebanyak 6 tabung. 1 tabung kontrol negatif berisi media BHI broth tanpa perlakuan dan 5 tabung masing-masing berisi *Chlorhexidine digluconate* 2%. Kemudian tambahkan 200 µl bakteri dari tabung *master suspensi* ke 1 tabung kontrol negatif dan 200 µl bakteri ke 5 tabung perlakuan *Chlorhexidine digluconate* 2%.
- c. 5 tabung perlakuan di inkubasi dengan suhu pada suhu 37° C selama waktu yang berbeda-beda yakni; 5 menit, 1 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam. Pada tabung kontrol negatif, dilakukan pengukuran OD terlebih dahulu untuk mendapatkan nilai kontrol populasi bakteri sebelum inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam.
- d. Setelah tabung larutan perlakuan di inkubasi selama waktu yang telah ditentukan, lakukan sentrifugasi tabung selama 5 menit dengan

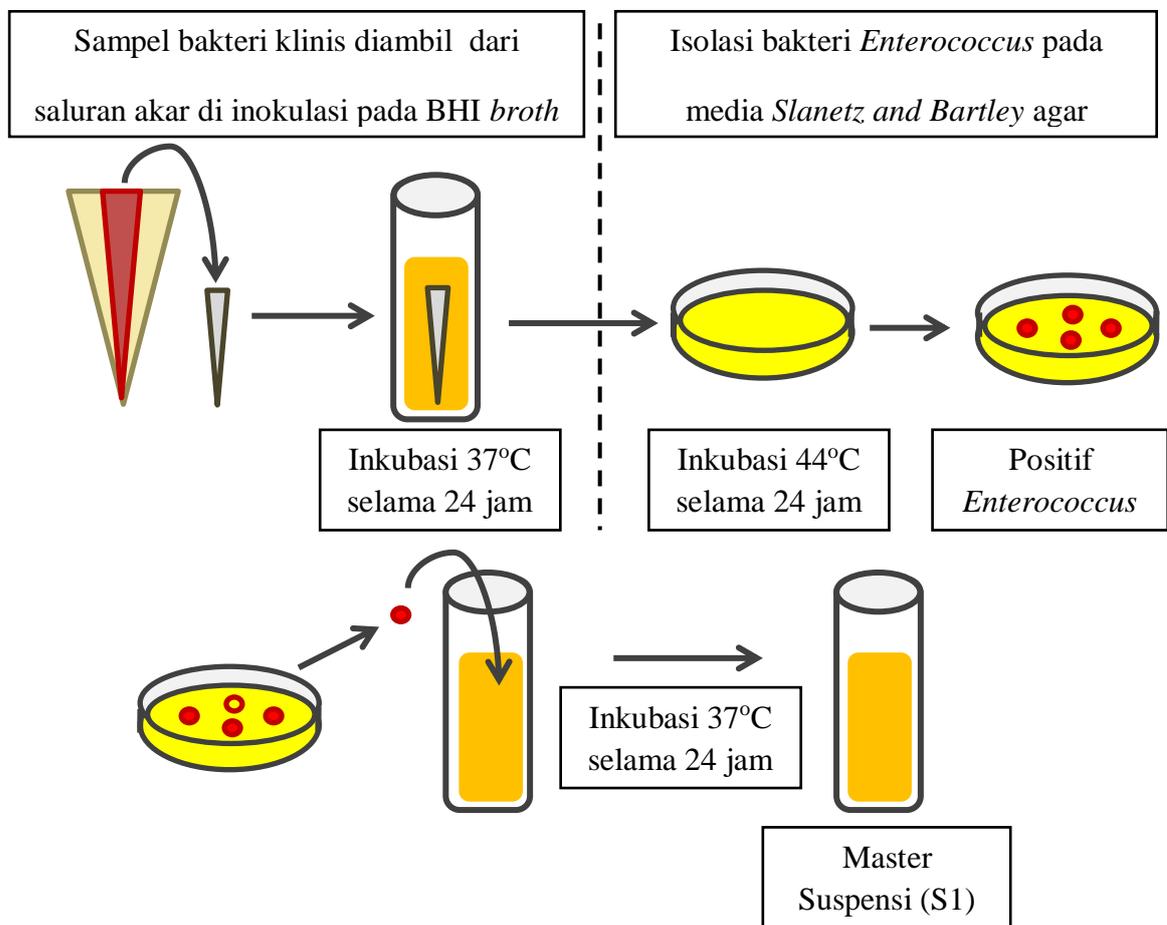
kecepatan 5000rpm untuk pengendapkan bakteri pada dasar tabung dan buang larutan perlakuan dari tabung tersebut. Isi kembali tabung tersebut dengan BHI *broth* lalu homogenisasi larutan dengan alat *vortex mixer*.

- e. Pengukuran OD larutan BHI *broth* untuk mendapatkan nilai populasi bakteri setelah terpapar larutan perlakuan atau resuspensi pasca perlakuan. Kemudian inkubasi BHI *broth* tersebut pada suhu 37° C selama 24 jam.
 - f. Setelah inkubasi 24 jam pada tabung yang berisi BHI *broth* dan bakteri, Ukur nilai OD larutan BHI *broth* untuk melihat populasi bakteri pasca inkubasi selama 24 jam.
 - g. Hasil yang diukur pada *preliminary* ini adalah selisih antara nilai OD BHI pasca inkubasi 24 jam dengan nilai OD BHI resuspensi pasca perlakuan yang menggambarkan *recovery rate* bakteri.
 - h. Mengamati hasil *recovery rate* dan menentukan lama waktu paparan larutan perlakuan (t) yang akan digunakan pada penelitian sebenarnya.
5. Pengambilan sampel bakteri
- a. Pengambilan sampel bakteri saluran akar pada penelitian ini dilakukan pada gigi pasien di RSGM UMY yang hendak melakukan tindakan perawatan saluran akar.
 - b. Pasien diberikan penjelasan mengenai tahapan prosedur pengambilan sampel bakteri saluran akar dan mengisi lembar persetujuan (*informed*

- consent*) terlebih dahulu sebelum dilakukan tindakan pengambilan sampel bakteri.
- c. Mahasiswa coas RSGM UMY melakukan tindakan *open access* dan ekstirpasi (pengambilan pulpa) kepada pasien terlebih dahulu.
 - d. Pengambilan sampel bakteri dilakukan sebelum irigasi saluran akar. Pengambilan sampel bakteri ini dengan menggunakan *paper point* steril yang dijepit oleh pinset dan di masukkan kedalam saluran akar sampai mengenai apikal konstiksi kemudian di usapkan pada dinding saluran akar saat *paper point* ditarik keluar dari saluran akar.
 - e. *Paper point* lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi BHI *broth* Kemudian inkubasi tabung reaksi yang berisi *paper point* dengan BHI *broth* tersebut dengan suhu 37° C selama 24 jam.
6. Isolasi dan pembuatan suspensi bakteri
- a. Tabung reaksi yang berisi *paper point* didalam media BHI *broth* yang telah di inkubasi selama 24 jam kemudian diamati perubahan kekeruhan pada media tersebut.
 - b. *Plating* bakteri dari media BHI *broth* tersebut ke media *Slanetz and Bartley* agar dan inkubasi dengan suhu 44° C selama 24 jam. Tujuan dari penggunaan media *Slanetz and Bartley* agar ini adalah untuk menyeleksi sampel bakteri yang diambil dari saluran akar tersebut agar didapatkan bakteri *Enterococcus*.
 - c. Melakukan pengamatan pada media *Slanetz and Bartley* agar setelah inkubasi selama 24 jam untuk melihat ada tidak nya bintik-bintik

merah tua pada media yang menandakan adanya (positif) koloni bakteri *Enterococcus*.

- d. Inokulasi koloni bakteri *Enterococcus* yang sudah di seleksi pada BHI *broth* dan inkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Ini digunakan sebagai *master suspensi* (S1) dari sampel yang nantinya akan diberi berbagai macam perlakuan.

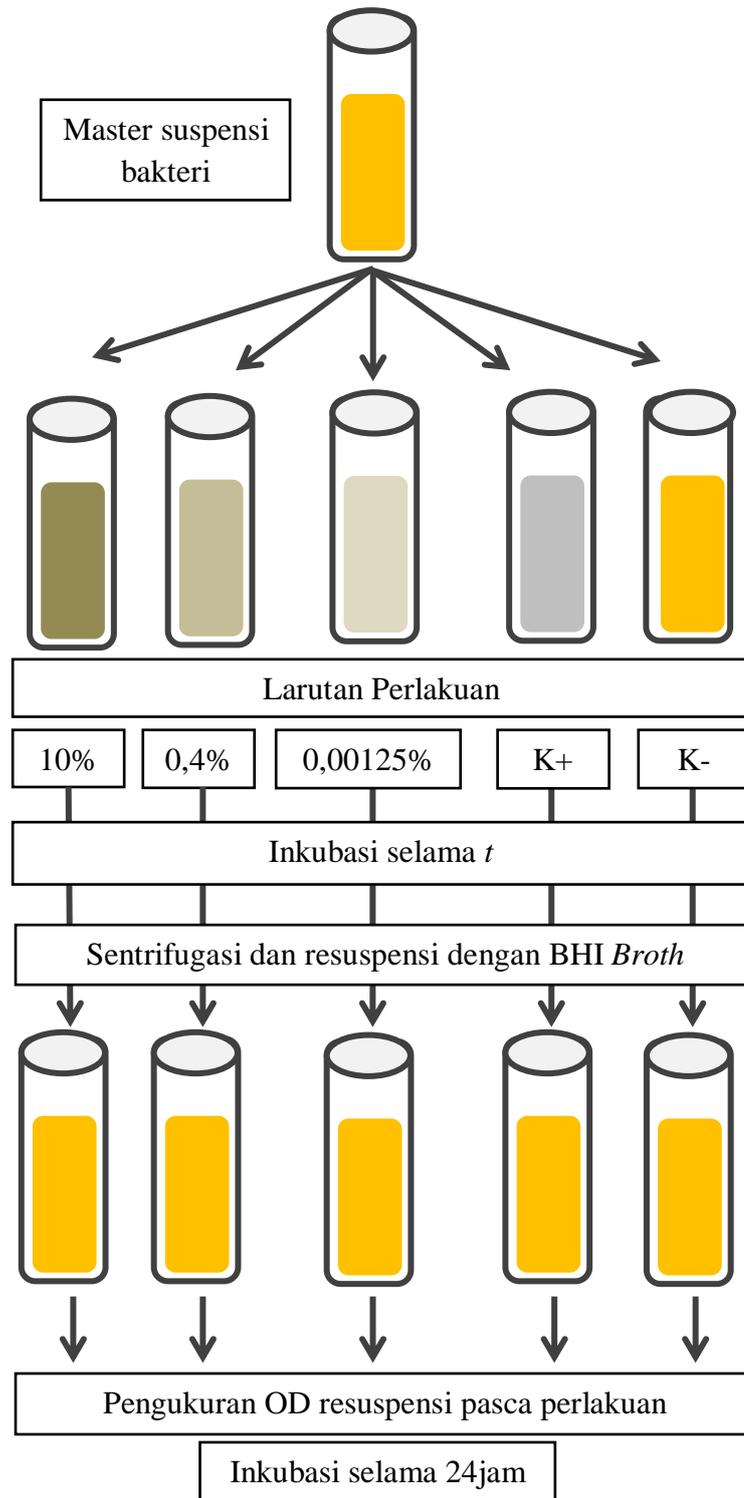


Gambar 6 : Skema isolasi sampel klinis bakteri *Enterococcus* dan pembuatan master suspensi bakteri.

7. Pemberian Larutan Perlakuan

- a. Mempersiapkan master suspensi bakteri sampel klinis (S1) dan master suspensi bakteri ATCC 29212 (ATCC).

- b. Memepersiapkan 5 tabung reaksi untuk tiap sampel bakteri (bakteri sampel klinis dan ATCC 29212) yang masing-masing berisi, larutan ekstrak etanol propolis 0,00125%, 0,4%, 10%, larutan perlakuan *Chlorhexidine digluconate* 2% sebagai kontrol positif, dan larutan BHI tanpa perlakuan sebagai kontrol negatif.
- c. Penambahan 200 μ l bakteri pada masing-masing tabung yang berisi larutan perlakuan tersebut lalu inkubasi dengan suhu 37° C selama waktu yang telah ditentukan pada *preliminary (t)*.
- d. Sentrifugasi masing-masing tabung untuk mengendapkan bakteri pada dasar tabung lalu buang larutan perlakuan dan diganti dengan BHI *broth* kemudian lakukan homogenisasi larutan dengan menggunakan *vortex* agar endapan bakteri dapat bercampur dengan BHI *broth*.
- e. Pengukuran nilai OD pasca resuspensi BHI atau sebelum inkubasi 24 pada masing-masing tabung.
- f. Inkubasi seluruh tabung yang telah di resuspensi dengan BHI *broth* selama 24 jam pada suhu 37° C.
- g. Pengukuran nilai OD pasca inkubasi 24 jam untuk melihat populasi bakteri pasca pemberian nutrisi BHI selama 24 jam.
- h. Menghitung selisih antara hasil nilai OD pasca inkubasi BHI selama 24 jam dengan nilai OD pasca resuspensi BHI sebelum inkubasi 24 jam untuk menemukan nilai *recovery rate* bakteri pada tiap tabung.



Gambar 7 : Skema pemberian larutan perlakuan dan resuspensi

8. Uji Spektrofotometer untuk menentukan populasi bakteri

5 tabung sampel bakteri pada BHI yang telah dilakukan *pre-treatment*, selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan alat spektrofotometer untuk melihat nilai *Optical Density (OD)*. Hasil pengukuran OD ini akan dijadikan acuan untuk menentukan volume bakteri yang akan digunakan untuk uji metabolisme arginin. Penentuan volume A,B,C,D dilakukan dengan perbandingan nilai OD A,B,C,D dengan nilai OD dan volume pada kontrol negatif. Volume kontrol yang akan digunakan adalah 200µl. Rumusnya adalah sebagai berikut:

$$\frac{OD_x}{Vol_x} = \frac{OD_n}{Vol_n}$$

Keterangan :

OD_x : Nilai OD pada BHI dengan perlakuan EEP 10%, 0,04%, 0,00125% dan CHX 2 %.

OD_n : Nilai OD pada BHI yang tidak diberi perlakuan. (sebagai kontrol).

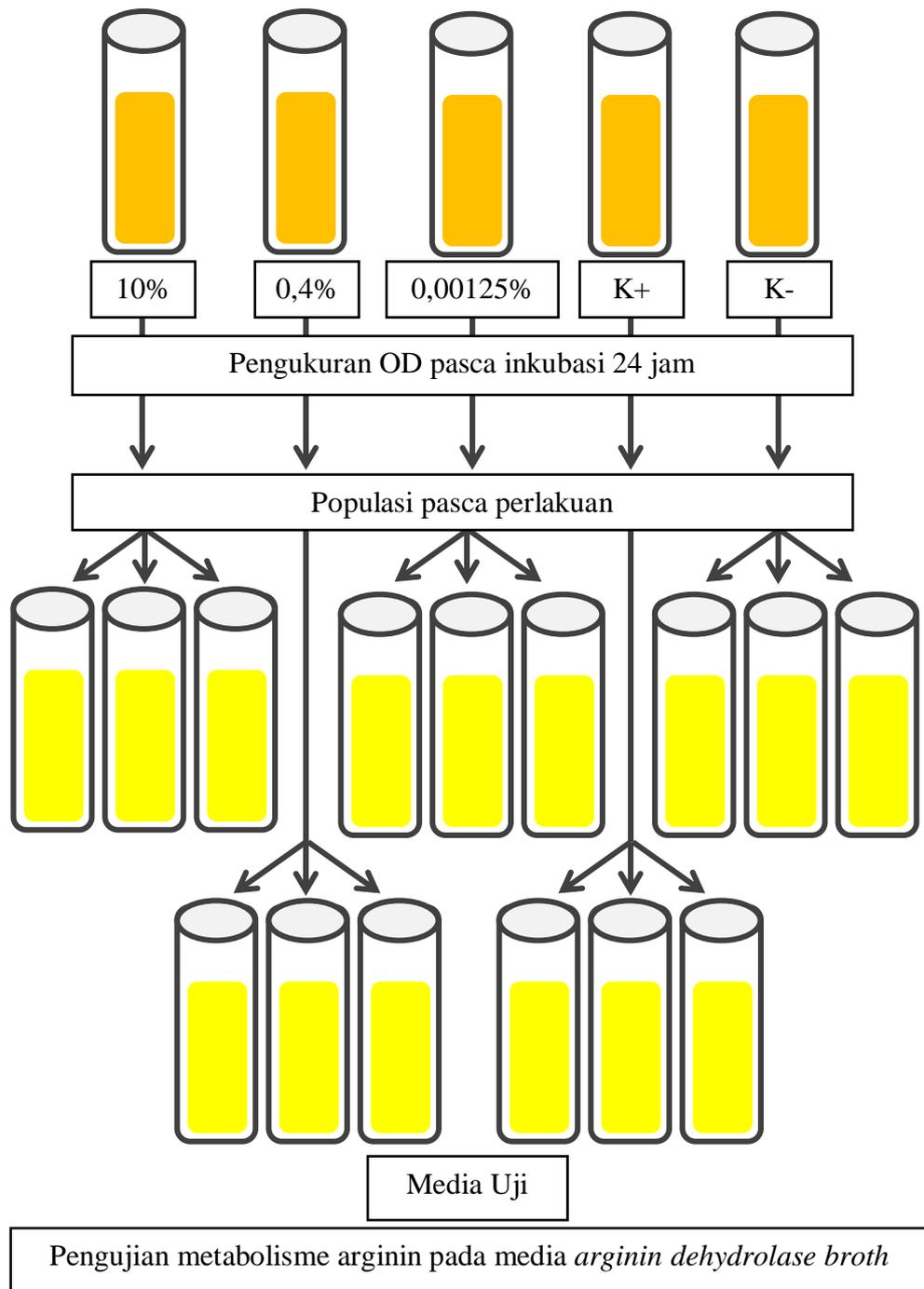
Vol_x : Volume yang akan digunakan pada BHI dengan perlakuan EEP 0,00125%, 0,4%, 10%, dan CHX 2 %.

Vol_n : Volume yang akan digunakan pada BHI yang tidak diberi perlakuan (sebagai kontrol).

9. Pengujian aktivitas metabolisme arginin

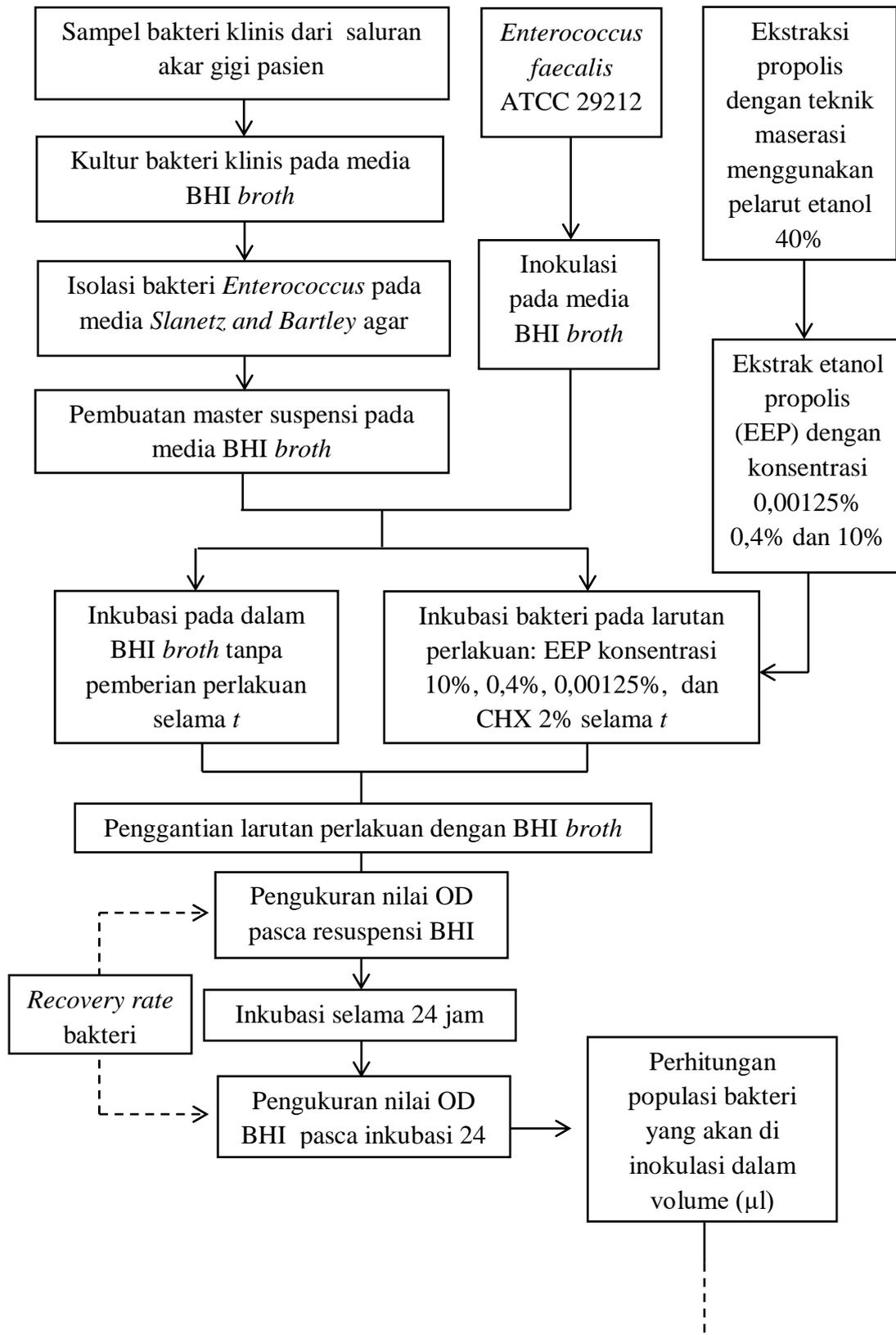
- a. Inokulum bakteri dari BHI *broth*, diambil sesuai volume yang telah ditentukan melalui perhitungan OD, lalu dipindahkan ke tabung steril yang berisi *arginine dehydrolase broth* dengan pengulangan 3 kali

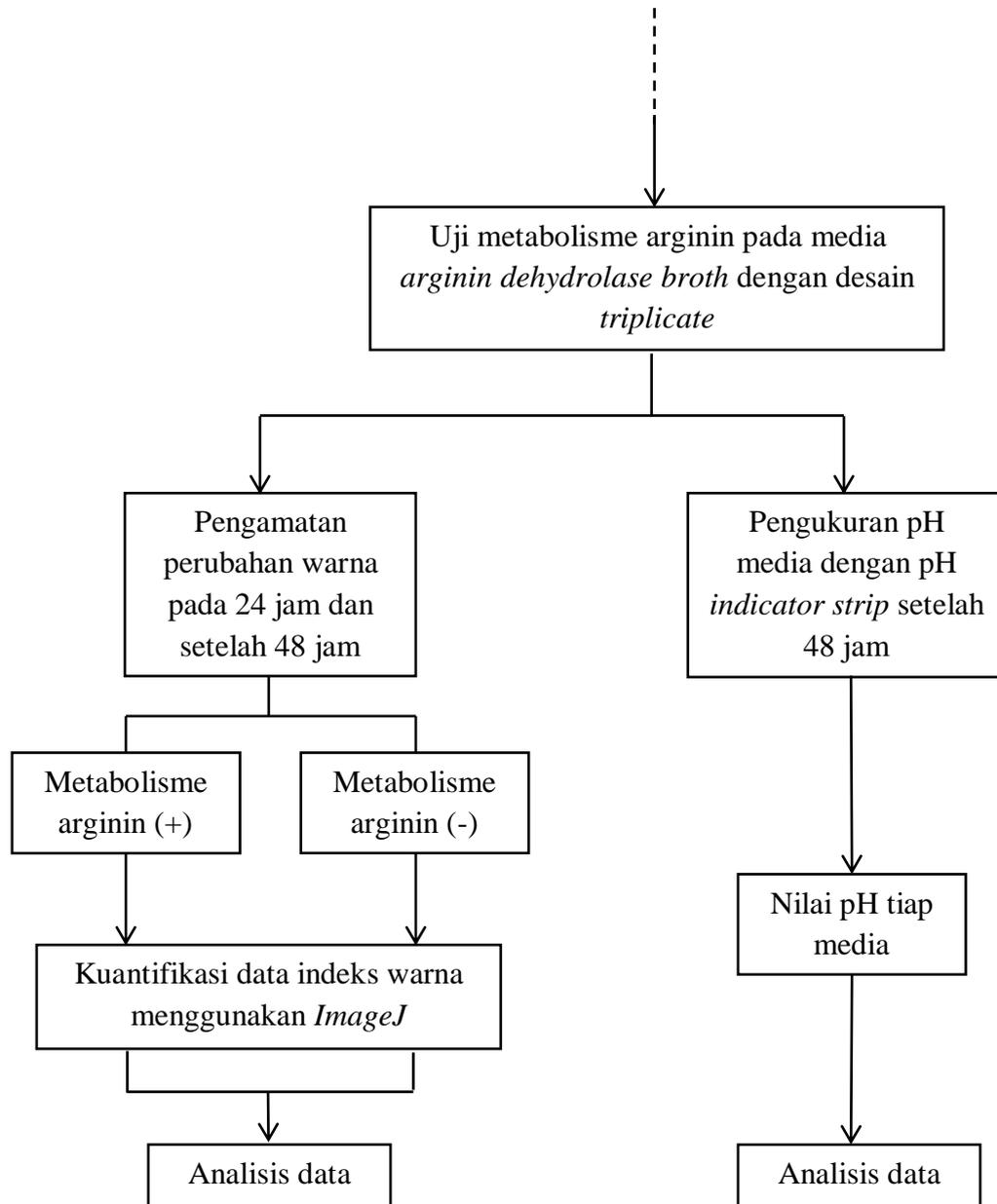
- (*triplicate*) pada tiap perlakuan. Tabung yang sudah diinokulasi tersebut lalu diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 – 48 jam.
- b. Melakukan pengamatan pada media untuk melihat ada tidaknya perubahan warna setelah 24 jam dan 48 jam. Perubahan warna dari kuning ke ungu menandakan positif terjadi metabolisme arginin pada media. Sedangkan jika tidak terjadi perubahan warna pada media (media tetap berwarna kuning) selama 48 jam, menandakan tidak terjadi metabolisme arginin pada media tersebut.
 - c. Dilakukan pengambilan gambar pada keseluruhan tabung media uji kemudian dilakukan kuantifikasi data warna menggunakan aplikasi *ImageJ*.
 - d. Untuk memastikan lebih lanjut ada atau tidaknya metabolisme arginin, dapat dilakukan dengan pengujian pH media *arginin dehydrolase* agar menggunakan pH *indicator strip*. Jika terdapat kenaikan pH pada media, menandakan positif terjadi metabolisme arginin pada media tersebut.
 - e. Pencatatan dan analisis hasil berupa perubahan warna dan perubahan pH pada media *arginine dehydrolase* agar.



Gambar 8 : Skema pengujian metabolisme arginin

H. Alur Penelitian





I. Analisis Data

1. Data akan disajikan dalam bentuk tabel deskriptif metabolisme arginin terhadap Ekstrak Etanol Propolis dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, 10%, kontrol positif, dan kontrol negatif.
2. Data kuantifikasi *ImageJ* pada tabung media uji dilakukan analisis distribusi dan normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk test* karena sampel yang di uji dalam penelitian ini kurang dari 50 sampel (<50).
3. Data kuantifikasi *ImageJ* pada tabung media uji metabolisme arginin dilakukan uji statistik *OneWay ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji lanjutan berupa LSD apabila distribusi data normal dan uji statistik non-parametrik *Kruskal-Wallis test* apabila distribusi data tidak normal.
4. Data pengukuran pH media ditampilkan dalam bentuk tabel deskriptif.