

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*.

B. Sampel Penelitian

1. **Bahan uji** yang digunakan adalah ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) dengan 5 konsentrasi yaitu 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%.
2. **Bakteri uji** yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* yang didapat dari BLK Yogyakarta.
3. Percobaan dilakukan pengulangan tiga kali (*triplicate design*) sebagai kontrol terhadap bias perlakuan.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

1. Tempat Penelitian

- a. Propolis (*Apis Trigona*) diperoleh dari Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta Indonesia dengan cara maserasi.
- b. Pembuatan ekstrak propolis *Apis Trigona* dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- c. Bakteri yang akan diujikan dalam penelitian ini adalah *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang diperoleh di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta.
- d. Pelaksanaan uji aktivitas proteolitik ekstrak etanol propolis (*Apis Trigona*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September 2017 sampai dengan bulan November 2017.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

EEP (*Apis Trigona*) dengan 5 konsentrasi yaitu 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%.

2. Variabel Terpengaruh

Aktivitas proteolitik bakteri *Enterococcus faecalis* pada media agar BHI dengan gelatin.

3. Variabel Terkendali

- a. Jenis propolis (*Apis Trigona*)
- a. Konsentrasi ekstrak etanol propolis
- b. Suhu inkubator inokulasi bakteri (pretreatment) 37° C
- c. Suhu incubator uji hidrolisis gelatin 35° C
- d. Suhu freezer 4° C
- e. Jenis media pertumbuhan bakteri BHI (*Brain Heart Infusion*)
- f. Bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

E. Definisi Operational

1. EEP: Ekstrak Etanol Propolis.
2. Ekstrak etanol : pelarut ekstrak menggunakan etanol dengan konsentrasi 40%.
3. Teknik ekstraksi yang digunakan : mengacu pada teknik ekstraksi yang dilakukan oleh Bart (2011) dengan sedikit modifikasi yaitu pada pencucian simplisia.

4. Konsentrasi EEP yang akan digunakan sebagai perlakuan : 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%. Konsentrasi EEP 1% setara dengan 10.000 µg/ml dalam 1 ml media kultur.
5. Inokulasi awal *Enterococcus faecalis* : 1.2×10^4 CFU/ml mengacu pada Maier (2009).
6. Bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diperoleh di Balai Laboratorium Kesehatan (BLK).
7. Media yang digunakan adalah BHI dan gelatin powder.
8. Kontrol negatif menggunakan aquadest steril.
9. Kontrol positif menggunakan antibiotik Ampicillin.
10. OD adalah *optical density*.
11. Nilai OD didapatkan dari pengujian menggunakan *UV-mini spektrofotometer* dengan panjang gelombang yang digunakan 600 nm.
12. Nilai OD merupakan estimasi jumlah populasi bakteri yang didasarkan pada tingkat kekeruhan.
13. Besarnya volume sampel didapatkan dari perbandingan OD sampel.
14. Besarnya volume merepresentasikan jumlah populasi bakteri.
15. Pengamatan aktivitas proteolitik dilakukan pada puncak fase eksponensial.
16. Volume liquifaksi merupakan jumlah total hasil pencairan media gelatin yang didapatkan setelah fase eksponensial

F. Instrument Penelitian

1. Alat penelitian
 - a. Spektrofotometer *UVmini-1240* (*Shimadzu*, Japan)
 - b. Sduit injeksi *OneMed 3cc*
 - c. Inkubator *Bacteriological BE 200* (*Memmert*, Jerman)
 - d. Pipet dan mikropipet (*Pyrex* dan *Soccerex*, Swiss)
 - e. Anaerobic jar
 - f. Neraca analitik AL204 Min. 0,01 gr (*Mettler Toledo*, Europe)
 - g. Rak tabung dan tabung reaksi *Pyrex*
 - h. Labu Erlenmeyer *Pyrex*
 - i. Autoclave *HiclaveHVE 50* (*Hirayama*, Japan)
 - j. Freezer *Sanyo*
 - k. Handscone dan masker *OneMed*
 - l. Stirer *Barnstead Thermolyne* (*Cimarec*, USA)
 - m. Sentrifuge D-78532 *Tuttlingen –EBA 20* (*Hettich*, Jerman)
2. Bahan penelitian
 - a. EEP berbagai konsentrasi
 - b. Strain bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
 - c. Agar gelatin
 - d. Media *Brain Heart Infusion*
 - e. Aquadest steril (*Brataco*)

f. Antibiotik Ampicillin

G. Jalanannya Penelitian

1. Tahap persiapan

a. Persiapan subjek penelitian

- Mempersiapkan *ethical clearance*
- Mempersiapkan media dan bakteri uji.

b. Sterilisasi alat

Alat uji bakteri yang terbuat dari kaca disterilkan dengan *autoclave* pada suhu 121 °C selama 20 menit.

2. Pembuatan EEP (*Apis Trigona*)

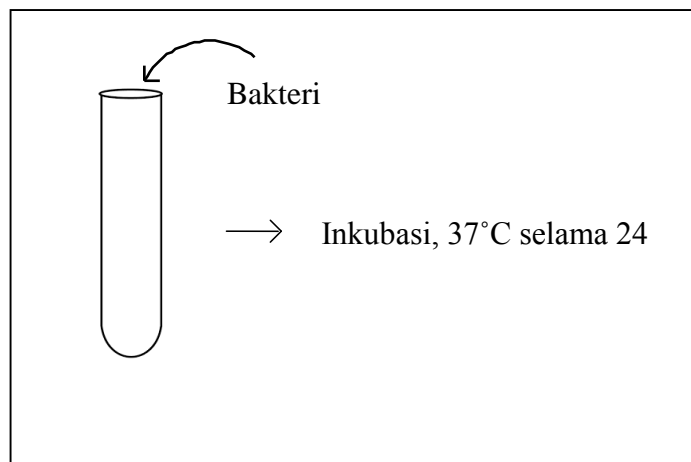
Pembuatan EEP dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Propolis mentah diambil dari peternakan di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Propolis dengan berat 3 kg yang sudah dipilih dibersihkan dengan aquadest steril kemudian diperas sehingga air cucian terpisah dengan propolis. Selanjutnya propolis yang dibersihkan dibiarkan sampai kering pada suhu kamar dan kemudian dihaluskan hingga menjadi partikel-partikel kecil. Setelah itu dilakukan penimbangan dan dimasukkan ke dalam gelas beaker. Dilanjutkan proses maserasi selama 7 hari yaitu dengan penambahan etanol 40% pada propolis, pengadukan dilakukan setiap 2 kali sehari dan disimpan dalam ruangan gelap tidak terkena cahaya.

Tahap selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrate dari ampas ke dalam labu Erlenmeyer. Hasil penyaringan dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 45° dengan tekanan vakum ($<1\text{atm}$) sehingga diperoleh EEP kental dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan sebagai bahan penelitian, larutan induk ekstrak propolis diencerkan dengan aquabides steril.

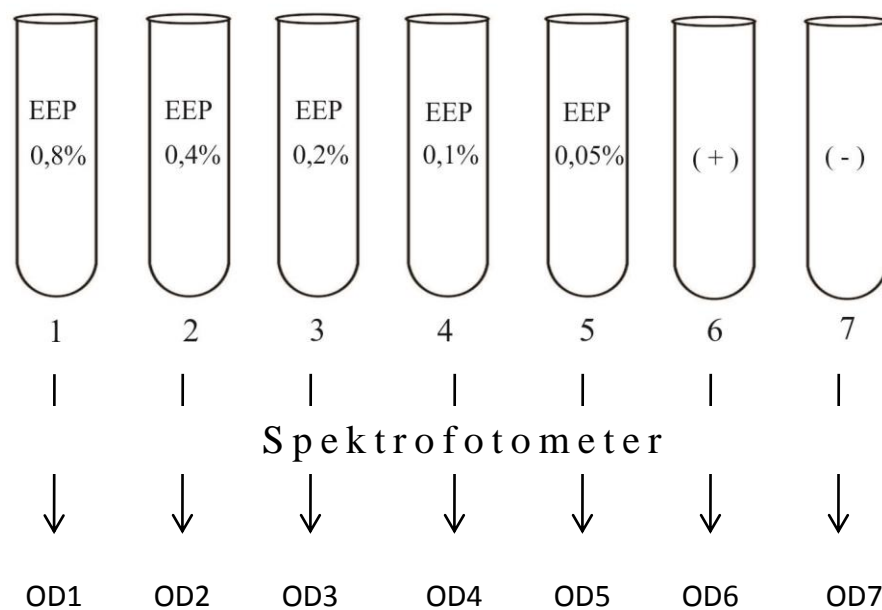
Ekstrak disimpan dalam botol gelap pada tempat teduh terlindung dari cahaya matahari secara langsung agar ekstrak dapat bertahan lama. Dapat pula disimpan dalam freezer bersuhu -30°C dan ketika akan digunakan dikeluarkan dari freezer.

3. Pembuatan suspensi bakteri *Enterococcus faecalis*

Suspensi dibuat dengan menggunakan beberapa lidi steril untuk mengambil bakteri *Enterococcus faecalis*, selanjutnya dimasukkan ke dalam 25 ml media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .



Gambar 1. Tahap pembuatan suspensi bakteri

Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis*4. Pengukuran *Optical Density* (OD)Gambar 2. Tahap pengukuran *Optical Density*

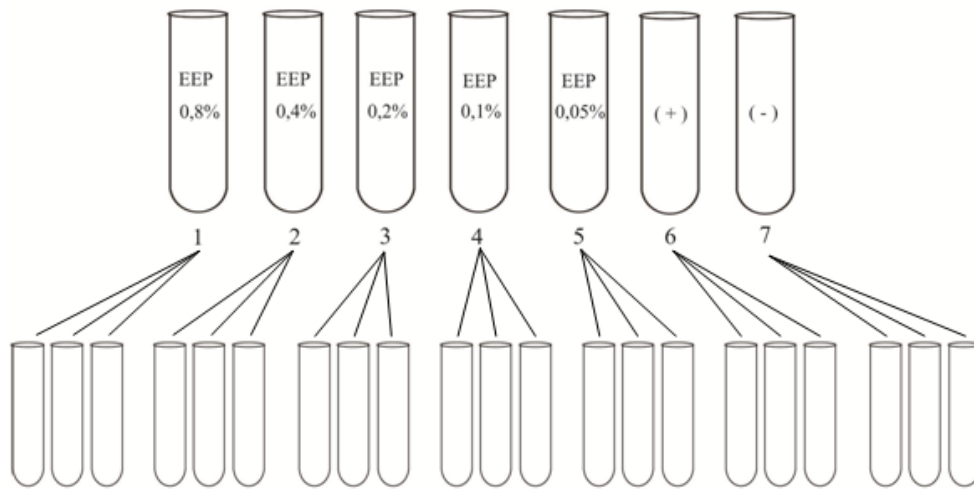
Keterangan :

Tabung 1 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + EEP 0,8%Tabung 2 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + EEP 0,4%Tabung 3 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + EEP 0,2%Tabung 4 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + EEP 0,1%Tabung 5 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + EEP 0,05%Tabung 6 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + Ampicillin

Tabung 7 : Media BHI + Bakteri *Enterococcus Faecalis* + Aquadest

Mempersiapkan 7 tabung berisi bakteri dan media *Brain Heart Infusion*, tabung pertama sebagai kontrol negative hanya berisi bakteri dan media cair BHI, tabung kedua ditambah dengan Ampicillin sebagai kontrol positif, dan untuk 5 tabung berikutnya diisi dengan EEP masing-masing dengan konsentrasi 0,8%, 0,4%, 0,2%, 0,1%, 0,05%. Semua tabung dimasukkan kedalam anaerobic jar dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) menggunakan alat *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 600 nm. Hal ini bertujuan untuk mengetahui nilai OD pada ekstrak sebelum dilakukan intervensi pada tabung yang berisi gelatin, dan digunakan sebagai acuan dalam menentukan volume yang akan diinjeksikan kedalam media agar BHI dengan gelatin, yang dilakukan dengan perbandingan nilai OD. Melakukan hal yang sama pada 2 tabung yang berisi kontrol positif dan kontrol negatif.

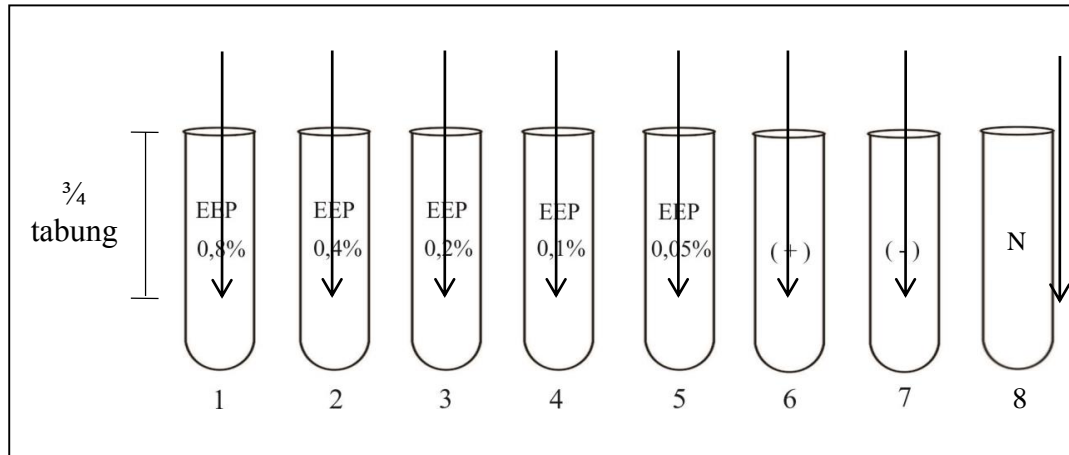
Tahap selanjutnya, setelah didapatkan volume injeksi bakteri dari perbandingan nilai OD dari kelima tabung berisi konsentrasi EEP berbeda dan 2 tabung yang berisi kontrol negatif dan kontrol positif dilanjutkan dengan menyiapkan 8 tabung untuk uji hidrolisa gelatin yang berisi bakteri yang telah diberikan pretreatment EEP dan nutrient gelatin. Masing-masing tabung akan diuji dengan 3 kali pengulangan sehingga dibutuhkan sebanyak 24 tabung.



Gambar 3. Tabung untuk *triplicate* desain uji hidrolisa gelatin

3. Uji Hidrolisa Gelatin

Pada tahap ini, volume bakteri yang telah didapatkan dari perbandingan OD diinjeksikan dengan menggunakan spuit ke dalam media semi padat yang mengandung gelatin, kurang lebih dengan kedalaman $\frac{3}{4}$ tabung. Semua tabung dimasukkan ke dalam anaerobic jar dan diinkubasikan pada suhu 35° C. Selanjutnya mengamati kemampuan mikroorganisme mencairkan gelatin dengan memasukan semua tabung ke dalam refrigerator selama 1 jam. Kemudian ukur likuifaksi gelatin menggunakan *sliding caliper*. Hasil pengukuran dicatat dan dianalisis.



Gambar 4. Uji hidrolisa gelatin

Keterangan :

Tabung 1 : Bakteri pretreatment (EEP 0,8% + media BHI) + Gelatin

Tabung 2 : Bakteri pretreatment (EEP 0,4% + media BHI) + Gelatin

Tabung 3 : Bakteri pretreatment (EEP 0,2% + media BHI) + Gelatin

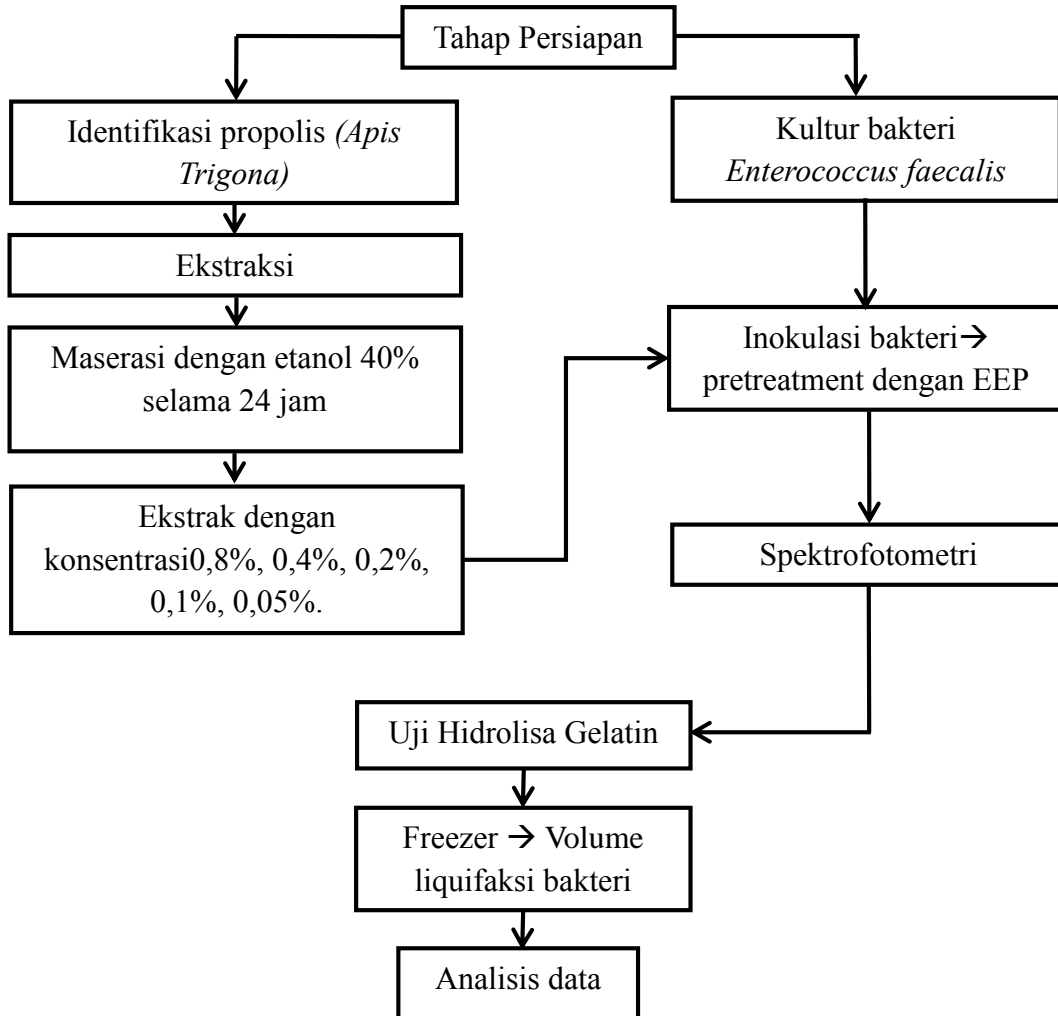
Tabung 4 : Bakteri pretreatment (EEP 0,1% + media BHI) + Gelatin

Tabung 5 : Bakteri pretreatment (EEP 0,05% + media BHI) + Gelatin

Tabung 6 : Bakteri pretreatment (Ampicillin + media BHI) + Gelatin

Tabung 7 : Bakteri pretreatment (Aquadest + media BHI) + Gelatin

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji *Pearson* untuk mengetahui adanya korelasi antara tingkat likuifaksi gelatin dengan ekstrak etanol propolis (EEP) berbagai konsentrasi. Untuk pengujian normalitasnya digunakan uji Shapiro-Wilk karena sampel yang diujikan <50.