

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental laboratoris *in vitro*. Rancangan penelitian yang digunakan adalah post-test kelompok tunggal.

B. Tempat dan Waktu

1. Tempat : Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Waktu : Oktober 2016 – Desember 2016.

C. Sampel Penelitian

1. Bahan uji yang digunakan adalah EEP *Apis Trigona* yang diperoleh dari peternakan *Apis Trigona* di Nglipar, Gunung Kidul, Daerah Istimewa Yogyakarta dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; dan 0,05%. Ekstrak akan dibuat di Laboratorium Teknologi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
2. Bakteri yang diujikan dalam penelitian ini adalah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan kota Yogyakarta.

3. Percobaan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali (*triplicate*) sebagai kontrol bias perlakuan.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Ekstrak Etanol Propolis *Apis Trigona* dengan konsentrasi 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; dan 0,05%.

2. Variabel Terpengaruh

Laju pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media *Tryptose Phosphate Broth*.

3. Variabel Terkendali

- a. Jenis propolis (*Apis Trigona*)
- b. Konsentrasi ekstrak etanol propolis
- c. Waktu pengamatan bakteri setiap 6 jam
- d. Suhu inkubator 37°C
- e. Jenis medium (*Tryptose Phosphate Broth*)
- f. Kontrol positif antibiotik *Doxycycline* 0,2 µg
- g. Kontrol negatif aquades steril
- h. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

4. Variabel tidak Terkendali

- a. Usia penyimpanan propolis

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak merupakan zat yang dihasilkan dari proses ekstraksi menggunakan etanol 40%, dengan cara mengambil senyawa kimia yang terdapat pada bahan mentah.
2. Teknik ekstraksi yang digunakan dalam penelitian diadaptasi dari Bart (2011) dan diberi sedikit modifikasi dengan cara diblender hingga menjadi bagian-bagian kecil.
3. Ekstrak Etanol Propolis merupakan hasil pemisahan antara struktur fisik propolis dengan senyawa kimia propolis dengan menggunakan etanol 40%.
4. Konsentrasi 1% setara dengan 10.000 µg/ml.
5. Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (dari *sulcus gingiva*) diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Kota Yogyakarta.
6. Waktu interval pengukuran laju pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* selama 6 jam mengacu pada (Madianos, 1996).
7. Laju pertumbuhan diukur melalui tingkat turbiditas menggunakan spektrofotometer untuk mendapatkan OD dengan panjang gelombang 600 µm.
8. Antibiotik yang digunakan *Doxycycline* 0,2 µg mengacu pada Grenier dkk (2003).
9. Formulasi media *Tryptose Phosphate Broth* : *Tryptose* (20 g); *Glucose* (2 g); *Sodium Chloride* (5 g); *Disodium hydrogen phosphate* (2,5 g).

F. Instrumen Penelitian

1. Alat Penelitian

- a. Bejana Ekstraksi
- b. Spektrofotometer



Gambar 7. Spektrofotometer UVmini-1240 (Shimadzu, Australia)

- c. Spuit injeksi
- d. Inkubator CO₂
- e. Mikroskop
- f. Pipet dan mikropipet
- g. *Anaerobic jar*



Gambar 8. Anaerobic jar

- h. Rak tabung dan tabung reaksi
 - i. Labu Erlenmeyer
 - j. Blender
 - k. *Autoclave*
 - l. Kertas saring
 - m. *Rotary Evaporator*
 - n. *Freezer* suhu -30°C
 - o. Handscoon
 - p. Masker
2. Bahan Penelitian
- a. EEP *Apis Trigona* dengan berbagai konsentrasi
 - b. Strain *Porphyromonas gingivalis*
 - c. Etanol 40%
 - d. Aquades
 - e. Antibiotik *Doxycycline* $0,2\ \mu\text{g}$
 - f. *Tryptose Phosphate Broth*

G. Jalannya Penelitian

- 1. Tahap Persiapan
 - a. Persiapan subjek penelitian
 - 1) Mempersiapkan *ethical clearance*
 - 2) Mempersiapkan media biakan dan bakteri uji
 - 3) Melakukan uji turbiditas dengan spektrofotometer pada EEP dan filtrat pencucian dengan aquades.

b. Persiapan alat dan bahan

c. Sterilisasi alat

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

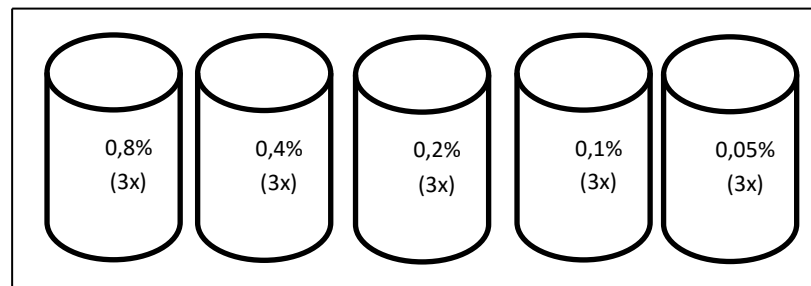
2. Pemiakkan Bakteri

Beberapa koloni bakteri diambil dari strainnya, kemudian dimasukkan pada *Tryptose Phosphate Broth* dengan cara menginjeksikannya. Bakteri dimasukkan ke dalam inkubator CO₂ dan diinkubasi dalam suhu 37°C.

3. Pembuatan ekstrak etanol propolis *Apis Trigona*

Pembuatan EEP dilakukan dengan metode maserasi. Propolis mentah diambil dari peternakan di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Pertama kali propolis mentah sebanyak 900 gram dibersihkan dengan aquades steril kemudian diperas sehingga air cucian terpisah dengan propolis. Selanjutnya, propolis dipotong tipis dan ditambahkan etanol 40% sebanyak 8000 ml. Blender selama 3 menit. Propolis kemudian diaduk dengan *ultra turaq* selama 30 menit, didiamkan selama 48 jam kemudian disaring (diulangi 2 kali). Filtrat diuapkan dengan oven bersuhu 45°C sambil diaduk sesekali. Sehingga didapatkan EEP 100% dengan berat 52,58 gram. Proses pembuatan ekstrak dikerjakan oleh petugas Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT). Ekstrak yang diperoleh disimpan di dalam *freezer*.

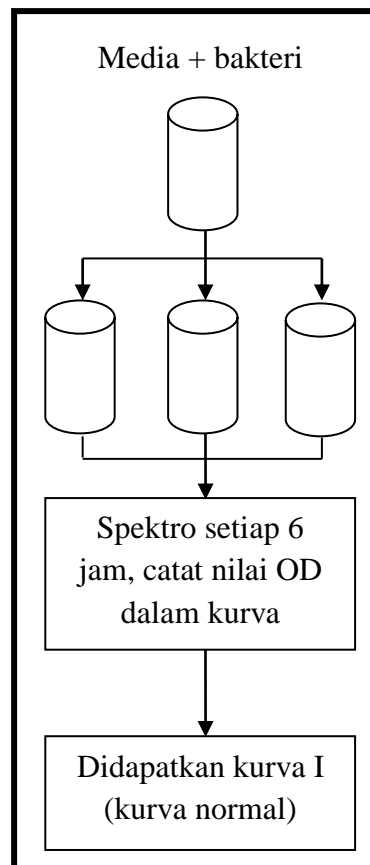
EEP *Apis Trigona* kemudian dibuat alikuot dalam 36 tabung dengan konsentrasi tiap-tiap 3 tabung adalah 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; dan 0,05%. Selanjutnya semua alikuot disimpan dalam *freezer* bersuhu -30°C dan ketika akan digunakan, alikuot dikeluarkan dari *freezer*.



Gambar 9. Alikuot berisi konsentrasi EEP berbagai konsentrasi

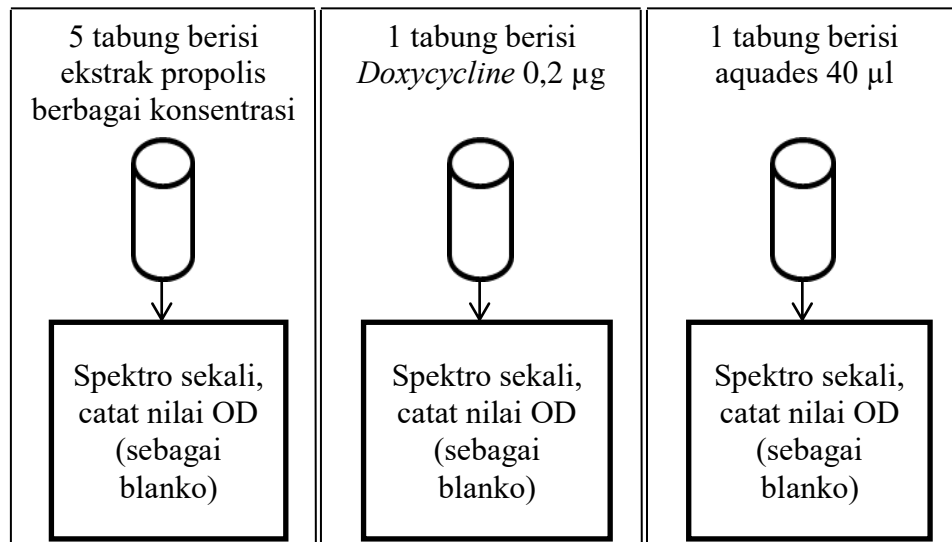
4. Pembuatan kurva kontrol

Bakteri pada media Tryptose Phosphate Broth dibuat 3 tabung salinan atau *triplicate* kemudian dilakukan uji spektrofotometri untuk mengetahui laju pertumbuhan dengan cara setiap 6 jam bakteri dilakukan spektrofotometri untuk mendapatkan OD hingga mendapatkan *peak* dari kurva pertumbuhan bakteri. Hasil dari uji spektrofotometri dibuat kurva laju pertumbuhan dengan sumbu x menandakan waktu (t) dan sumbu y menandakan OD



Gambar 10. Skema Pembuatan Kontrol Normal 1

Tahap selanjutnya adalah menyiapkan 5 tabung aliquot berbagai konsentrasi untuk dilakukan pengamatan menggunakan spektrofotometri. Setiap nilai OD yang muncul dicatat dan digunakan sebagai blanko. Melakukan hal yang sama pada 2 tabung yang berisi kontrol positif dan kontrol negatif.



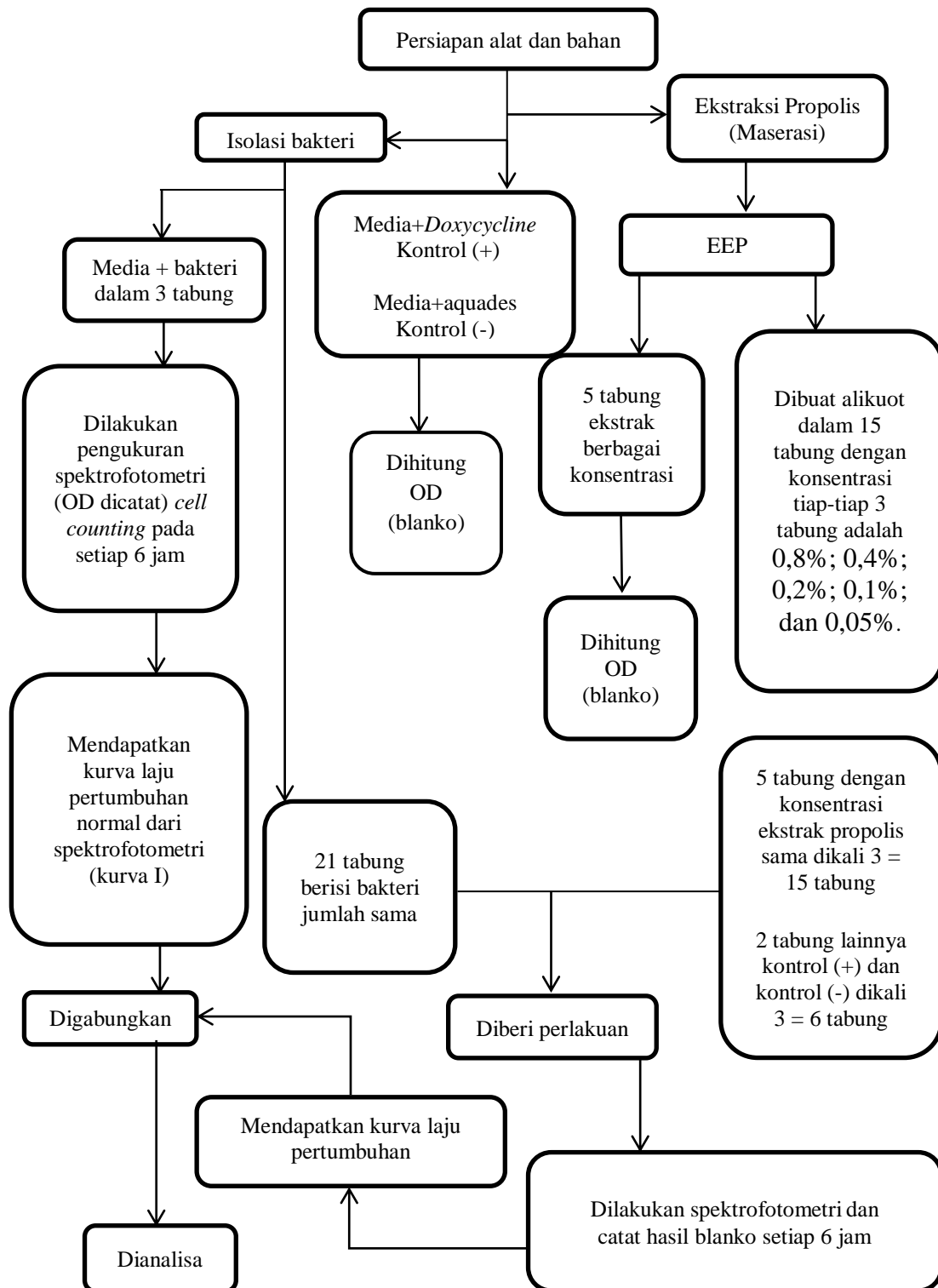
Gambar 11. Skema Pembuatan Kontrol Normal 2

5. Pengujian bakteri

Sebanyak 5 tabung berisi media *Tryptose Phosphate Broth* 4,8 ml diisi dengan EEP masing-masing 0,8%; 0,4%; 0,2%; 0,1%; dan 0,05%. Masing-masing tabung akan diuji dengan 3 kali pengulangan sehingga dibutuhkan 15 tabung. Kemudian 3 tabung berisi media *Tryptose Phosphate Broth* 4,8 ml berikutnya diisi dengan antibiotik *Doxycycline* dengan berat 0,2 µg sebagai kontrol positif. Kemudian 3 tabung berisi media *Tryptose Phosphate Broth* 4,8 ml yang kedua diisi dengan aquades sebanyak 200 µl sebagai kontrol negatif. Bakteri diinokulasi pada media *Tryptose Phosphate Broth* 4,8 ml sebanyak 200 µl pada 21 tabung dengan jumlah yang sama. Setelah semua tabung siap, dilakukan pengukuran OD setiap 6 jam dengan spektrofotometer. Hasil dari perhitungan dikonversikan ke dalam kurva dengan catatan OD perlakuan dikurangi dengan OD blanko untuk validasi hasil OD.

Setiap kurva perlakuan yang dicatat digabungkan dengan kurva kontrol (kurva I) lalu diamati pada interval waktu yang sama yaitu pada saat pertumbuhan bakteri berada pada fase *exponential*.

H. Alur Penelitian



Gambar 12. Alur Penelitian

I. Analisis Data

Data hasil penelitian adalah nilai kurva hasil pengamatan yang akan dimasukkan kedalam file komputer dan disajikan dalam bentuk tabel. Data dari kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji Shapiro-Wilk karena sampel yang diujikan <50 . Selanjutnya data akan dianalisis dengan Kruskal-Wallis.