

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

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

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

Tempat Penelitian : Laboratorium Teknologi Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Waktu Penelitian : Maret 2017- Agustus 2017

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

1. Bahan uji yang digunakan adalah EEP lebah *Apis trigona* yang diperoleh dari daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan konsentrasi 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%.
2. Bakteri yang akan diujikan dalam penelitian ini adalah bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Yogyakarta.
3. Percobaan dilakukan secara *triplicate* desain 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%, 0.05%.

2. Variabel terpengaruh:

Laju pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media BHI *broth*.

3. Variabel terkendali:

- Propolis dari lebah *Apis Trigona* diambil dari tempat yang sama (Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta)
- Waktu pengamatan
- Suhu inkubator 37°C
- Suspensi yang digunakan berasal dari sumber yang sama
- Jenis media pertumbuhan bakteri yaitu BHI *broth*
- Kontrol positif (+) berupa antibiotik Ampicillin (Sandoe dkk, 2006)
- Kontrol negative (-) berupa aquadest steril
- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

4. Variabel tak terkendali :

- Lama penyimpanan propolis *Apis Trigona*

#### E. Definisi Operasional

1. Ekstrak Etanol Propolis (EEP) yang digunakan pada penelitian ini adalah etanol dengan kadar 40%.

2. Teknik Ekstraksi yang digunakan adalah maserasi.
4. Konsentrasi EEP yang digunakan sebagai perlakuan: 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0,1%, 0.05%. Konsentrasi EEP 1% setara dengan 10.000 µg/ml.
3. Bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diperoleh dari BLK (Balai Laboratorium Kesehatan).
4. Interval waktu pengukuran laju pertumbuhan *E. faecalis*:  
t1 = t0 (11.00 a.m)  
t2 = 4 jam setelah t1 (15.00 p.m)  
t3 = 20 jam setelah t2 (11.00 a.m)  
t4 = 4 jam setelah t3 (15.00 p.m)  
t5 = 20 jam setelah t4 (11.00 a.m)
5. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik Ampicillin (Sandoe dkk., 2006).
6. Laju pertumbuhan yang dimaksud dalam penelitian ini adalah dengan cara mengukur OD turbiditas (kekeruhan) dengan menggunakan spektrofotometer UV-vis.
7. Panjang gelombang yang digunakan pada penelitian ini adalah 600nm
8. Media: BHI *broth* merupakan media penyubur bakteri yang mengandung sodium klorida yang dapat membedakan antara *enterococci* dan *non-enterococcal* grup D *streptococci*.

## F. Instrumen Penelitian

### 1. Alat Penelitian

#### a. Spektrofotometer



**Gambar 10.** Spektrofotometer UVmini-1240 (Shimadzu, Australia)

- b. *Freezer*
- c. Inkubator
- d. Kuvet *tube*
- e. Pipet dan mikropipet
- f. Rak tabung dan tabung reaksi
- g. Lampu spiritus
- h. *Blender*
- i. Autoklaf
- j. *Rotary Evaporator*
- k. Labu Erlenmeyer
- l. Gelas beaker
- m. Handscoon
- n. Masker
- o. Timbangan digital

## 2. Bahan Penelitian

- a. Alkohol 70%
- b. EEP *Apis Trigona*
- c. Bakteri *Enterococcus faecalis*
- d. Etanol 40% sebagai pelarut ekstrak
- e. Aquadest steril
- f. Antibiotik Ampicillin
- g. BHI *broth*

## G. Jalannya Penelitian

### 1. Tahap Persiapan

- a) Persiapan subjek penelitian
  - Mempersiapkan *ethical clearance*
  - Uji spektrofotometer kandungan flavonoid EEP dan filtrat pencucian propolis.
  - Mempersiapkan media dan bakteri uji
- b) Sterilisasi alat

Alat uji bakteri yang terbuat dari kaca dibungkus dengan aluminium foil kemudian disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit lalu dimasukkan ke dalam oven.

### 2. Pembuatan EEP (*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

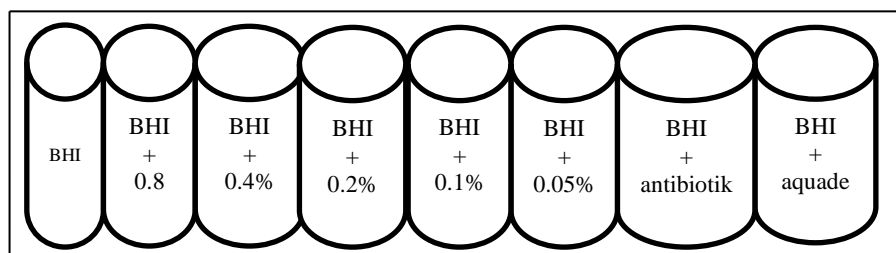
dibersihkan dengan aquadest steril kemudian diperas sehingga air cucian terpisah dengan propolis. Selanjutnya, propolis dipotong tipis dan ditambahkan etanol 40% (Chew dkk., 2011) sebanyak 8000 ml. Blender selama 3 menit. Propolis kemudian diaduk dengan *ultra turaq* selama 30 menit, didiamkan selama 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*.

### 3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri sebanyak diambil dengan kawat ose steril kemudian diinokulasikan pada 25ml BHI *broth*. Bakteri dimasukkan ke dalam incubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

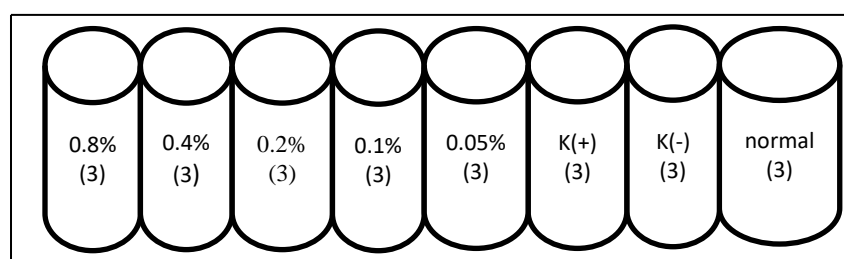
### 5. Pembuatan Alikuot dan Pengujian Bakteri

Sejumlah 8 tabung berisi media dan masing-masing konsentrasi ekstrak, media dengan antibiotik, media dengan aquades steril, dan media saja diukur OD-nya sebagai kontrol normal yang akan dikurangkan pada dengan tabung pengujian.



Gambar 11. Kontrol normal

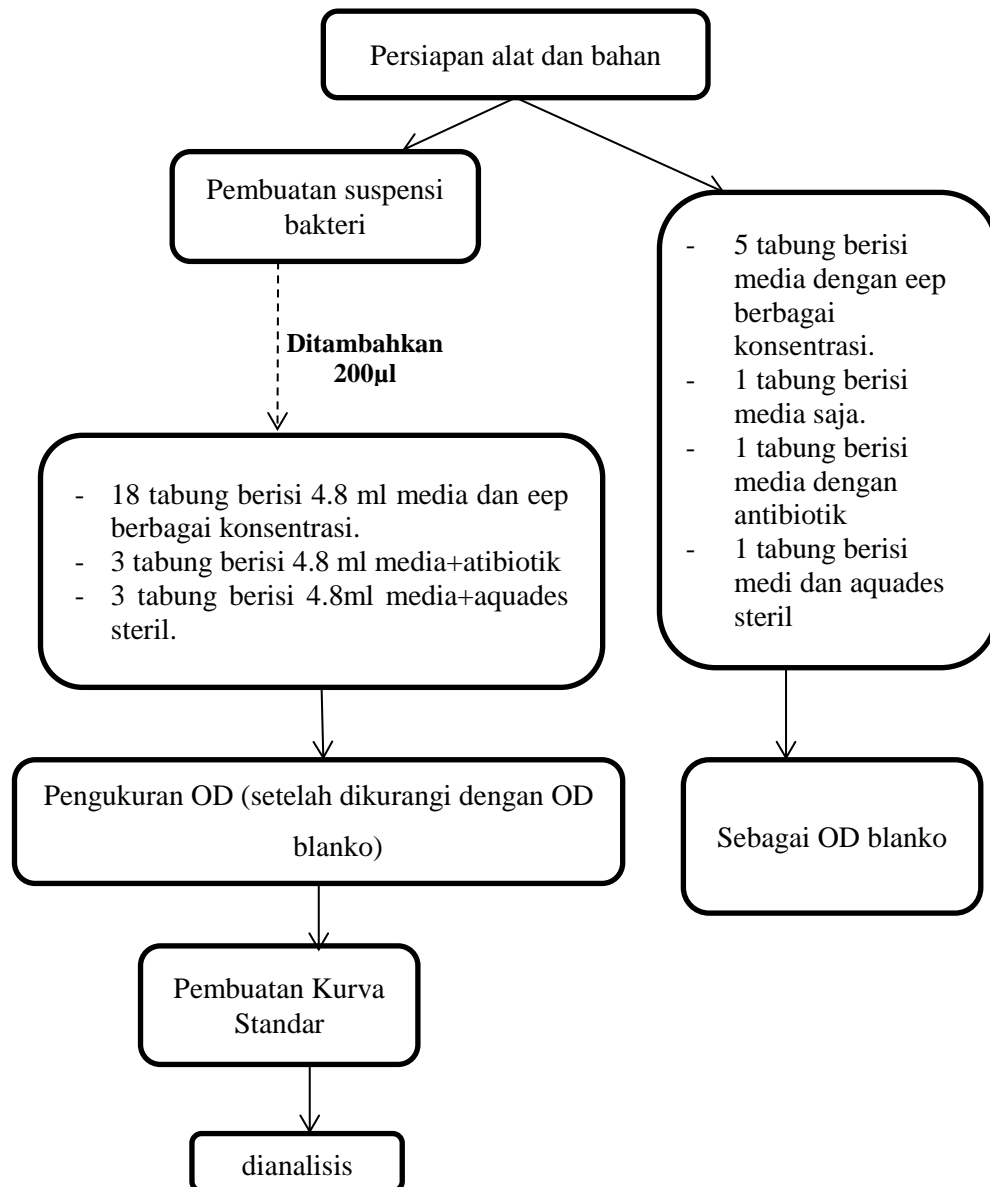
Sejumlah 24 tabung disiapkan lalu diisi dengan media BHI sebanyak 4.8 ml. Ke dalam masing-masing 3 tabung ditambahkan ekstrak dengan konsentrasi 0.8%, 0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%, kontrol positif berupa ampisillin (Sandoe dkk., 2006), dan kontrol negative berupa aquades steril. Tiga tabung terakhir tidak diberikan ekstrak dengan tujuan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri dalam kondisi tanpa intervensi.



**Gambar 12.** Tabung berisi EEP berbagai konsentrasi, K(+), K(-), dan K normal

1. Pengujian bakteri dilakukan dengan cara menambahkan sebanyak 200  $\mu$ l suspensi ke dalam 24 tabung alikuot kemudian diukur laju pertumbuhan awalnya ( $t_1$ ) dengan spektrofotometer. Panjang gelombang yang digunakan adalah 600 nm berdasarkan penelitian yang dilakukan Jiang dkk., (2015). Selanjutnya semua tabung yang diujikan dimasukkan kembali ke dalam inkubator dan diambil 4 jam berikutnya ( $t_2$ ), dan seterusnya. Hasil pengukuran tersebut kemudian dimasukkan dalam kurva x yang menggambarkan waktu ( $t$ ) dan kurva y yang menggambarkan hasil *Optical Density* (OD).

## H. Alur Penelitian





## **I. Analisis Data**

Data hasil penelitian adalah nilai *Optical Density* (OD) yang akan disajikan dalam bentuk tabel dan kurva. Data dari kelompok perlakuan tersebut dianalisis normalitasnya dengan uji *Shapiro-Wilk* karena sampel yang diujikan  $<50$ . Selanjutnya data akan dianalisis dengan uji statistik *One Way Anova*.