

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 *Staphylococcus aureus* 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

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Proses pembuatan ekstrak kulit nanas dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada. Penelitian dilakukan pada bulan Agustus 2018.

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 *Staphylococcus aureus*
3. Variabel Terkendali
 - a. Konsentrasi ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*)
 - b. Volume ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*)
 - c. Bakteri *Staphylococcus aureus*
 - d. Waktu inkubasi
 - e. Suhu inkubasi
 - f. Media pertumbuhan bakteri
4. Variabel Tidak Terkendali
 - a. Kontaminasi organisme lain
 - b. Zat aktif yang terdapat dalam kulit nanas (*Ananas comosus*)

E. Definisi Operasional

1. Kulit nanas merupakan lapisan terluar buah nanas yang dapat dikupas
2. Ekstrak kulit nanas merupakan kulit nanas yang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%
3. Metode maserasi adalah sediaan cair yang dibuat dengan cara mengekstraksi bahan nabati yang direndam menggunakan pelarut bukan air (pelarut non polar) selama periode waktu tertentu

4. Etanol 70% adalah cairan yang mengandung 70% etil alkohol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) dan 30% air
5. Antibakteri adalah suatu zat yang dapat menghambat maupun membunuh bakteri
6. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang menghasilkan pigmen kuning pada media agar dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml yang kemudian diencerkan menjadi 10^6 CFU/ml
7. Metode dilusi adalah metode pengukuran antimikroba dengan cara pengenceran
8. Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu konsentrasi terendah ekstrak kulit nanas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*
9. Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada media nutrien agar

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat Penelitian
 - a. Blender
 - b. Ose
 - c. Lampu spiritus
 - d. Gelas *Erlenmeyer*
 - e. Cawan petri
 - f. Inkubator
 - g. Corong gelas

- h. Kain saring
 - i. Labu evaporator
 - j. Labu penampung etanol
 - k. Evaporator
 - l. Rotary vacuum evaporator*
 - m. Selang water pump
 - n. Botol
 - o. Toples kaca
 - p. Tabung reaksi
 - q. Pisau
 - r. Timbangan
 - s. Pinset
 - t. Pipet
 - u. Autoklaf*
 - v. Handscoon*
 - w. Masker
2. Bahan Penelitian
- a. Etanol 70%
 - b. Ekstrak etanol kulit buah nanas
 - c. Kapas
 - d. Tryptone Soya Agar (TSA)*
 - e. Media Brain Heart Infusion (BHI)*

f. Aquades

g. Bakteri *Staphylococcus aureus*

G. Jalannya Penelitian

1. Tahap persiapan

Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan dalam penelitian. Alat-alat yang akan digunakan disterilkan dengan cara botol steril dan gelas ukur ditutup mulutnya dengan kapas yang dibalut dengan kain kasa steril, kemudian dibungkus dengan aluminium foil. Cawan petri dibungkus dengan aluminium foil. Kemudian seluruh alat ini disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 20 menit. Pinset dan jarum ose disterilkan dengan cara flambier pada nyala lampu spiritus. Lemari aseptis dibersihkan dari debu, lalu disemprotkan etanol 70% dibiarkan selama 15 menit sebelum digunakan. Bahan kulit nanas yang akan dibuat ekstrak harus dalam keadaan bersih untuk menghindari kontaminasi bakteri.

2. Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas

Jenis nanas yang diambil kulitnya untuk digunakan pada penelitian ini adalah nanas matang jenis Nanas Batu yang didapat dari pedagang buah Pasar Bringharjo. 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 *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari stok kultur Balai Laboratorium Kesehatan 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 diidentifikasikan dengan konsentrasi kuman sebesar 10⁸ CFU/ml. Kemudian diencerkan lagi dengan menggunakan medium cair BHI sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁶ CFU/ml.

4. Penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)

- a) Penelitian ini dilakukan dengan 3 kali percobaan dan setiap percobaan menggunakan 10 tabung reaksi dengan volume masing-masing 5 ml.
- b) 10 tabung reaksi disiapkan dan diberi nomor 1 sampai 10. Penomoran tabung diurutkan dari konsentrasi tertinggi yaitu 100%.
- c) Sebanyak 1 ml aquades 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 negative.
- 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 *Staphylococcus aureus* 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 kuman diambil menggunakan ose steril kemudian ditanam pada media *Tryptonee soya 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.

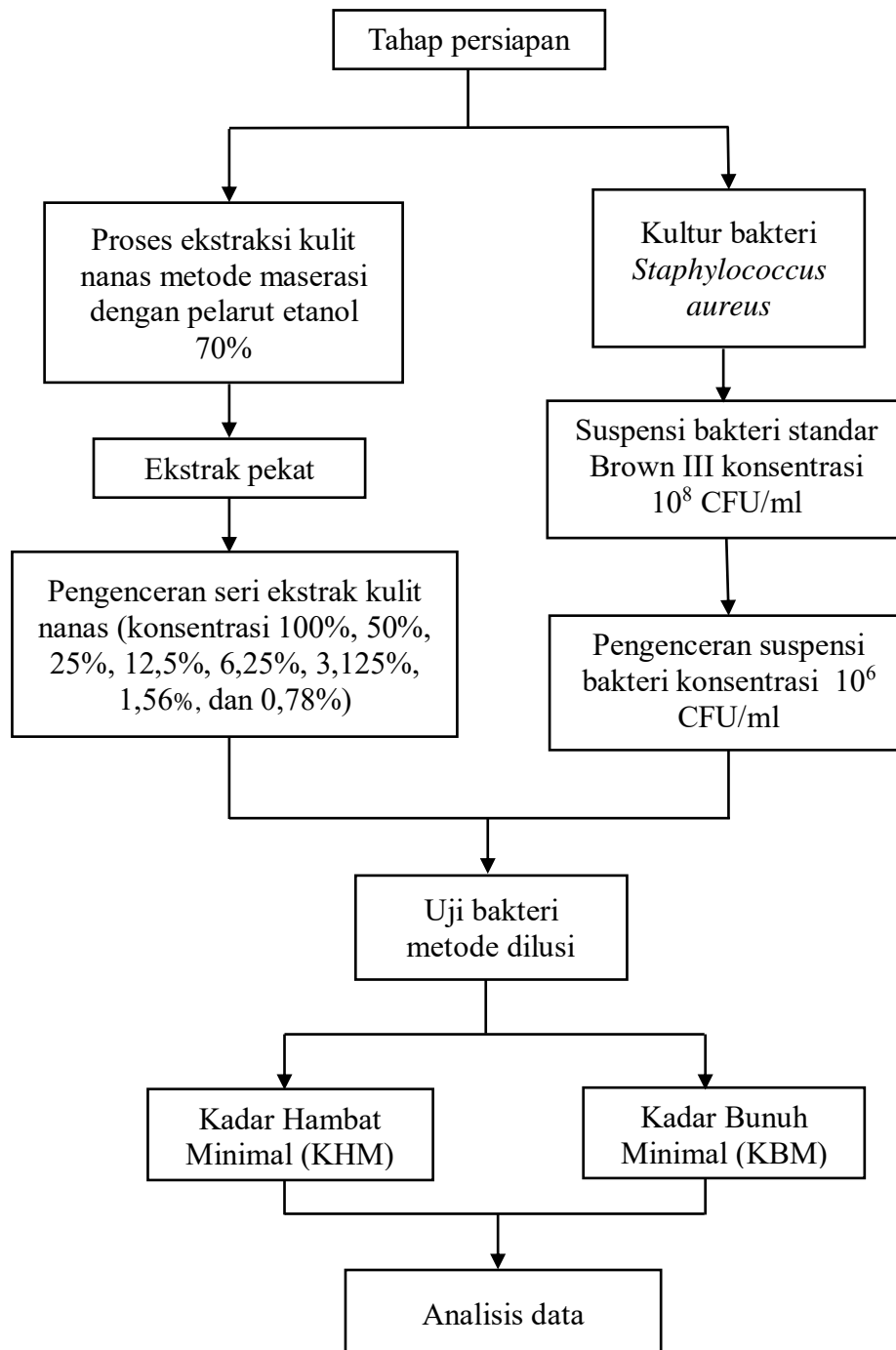
5. Cara Pengukuran hasil Penelitian

Pengaruh ekstrak kulit nanas terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* 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 dilakukan secara deskriptif. Hasil penelitian disajikan menggunakan tabel.

I. Alur Penelitian



Gambar 1. Bagan alur penelitian