

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

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

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental murni laboratoris *in vitro*.

#### **B. Sampel Penelitian**

Subjek penelitian ini adalah *Human Dermal Fibroblast, adult* (HDFa). HDFa tersebut didapat dari Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada. Kultur sel akan diuji dengan desain *triplicate*. Sampel yang akan digunakan sejumlah 96 sumuran kultur sel.

Kriteria Inklusi :

1. Sel fibroblas adalah hasil dari kultur primer.
2. Morfologi menunjukkan sel normal dan sehat (berbentuk memanjang).

#### **C. Tempat dan Waktu**

1. Lokasi Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit III Universitas Gadjah Mada.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-April tahun 2017.

#### D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh
  - Konsentrasi ekstrak propolis *Apis trigona*
2. Variabel Terpengaruh
  - Viabilitas sel fibroblas
3. Variabel Terkendali
  - a. Spesies lebah penghasil propolis
  - b. Kontaminasi mikroorganisme pada kultur
  - c. Suhu dalam proses kultur
4. Variabel tidak Terkendali
  - a. Pakan lebah penghasil propolis
  - b. Kondisi lingkungan disekitar lebah tinggal (iklim, cuaca)
  - c. Usia propolis

#### E. Definisi Operasional

1. EEP adalah ekstrak etanol propolis. Propolis didapat dari peternakan lebah *Apis trigona* di daerah Nglipar, Gunungkidul, Daerah Istimewa Yogyakarta
2. Ekstraksi propolis menggunakan pelarut etanol 40%
3. Konsentrasi EEP yang digunakan adalah 3000; 1500; 1000; 750; 500; 375; 250; 187,5; 125; 100; 93,75; 62,5; 50; 46,875; 31,25; 25; 23,437; 15,625; 12,5; 11,718; 7,81; 6,25; 5,86; 3,9; 3,125; 1,95; 1,5625; 0,78125; 0,390625; 0,19531 µg/mL

4. Sel *Human Dermal Fibroblast adult* (HDFa) adalah kultur primer fibroblas yang diambil dari spesimen kulit orang dewasa. HDFa didapat dari LPPT unit III Universitas Gadjah Mada .
5. Uji viabilitas adalah perhitungan yang digunakan untuk menentukan persentase sel yang hidup dari keseluruhan jumlah sel.
6. *MTT assay* adalah metode kolorimetrik yang digunakan untuk menghitung viabilitas sel.
7. *ELISA reader* adalah alat yang digunakan untuk mengukur jumlah krsital formazan yang terbentuk dari reduksi substrat MTT akibat aktivitas sel yang hidup
8. Hasil pengukuran ELISA reader dinyatakan dalam bentuk absorbansi.

## **F. Instrumen Penelitian**

1. Alat
  - a. *Vacum rotary evaporator*
  - b. *Homogenizer* (Ultra Turrax, China)
  - c. Oven
  - d. Penyerbuk
  - e. Inkubator CO<sub>2</sub> (Mettler, Germany)
  - f. *96-well plate*
  - g. Flask
  - h. *ELISA Reader* (Bio-Rad, USA)
  - i. *Inverted microscope* (Leica, Germany)

j. *Laminar Flow Hood*

k. Tabung *centrifuge*

l. *Centrifuge*

## 2. Bahan

a. Propolis

b. Etanol 40%

c. Aquades

d. *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) (Gibco, USA)

e. *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) medium (Gibco, USA)

f. *Fetal bovine serum* (Gibco, USA)

g. Penstrep

h. Fungizone

i. Tripsin-EDTA 0,25%

j. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
*bromide*] 100µl

k. *Stop Solution*

l. DMSO (*dimethyl sulfoxide*)

## G. Cara Kerja

### 1. Pembuatan EEP *Apis trigona*

Propolis *Apis trigona* didapat dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunungkidul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Pembuatan EEP dilakukan dengan metode maserasi. Pertama kali propolis mentah dipotong tipis. Propolis yang telah dipotong tipis ditambahkan etanol

40% lalu diblender selama 3 menit. Langkah selanjutnya dilakukan pengadukan menggunakan *homogenizer* selama 30 menit, diamkan selama 48 jam, kemudian disaring sebanyak dua kali untuk memisahkan filtrat dari ampasnya. Uapkan filtrat menggunakan oven yang diatur pada suhu 45°C sambil diaduk sesekali hingga didapat EEP murni.

## 2. Pembiakan kultur fibroblas

Sel dikultur pada flask hingga mencapai konfluensi 80-90%. Buang medium yang ada pada flask, kemudian masukan dalam flask medium tanpa FBS. Kemudian goyang flask untuk menghilangkan sisa-sisa FBS yang masih menempel pada sel. Tambahkan tripsin-EDTA 0,25% 1-2 mL Diamkan sebentar, kalau sel sudah lepas dari dasar flask (membulat). Masukan ke tabung *centrifuge*, tambahkan medium sampai penuh. Centrifuge selama 10 menit dengan kecepatan 1500 rpm hingga terbentuk pelet dan supernatan. Buang supernatan dan biarkan pelet, tambahkan 1 mL medium komplit dihomogenkan. Hitung sel yang didapat, sel siap diberi perlakuan

## 3. Perlakuan Pemberian EEP

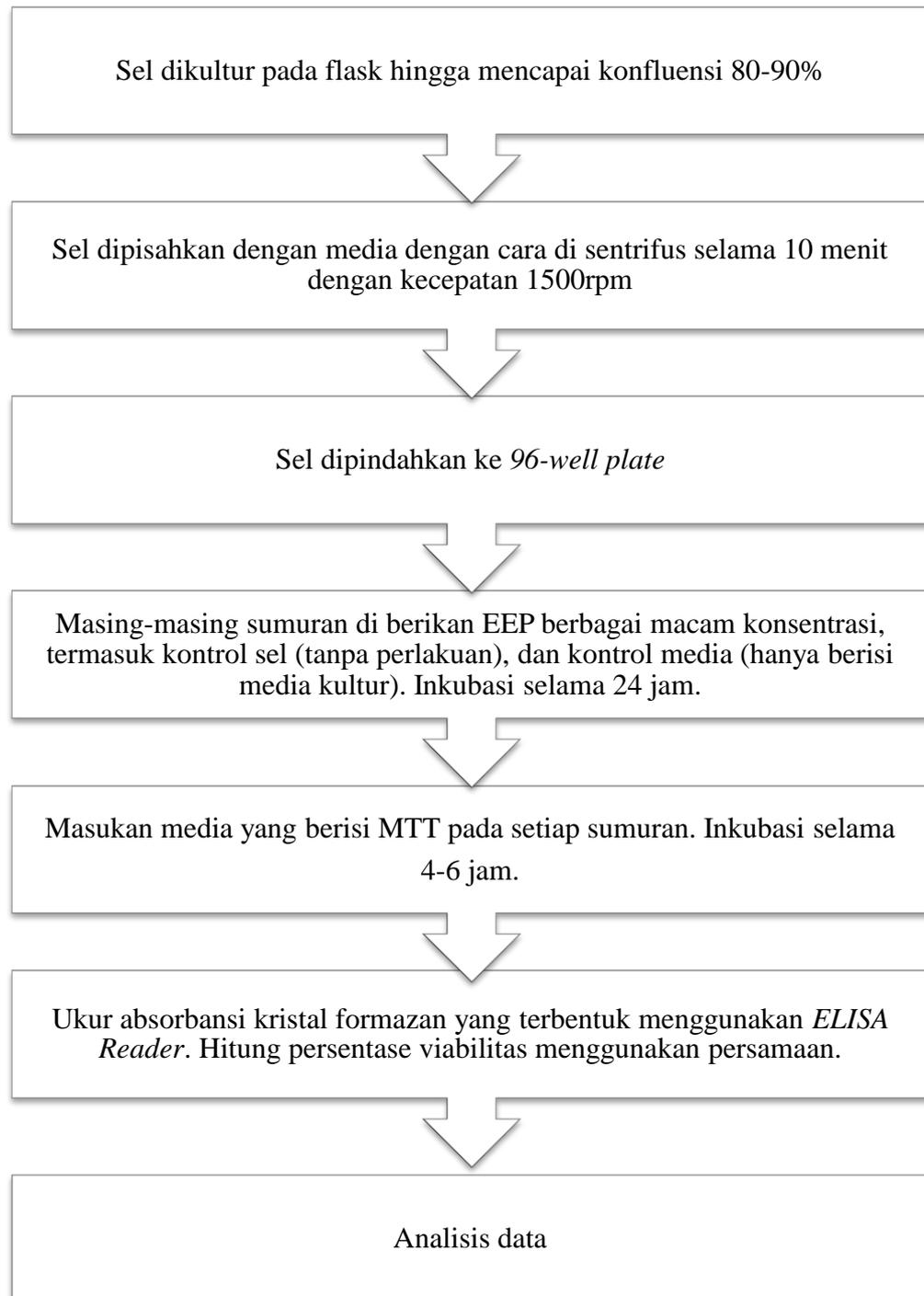
Pada plate 96 well, menambahkan masing-masing sebanyak 100  $\mu\text{L}$  suspensi sel dengan kepadatan  $2 \times 10^4$  sel/*well* kemudian didiamkan selama 1-2 jam. Ekstrak dengan berbagai konsentrasi dosis ditambahkan sebanyak 100  $\mu\text{L}$ . Inkubasi dalam inkubator CO<sub>2</sub> selama 24 jam (kadar CO<sub>2</sub> 5%, suhu 37°C, kelembaban 98%), setelah 24 jam

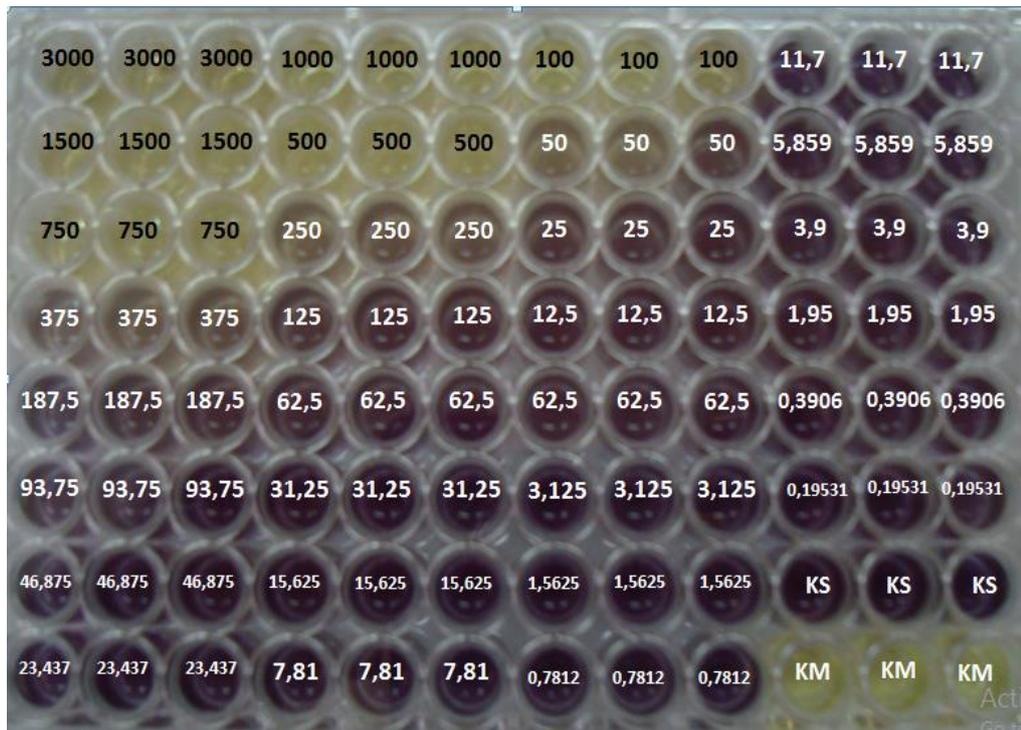
dilihat dibawah mikroskop dan difoto. Setelah itu medium yang ada dibuang dengan cara membalik 96 well plate pada kertas tissue. Menambahkan 100  $\mu$ L MTT (5mg MTT + 9ml medium RPMI komplet/medium penumbuh) pada masing-masing well. Inkubasi selama 4-6 jam lalu menambahkan *stop solution* 100  $\mu$ L pada masing-masing well. Inkubasi over night kemudian 96-well plate dibaca absorbansi setiap sumurannya pada ELISA reader panjang gelombang 550 nm. Pembacaan dengan ELISA Reader akan menghasilkan angka absorbansi tiap sumuran.

#### H. Analisa Data

Analisa data diawali dengan melakukan uji normalitas Shapiro-Wilk, dilanjutkan dengan uji korelasi antara konsentrasi EEP yang diberikan dan viabilitas fibroblas yang diperoleh.

## I. Skema Penelitian





**Gambar 7. Konsentrasi EEP yang diberikan setiap 3 sumuran.  
KS=Kontrol Sel; KM=Kontrol Media.**