

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni laboratorium in vitro.

#### **B. Subjek Penelitian**

1. Bakteri Uji: bakteri yang diuji pada penelitian ini adalah biakan murni bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang berasal dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.
2. Bahan Uji: bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*) dalam berbagai konsentrasi (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%)

#### **C. Lokasi dan Waktu Penelitian**

Proses pembuatan ekstrak kulit nanas dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada.

Penelitian uji bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Kultur bakteri dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2016 - Januari 2017.

#### **D. Variabel Penelitian**

1. Variabel Pengaruh adalah ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, dan 0,78%
2. Variabel Terpengaruh adalah kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) bakteri *Porphyromonas gingivalis*
3. Variabel Terkendali
  - a. Konsentrasi ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*)
  - b. Volume ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*)
  - c. Bakteri *Porphyromonas gingivalis*
  - d. Waktu inkubasi
  - e. Suhu inkubasi
  - f. Media pertumbuhan bakteri

#### **E. Definisi Operasional**

1. Kulit nanas merupakan bagian buah nanas yang terluar yang bertekstur kasar dan tidak rata dari jenis nanas batu yang diambil dari perkebunan di Jawa Timur.
2. Ekstrak kulit nanas merupakan kulit nanas yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%
3. Antibakteri adalah suatu zat yang dapat membunuh maupun menghambat pertumbuhan bakteri
4. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri anaerob gram negatif yang berpigmen hitam pada media agar dengan konsentrasi  $10^8$

CFU/ml yang kemudian diencerkan menjadi  $10^6$  CFU/ml yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta

5. Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu konsentrasi terendah ekstrak kulit nanas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis*
6. Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu konsentrasi terendah ekstrak kulit nanas yang dapat membunuh bakteri *Porphyromonas gingivalis*

#### **F. Alat dan Bahan Penelitian**

1. Alat Penelitian
  - a. *Handscoon*
  - b. Masker
  - c. Blender
  - d. Ose
  - e. Lampu spiritus
  - f. Gelas *Erlenmeyer*
  - g. Cawan petri
  - h. Inkubator
  - i. Corong gelas
  - j. Kain saring
  - k. Labu evaporator
  - l. Labu penampung etanol
  - m. Evaporator
  - n. *Rotary vacuum evaporator*

- o. Selang water pump
  - p. Botol
  - q. Toples kaca
  - r. Tabung reaksi
  - s. Pisau
  - t. Timbangan
  - u. Pinset
  - v. Pipet
  - w. Autoklaf
2. Bahan Penelitian
- a. Ekstrak etanol kulit buah nanas
  - b. Etanol 70%
  - c. Kapas
  - d. *Trypticase Soy Agar (TSA)*
  - e. *Media Brain Heart Infusion (BHI)*
  - f. Aquades
  - g. Bakteri *Porphyromonas gingivalis*

## **G. Jalannya Penelitian**

### 1. Tahap persiapan

Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian. Alat-alat yang akan digunakan disterilkan dan bahan kulit nanas yang akan dibuat ekstrak dalam keadaan bersih untuk menghindari kontaminasi bakteri.

## 2. Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas

Sebelum dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi, kulit nanas yang telah dipisahkan dari daging buahnya dicuci kemudian dipotong-potong. Kulit nanas dikeringkan pada temperatur ruangan (32-35°C) dan dihindarkan dari paparan matahari langsung sampai kering. Setelah kering kulit nanas diblender sampai halus menjadi serbuk. Serbuk kulit nanas dimaserasi dengan etanol 70% selama 24 jam, kemudian disaring menggunakan corong *Buchner*. Serbuk yang masih tersisa setelah proses maserasi digunakan lagi untuk proses remaserasi agar mendapatkan hasil ekstraksi yang maksimum. Filtrat diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dengan menggunakan *Rotary Evaporator* sehingga diperoleh ekstrak yang pekat.

## 3. Persiapan Bakteri Uji

Bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang diperoleh dari stok kultur Balai Laboratorium Kesehatan Kota Yogyakarta diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY dengan cara diinkubasi pada selama 24 jam pada suhu 37°C. Kemudian beberapa koloni bakteri dipilih menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl sebanyak 1-2 ml. setelah itu diinkubasikan selama 2-4 jam pada suhu 37°C. Kemudian diencerkan dengan menambah BHI (Brain Heart Infusion) hingga diperoleh jumlah kuman yang sesuai dengan larutan standard Brown III yang diidentifikasi dengan konsentrasi kuman

sebesar  $10^8$  CFU/ml. Kemudian diencerkan lagi dengan menggunakan medium cair BHI sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^6$  CFU/ml.

4. Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)
  - a. Dalam penelitian ini dilakukan 3 kali percobaan, di setiap percobaan menggunakan 10 tabung reaksi dengan volume 5 ml.
  - b. Tabung reaksi disiapkan dan diberi nomor 1 sampai 10
  - c. Aquades sebanyak 1 ml dimasukkan pada tabung ke-2 sampai dengan tabung ke-8.
  - d. Tabung ke-1 diisi ekstrak pada konsentrasi awal yaitu 100% sebanyak 1 ml
  - e. Tabung ke-2 ditambahkan ekstrak 100% sebanyak 1 ml kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 50%
  - f. Tabung ke-3 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-2 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 25%
  - g. Tabung ke-4 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-3 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 12,5%
  - h. Tabung ke-5 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-4 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 6,25%

- i. Tabung ke-6 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-5 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 3,125%
- j. Tabung ke-7 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-6 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 1,56%
- k. Tabung ke-8 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-7 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 0,78%
- l. Tabung ke-9 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari sisa pengenceran pada tabung ke-8 sebagai kontrol negatif
- m. Tabung ke-10 diisi 1 ml aquades dan 1 ml larutan suspensi bakteri sebagai kontrol positif
- n. Tabung ke-1 sampai tabung ke-8 yang sudah berisi ekstrak kulit nanas sesuai konsentrasinya ditambahkan larutan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml sebanyak 1 ml untuk tiap tabung
- o. Semua tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
- p. Pertumbuhan bakteri dilihat dengan mengamati tingkat kejernihan larutan pada setiap tabung setelah diinkubasi dan membandingkannya dengan kontrol positif

- q. Kadar Hambat Minimal (KHM) diperoleh dengan mengamati tabung ke-1 sampai 8 yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah
  - r. Larutan yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri diambil menggunakan ose steril kemudian ditanam pada media *Trypticase soy agar* (TSA)
  - s. Setelah ditanam pada media TSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam
  - t. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media TSA pada konsentrasi terendah
5. Cara Pengukuran hasil Penelitian

Pengaruh ekstrak kulit nanas terhadap pertumbuhan *Porphyromonas gingivalis* ditentukan dengan mengamati Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Kadar Hambat Minimal ditentukan dengan mengamati secara visual ada atau tidaknya kekeruhan pada tabung dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Kekeruhan pada tabung menandakan terdapat pertumbuhan bakteri. Kadar Bunuh Minimal ditentukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dalam media TSA pada konsentrasi terendah.

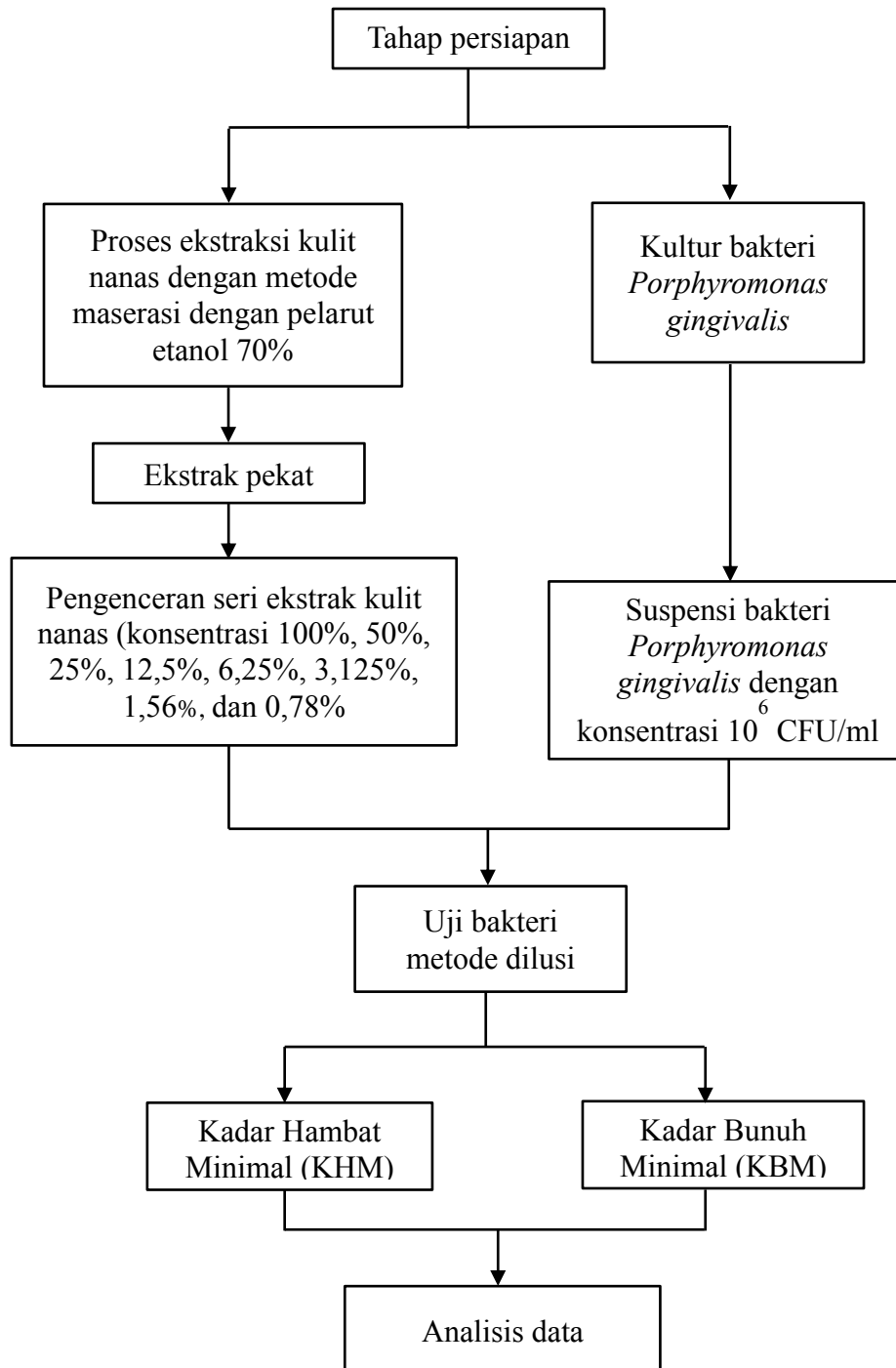
## H. Analisis Data

Analisis data hasil penelitian mengenai pengaruh daya antibakteri ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) terhadap bakteri *Porphyromonas*



*gingivalis* dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian disajikan menggunakan tabel.

## I. Alur Penelitian



Gambar 1. Bagan alur penelitian