

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

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

B. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian : Penelitian dilakukan di Laboratorium Biokimia Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Mikrobiologi AMC, dan Laboratorium MMT FKIK.

Waktu Penelitian : Penelitian dilakukan pada bulan Juli hingga September 2018.

C. Sampel Penelitian

1. Bahan uji yang digunakan adalah Ekstrak Etanol Propolis (EEP) dari Lebah *Apis Trigona* yang diperoleh dari daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta dengan konsentersasi 10%, 0,4%, dan 0,00125%.

Konsentrasi EEP 0,00125% memiliki tingkat toksisitas yang paling aman untuk sel fibroblas manusia, konsentrasi EEP 0,4% memiliki daya hambat pertumbuhan bakteri yang paling efektif, dan konsentrasi EEP 10% merupakan konsentrasi perlakuan yang paling toksik (Fauzi, *et al.*, 2018).

2. Bakteri yang akan diujikan di dalam penelitian ini adalah *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dan *Enterococcus faecalis* yang diambil dari saluran akar (S1). Kedua sampel di isolasi dalam larutan *Brain Heart Infusion* (BHI) *Broth* .
3. Percobaan pada penelitian ini dilakukan secara *triplicate* desain sebagai kontrol bias perlakuan.
4. Total sampel penelitian pada sampel klinis dan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 berjumlah 30 dengan pemberian perlakuan yang berbeda-beda. Setiap jenis sampel bakteri terdiri dari 9 kelompok sampel perlakuan Ekstrak Etanol Propolis dengan berbagai konsentrasi (0,00125%, 0,4%, dan 10%), 3 kelompok sampel kontrol positif, dan 3 kelompok sampel kontrol negatif.

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh :
Ekstrak etanol propolis *Apis Trigona* dengan konsentrasi 0,00125%, 0,4%, dan 10%.
2. Variabel terpengaruh :
Aktifitas metabolisme karbohidrat bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *phenol red*.
3. Variabel terkendali :
 - Propolis dari lebah *Apis Trigona* diambil dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta.

- Isolasi bakteri *Enterococcus faecalis* yang diambil dari 1 saluran akar.
 - Kontrol bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
 - Media *phenol red*.
 - Suhu inkubator 37⁰C.
 - Suhu *freezer* 4⁰C.
 - Kontrol positif berupa *Chlorhexidine digluconate* 2%
4. Variabel tak terkendali
- Lama penyimpanan propolis mentah di peternakan lebah.

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.
3. Konsentrasi EEP yang digunakan sebagai perlakuan: 0,00125%, 0,4%, dan 10%.
4. Bakteri klinis *Enterococcus* diambil langsung dari saluran akar dan bakteri kontrol *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Kota Yogyakarta.
5. Kontrol positif pada penelitian ini adalah *Chlorhexidine digluconate* 2%. *Chlorhexidine digluconate* merupakan standar tolak ukur yang telah banyak digunakan dalam penelitian karena kemampuannya yang efektif sebagai antibakteri (Lakhani & Vandana, 2016)
6. Kontrol negatif pada penelitian ini adalah BHI *broth*.

7. Lamanya waktu pemberian perlakuan dilambangkan dengan t .
8. Jumlah populasi bakteri berdasarkan tingkat kekeruhan dilihat dari nilai OD (*optical density*) dengan menggunakan alat spektrofotometer panjang gelombang 600 nm.
9. Untuk mengetahui besar suatu volume sampel dilakukan perbandingan OD sampel.
10. Ukuran volume sampel mempresentasikan jumlah populasi bakteri.
11. Media : *Brain Heart Infusion (BHI) broth* merupakan media yang mengandung sodium klorida berguna untuk menumbuhkan berbagai macam mikroorganisme, seperti bakteri aerob, anaerob, jamur.
12. Media yang digunakan untuk mengisolasi bakteri *Enterococcus faecalis* adalah *Slanetz and Bartley (S&B)*.
13. *Phenol red broth* adalah media uji yang digunakan untuk melihat metabolisme dari bakteri. Media ini mengandung pepton, karbohidrat, tabung durham, dan *phenol red* sebagai pH indikator. Jika bakteri mampu melakukan aktifitas metabolisme karbohidrat maka terjadi perubahan pH indikator menjadi warna kuning. Media uji ini juga ditambahkan karbohidrat tambahan berupa glukosa sebesar 10% dari takaran *phenol red broth* yang akan dibuat.
14. Studi Pendahuluan atau tahap *preliminary* merupakan tahapan pre penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan nilai lamanya waktu paparan perlakuan yang akan digunakan pada penelitian yang sebenarnya.

15. Tahap *preliminary* menggunakan waktu lamanya perlakuan yaitu 0 menit (kontrol), 5 menit, 1 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam. Lamanya waktu paparan perlakuan dilambangkan dengan huruf (t). Penentuan waktu lamanya perlakuan (t) pada *preliminary* digunakan untuk memprediksi *bacterial growing phase profile Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Pemilihan waktu 5 menit merupakan waktu pengkondisian yang mirip dengan kondisi paparan bahan irigasi pada saluran akar gigi. Waktu perlakuan 1 jam merupakan estimasi awal dari *initial phase* pertumbuhan bakteri. Pada waktu 6 jam merupakan setengah dari *optimum growing phase* yang merupakan *exponential phase* atau *log phase* pada pertumbuhan bakteri. Pada waktu 12 jam merupakan *optimum growing phase* yang dimiliki bakteri pada *enrich media* (BHI) (Nascimento, *et al.*, 2010), sedangkan waktu perlakuan 24 jam larutan perlakuan telah memberikan efek toksik pada sel fibroblast (Fauzi, *et al.*, 2018) atau pada bakteri titik akhir dari fase pertumbuhan.
16. *Recovery rate* adalah tingkat kemampuan pemulihan bakteri setelah diberikan paparan perlakuan dan larutan nutrisi dalam rentang waktu tertentu.
17. Program *ImageJ* merupakan program aplikasi *software* yang dapat mengkuantifikasi data kualitatif menjadi data kuantitatif berupa angka. Angka yang dihasilkan berasal dari nilai angka pixel pada suatu pewarnaan foto.

F. Instrument Penelitian

1. Alat penelitian
 - a. Spektrofotometer UV Mini 1240 (Shimadzu, Jepang)
 - b. Inkubator (Mettler, Jerman)
 - c. Pipet volume (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
 - d. Mikropipet (Socorex Acura 825, Swiss)
 - e. Rak tabung (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
 - f. Tabung reaksi (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
 - g. Autoklaf HydraEVO (Techno-Gaz, Italia)
 - h. *Freezer* (Toshiba glacio, Jepang)
 - i. *Handscoon* dan masker
 - j. Neraca analitik (Mettler Toledo AL 204, Swiss)
 - k. Gelas beker (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
 - l. Petri dish
 - m. Gelas ukur (Pirex Iwaki te-32, Indonesia)
 - n. Vortex (Stuart scientific SA 8, Inggris)
 - o. *Centrifuge* (Hettich EBA-8, Jerman)
 - p. Durham tube
 - q. Batang ose
 - r. Bench
 - s. Bunsen
 - t. Pinset
2. Bahan penelitian

- a. Ekstrak Etanol Propolis *Apis Trigona*
- b. Etanol 40% sebagai pelarut ekstrak
- c. Bakteri *Enterococcus faecalis* yang diambil langsung dari saluran akar.
- d. Bakteri *Enterococcus faecalis* ATC 291212
- e. *Slarnetz and bartley* agar (Oxoid)
- f. BHI *broth* (Oxoid)
- g. *Phenol red* (Himedia)
- h. *Chlorhexidine digluconate 2%*
- i. Alkohol 70%
- j. Aquades
- k. *pH indicator strip*
- l. Paper Point (Sure-Endo,Korea)

G. Jalannya Penelitian

1. Tahap persiapan
 - a) Persiapan subjek penelitian
 - Mempersiapkan *ethical clearance*.
 - Mempersiapkan media dan bahan uji.
 - b) Sterilisasi alat
 - Bungkus alat uji bakteri yang terbuat dari kaca dengan aluminum foil.

- Sterilisasi alat dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121⁰C bertekanan kurang dari 1 atm selama 15 menit lalu dimasukkan ke dalam oven.

2. Pembuatan Ekstrak Etanol Propolis *Apis Trigona*

Propolis diambil dari peternakan lebah di daerah Nglipar, Gunung Kidul, Yogyakarta. Teknik pembuatan EEP dilakukan dengan metode maserasi dan dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada (UGM). Pertama dilakukan pembersihan terhadap propolis dengan larutan aquadest steril dan diperas sehingga air cucian terpisah dari propolis. Propolis dimasukkan kedalam blender untuk dihaluskan kemudian dilakukan penimbangan dan propolis yang sudah halus dimasukkan kedalam *glass beaker*. Lakukan ekstraksi propolis menggunakan teknik maserasi dengan larutan etanol 40%. Propolis yang sudah dihaluskan tadi dicampur dengan etanol 40% kemudian disimpan selama 7 hari dan dilakukan pengadukan 2 kali dalam sehari.

Penyaringan propolis dilakukan untuk memisahkan filtrat dan ampas. Kemudian dilakukan evaporasi menggunakan alat *rotary evaporator* dengan tekanan kurang dari 1 atm pada suhu 45⁰C hingga didapatkan ekstrak etanol propolis (EEP) 100%. Ekstrak etanol propolis dibuat 3 konsentrasi yaitu 0,4%, 0,00125%, dan 10%.

3. Studi pendahuluan atau *Preliminary* penelitian

Preliminary penelitian merupakan tahapan pre penelitian yang dilakukan untuk mendapatkan variabel lamanya waktu paparan perlakuan yang diberikan terhadap sampel perlakuan terhadap *recovery rate* bakteri. Tahap *preliminary* menggunakan bakteri kontrol *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dan *chlorhexidine digluconate* 2% sebagai bahan perlakuan yang akan digunakan. Waktu perlakuan yang akan diteliti yaitu 5 menit, 1 jam, 6 jam, 12 jam, dan 24 jam. BHI broth sebagai kontrol negatif tanpa perlakuan.

Enterococcus faecalis ATCC 29212 diambil dari master suspensi kemudian diinokulasi dan diinkubasi dalam BHI broth selama 24 jam. Dalam jumlah koloni bakteri yang sama sebanyak 200µl dan penambahan volume larutan perlakuan berupa *chlorhexidine digluconate* 2% sebanyak 5,2 ml dilakukan pendistribusian pada tiap tabung waktu perlakuan. Tiap tabung waktu perlakuan, sebelum diinkubasi pada suhu 37°C sesuai waktu perlakuannya, dilakukan homogenisasi dengan menggunakan alat vortex. Pasca inkubasi sesuai dengan waktu perlakuan, tiap tabung perlakuan dilakukan sentrifugasi menggunakan alat *centrifuge* dengan kecepatan 5000rpm yang bertujuan untuk mengendapkan bakteri ke dasar tabung. Larutan perlakuan berupa *chlorhexidine digluconate* 2% dibuang dan digantikan dengan BHI broth.

Pasca pemberian BHI broth, selanjutnya pengukuran uji spektrofotometer untuk mendapatkan nilai OD jumlah populasi bakteri pasca diberikan paparan perlakuan, kemudian diinkubasi kembali pada suhu

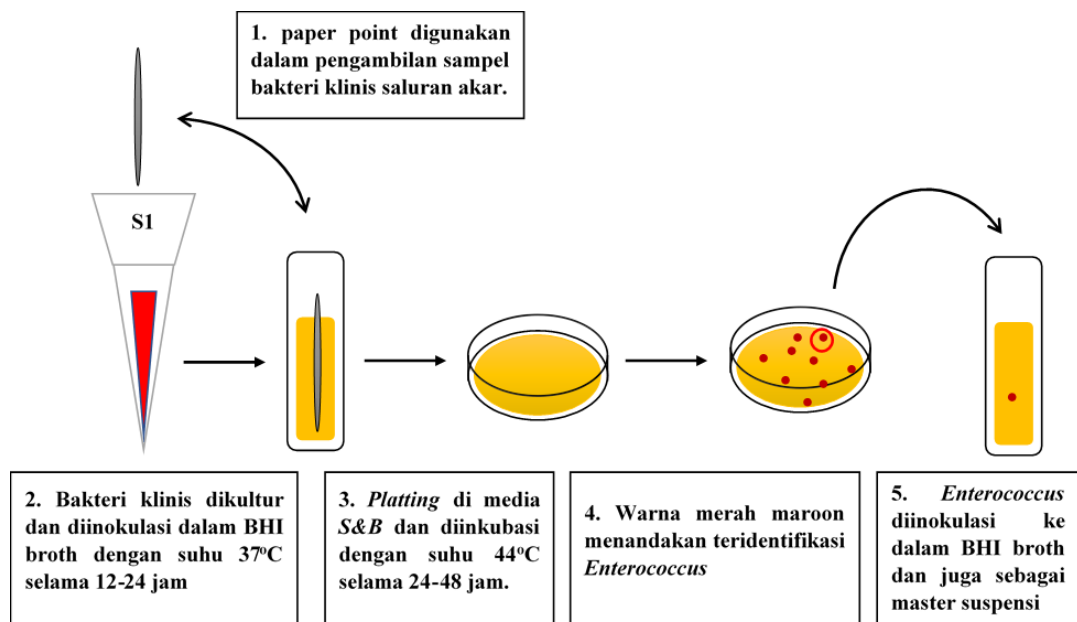
37°C selama 24 jam. Pasca 24 jam diinkubasi, lakukan homogenisasi menggunakan alat vortex dan pengukuran uji spektrofotometer untuk melihat nilai OD jumlah populasi bakteri pasca diberikan larutan nutrisi berupa BHI broth. Nilai OD jumlah populasi bakteri pasca inkubasi 24 jam dengan resuspensi BHI dan pasca diberikan paparan perlakuan dilakukan pengamatan perbedaan nilai *recovery rate* ditiap waktu perlakuan. Hasil akhir dari *preliminary* ini berupa lamanya waktu paparan perlakuan terhadap *recovery rate* bakteri yang akan digunakan pada penelitian sebenarnya.

4. Pengambilan sampel dan isolasi bakteri

Bakteri klinis diambil dari saluran akar (S1) dan bakteri kontrol *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 didapatkan dari Laboratorium Balai Kesehatan Yogyakarta. Bakteri klinis didapatkan dari pasien yang hendak melakukan *open access* perawatan saluran akar. Bakteri diambil dengan cara diswap menggunakan paper point. Pengambilan bakteri ini dilakukan pada tahap pasca ekstirpasi dan sebelum dilakukan irigasi bahan dressing saluran akar. Paper point diharapkan mampu masuk hingga sepertiga bagian saluran akar. Paper point yang telah terkontaminasi bakteri selanjutnya dikultur dan inokulasi pada BHI broth, diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam didalam inkubator.

Bakteri klinis saluran akar (S1) dari media BHI broth kemudian dilakukan *plating* bakteri pada media *Slanetz and Bartley* dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 44°C. Hal ini bertujuan untuk menyeleksi

sampel bakteri agar didapatkan *Enterococcus*. Koloni bakteri *Enterococcus* diinokulasi pada media BHI broth dan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk dijadikan sebagai master suspensi sampel yang akan dilakukan *pre-treatment*. Sampel penelitian klinis (S1) dan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 diberikan perlakuan yang berbeda yaitu; pemberian ekstrak etanol propolis dengan konsentrasi 10%, 0,4%, 0,00125%, *Chlorhexidine digluconate* 2% sebagai kontrol positif, dan BHI *broth* sebagai kontrol negatif.



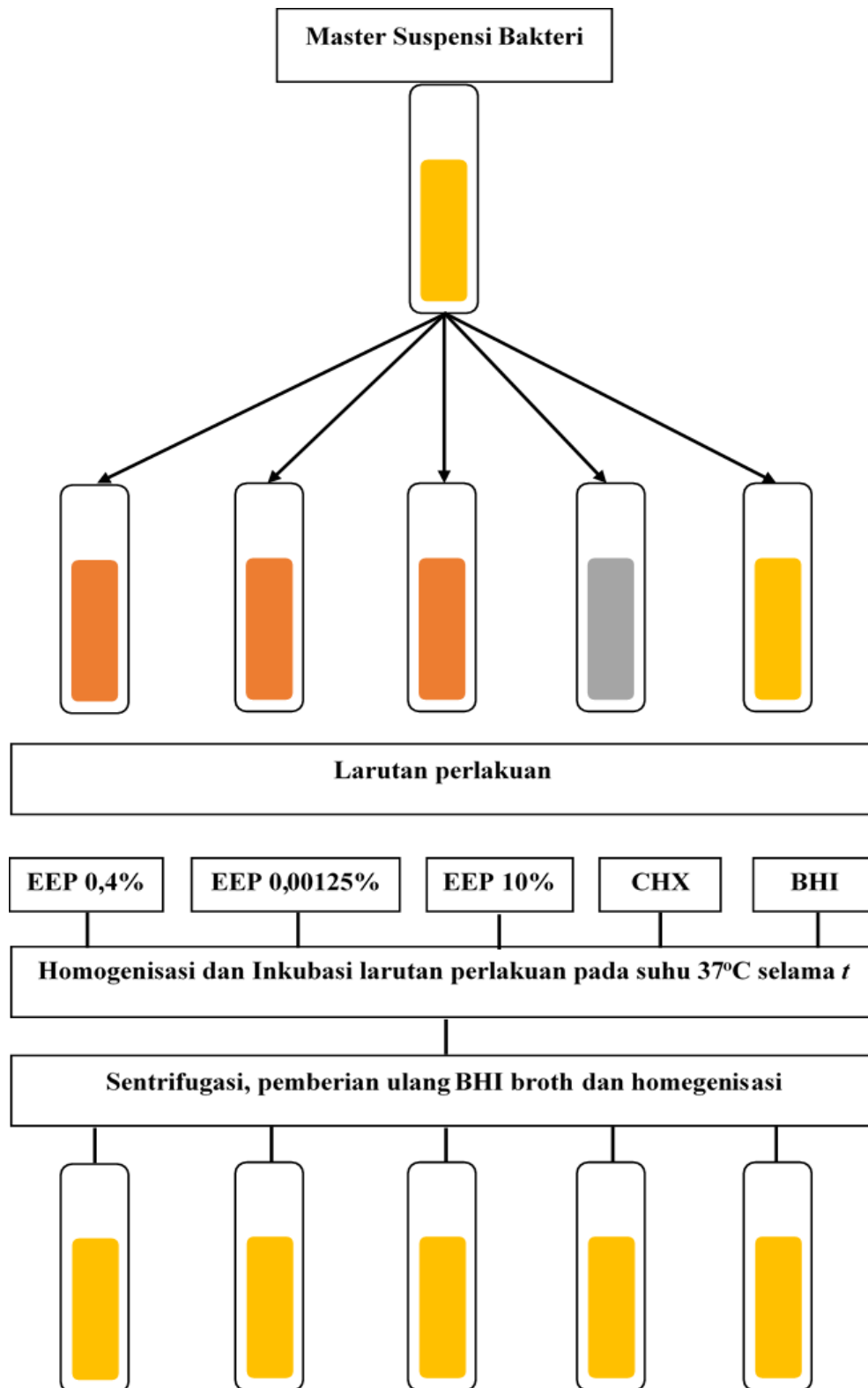
Gambar 10. Proses pengambilan sampel dan isolasi sampel bakteri pada media selektif *Enterococcus*

5. Pemberian Larutan Perlakuan dan Uji Spektrofotometer

Master suspensi bakteri dari tiap jenis sampel yang terdiri dari bakteri klinis (S1) dan *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Tiap jenis sampel diinokulasi pada tiap kelompok larutan perlakuan yaitu EEP 0,4%, 0,00125%, 10%, kontrol positif berupa *chlorhexidine digluconate* 2% dan kontrol negatif berupa BHI *broth*. Setiap kelompok perlakuan

didistribusikan volume bakteri 200µl dengan penambahan masing-masing volume perlakuan yaitu 5,2ml.

Homogenisasi seluruh kelompok perlakuan yang telah bercampur dari tiap jenis sampel bakteri menggunakan alat vortex. Seluruh kelompok perlakuan diinkubasi pada suhu 37°C selama waktu perlakuan yang telah ditentukan dari hasil *preliminary*. Pasca inkubasi dalam waktu perlakuan, tiap kelompok perlakuan dilakukan sentrifugasi dengan menggunakan alat *centrifuge* pada kecepatan 5000rpm yang bertujuan untuk mengendapkan bakteri dan memisahkan larutan perlakuan. Larutan perlakuan dibuang dan digantikan dengan larutan kaya nutrisi yaitu, BHI broth. Homogenisasi kembali, kemudian pengukuran nilai OD pasca paparan perlakuan.



6. Uji Spektrofotometer

Sampel penelitian yang telah diberikan paparan perlakuan selanjutnya dilakukan pengukuran menggunakan spektrofotometer untuk melihat nilai *Optical Density* (OD). Didapatkan hasil pengukuran nilai OD pasca paparan perlakuan, selanjutnya diinkubasi kembali seluruh kelompok perlakuan yang telah diberikan BHI broth pada suhu 37°C selama 24 jam. Pasca inkubasi selama 24 jam, seluruh kelompok perlakuan dari tiap jenis sampel bakteri dilakukan kembali pengukuran nilai OD pasca pemberian larutan nutrisi BHI broth. Pengukuran nilai OD juga berfungsi untuk melihat *recovery rate* dan jumlah populasi bakteri pada tiap sampel kelompok perlakuan.

Nilai hasil pengukuran OD akan dijadikan sebagai patokan untuk menentukan volume bakteri yang akan digunakan untuk uji metabolisme karbohidrat. Volume perlakuan (volume x) didapatkan dari hasil perbandingan OD perlakuan (OD x) dengan OD kontrol dan volume kontrol 100µ/ml. Rumus dari penentuan volume perlakuan adalah sebagai berikut :

$$\frac{OD\ x}{OD\ kontrol} = \frac{Volume\ x}{Volume\ kontrol}$$

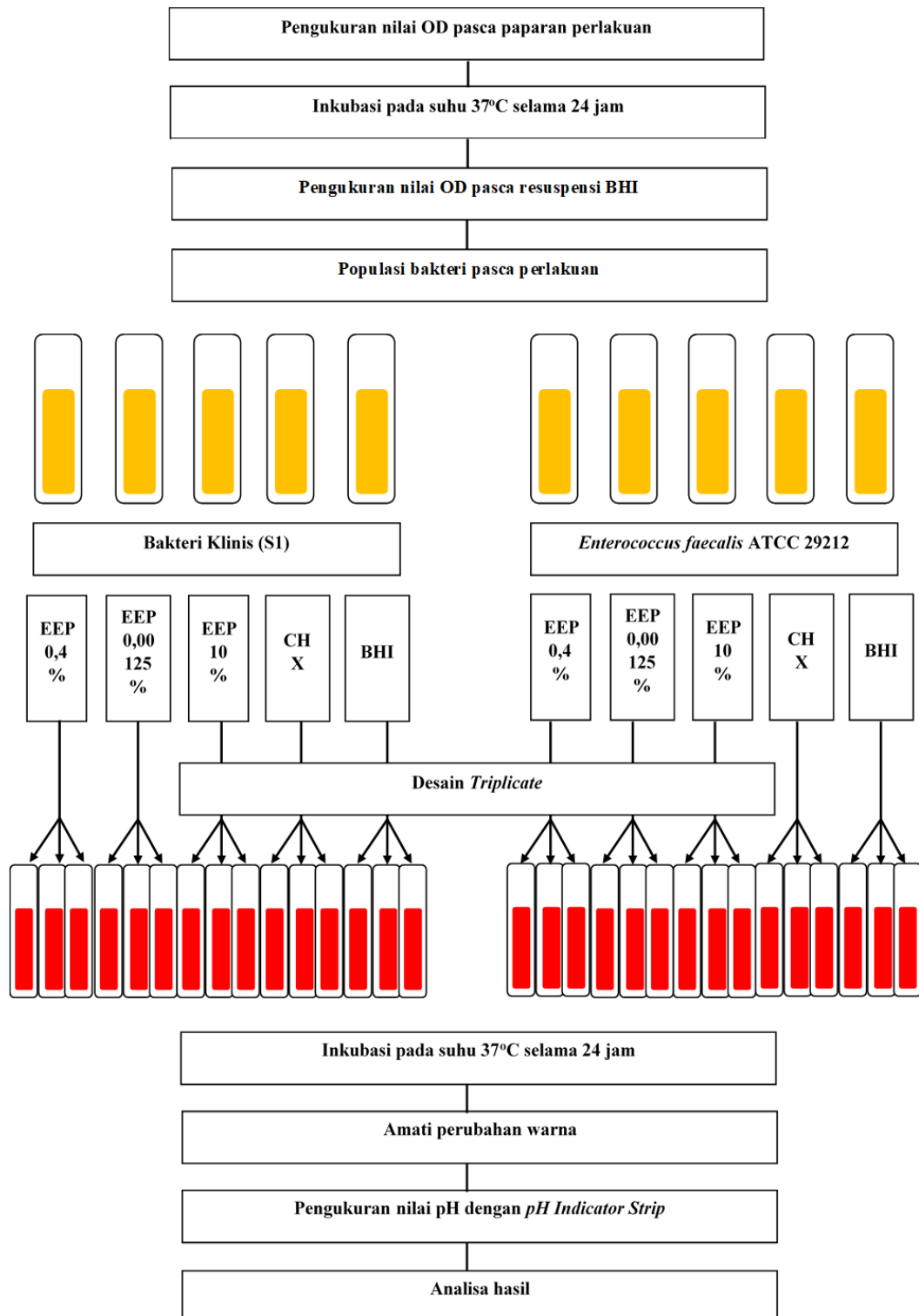
Keterangan :

OD x : Nilai OD pada BHI dari sampel perlakuan yaitu; EEP 0,4%, 0,00125%, 10%, dan CHX 2%,

OD kontrol : Nilai OD pada BHI yang tidak diberikan perlakuan.

Volume x : Volume sampel perlakuan pada BHI yang akan digunakan yakni; 0,4%, 0,00125%, 10% dan CHX 2%,

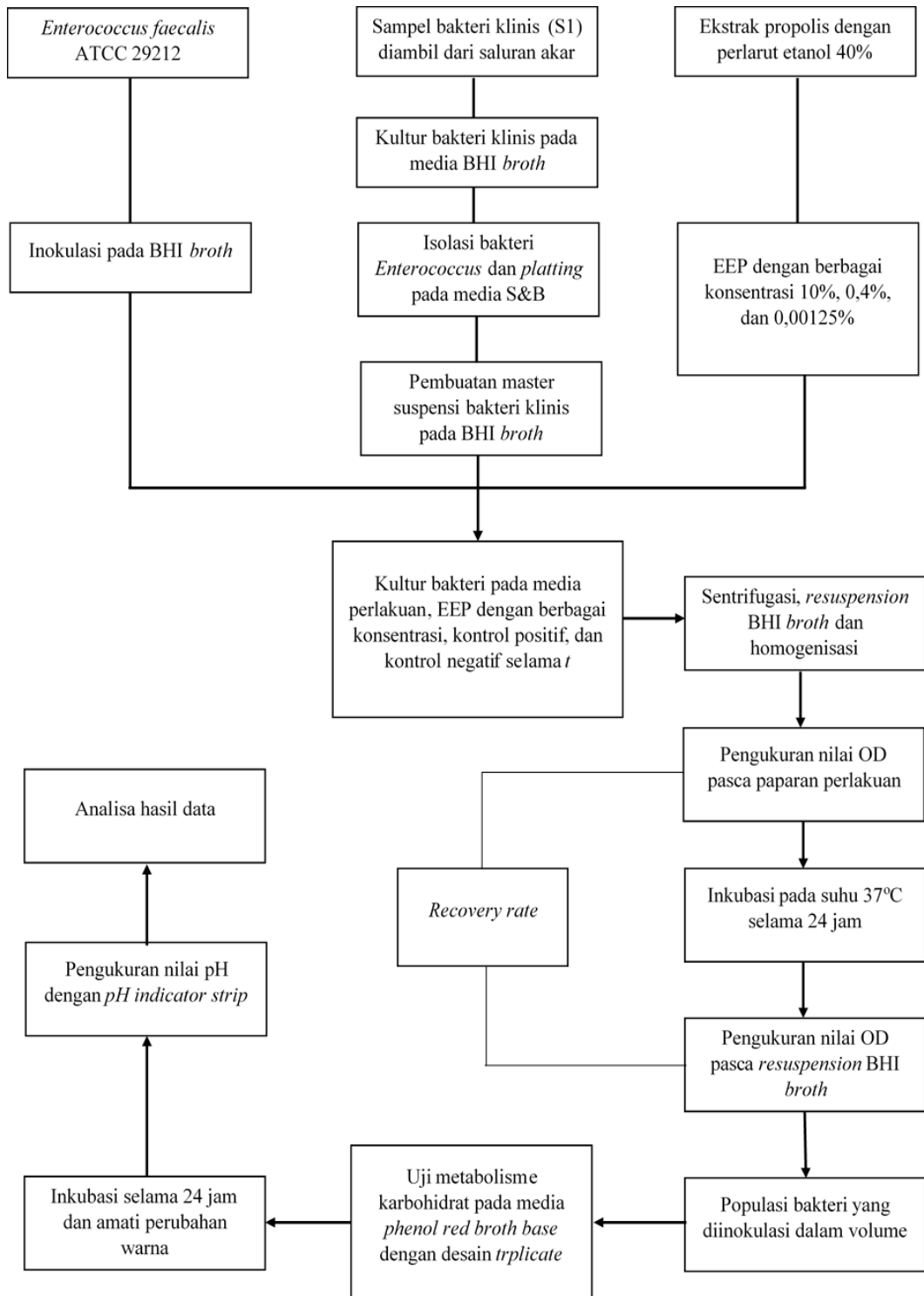
Volume kontrol : Volume yang akan digunakan pada BHI yang tidak diberikan perlakuan.



7. Uji aktifitas metabolisme karbohidrat.

Pertama bakteri diinokulum dari BHI *broth* yang telah diberikan berbagai macam perlakuan kemudian ambil sesuai dengan perhitungan volume dan OD yang ditentukan. Inokulasi ke tabung steril *phenol red broth base* dengan desain *triplicate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif aktifitas fermentasi karbohidrat bakteri dapat ditunjukkan melalui indikator pH yang berubah warna merah menjadi kuning di bawah pH 6,8. Hasil negatif bakteri tidak dapat melakukan aktifitas fermentasi karbohidrat tetapi menggunakan peptone, produk sampingnya adalah ammonia sehingga meningkatkan pH media dan terjadi perubahan warna menjadi pink. Lakukan pengamatan perubahan warna setelah 24 jam dan perubahan kadar nilai pH dengan menggunakan *pH indicator strip*. Lakukan pencatatan dan analisis.

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Data hasil penelitian yang akan dilakukan analisa adalah data kualitatif. Data kualitatif akan dikuantifikasi dengan menggunakan program *ImageJ*. Nilai angka *ImageJ* kemudian dilakukan analisa distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk test* karena sampel kurang dari 50. Selanjutnya, *One Way Anova* digunakan jika distribusi data normal atau *Kruskal-Wallis* jika distribusi data tidak normal. Data pengukuran hasil nilai pH media disajikan dalam bentuk tabel deskriptif.