

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian yang saya lakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*.

B. Subyek Penelitian

1. Bakteri yang diuji : Bakteri *Fusobacterium nucleatum* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi.
2. Kulit nanas (*Ananas comosus*).
3. Pertumbuhan *Fusobacterium nucleatum* setelah diberi perlakuan terhadap beberapa konsentrasi ekstrak kulit buah nanas.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di laboratorium teknologi farmasi, laboratorium penelitian, laboratorium biokimia, dan laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh adalah konsentrasi ekstrak etanol kulit nanas (*Ananas comosus*).
2. Variabel Terpengaruh adalah kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) bakteri *Fusobacterium nucleatum*.
3. Variabel Terkendali
 - a. Konsentrasi ekstrak etanol kulit buah nanas (*Ananas comosus*)
 - b. Volume ekstrak etanol etanol kulit buah nanas (*Ananas comosus*)
 - c. Bakteri *Fusobacterium nucleatum*
 - 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 buah nanas (*Ananas comosus*).

E. Definisi Operasional

1. *Fusobacterium nucleatum* merupakan bakteri gram positif, memiliki dinding sel yang tebal, berbentuk bulat, sampai lonjong serta tidak berspora.
2. Kulit nanas adalah bagian terluar dari buah nanas yang memiliki kulit tidak rata serta berduri kecil pada permukaannya.
3. Maserasi adalah metode ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam cairan ekstraksi.
4. Metode dilusi adalah metode pengukuran antimikroba dengan cara pengenceran berseri (cair) dan metode dilusi padat.
5. Kadar hambat minimal atau KHM adalah kadar hambat minimal pertumbuhan mikroba. KHM dilihat dari kejernihan dan rangkaian seri pengenceran.
6. Kadar Bunuh Minimal atau KBM adalah kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba.

F. Instrument Penelitian

- a. Alat :
1. Autoklaf
 2. Botol steril

3. Cawan petri
 4. *Cotton bud* steril
 5. Gelas ukur
 6. Enlemeyer
 7. *Handscoon*
 8. *Hot plate*
 9. Inkubator
 10. Jarum ose
 11. Kain kasa steril
 12. Kaliper
 13. Kapas steril
 14. Kertas cakram
 15. Kertas label
 16. Kertas saring *whatman*
 17. Lampu spiritus
 18. Lemari asepsis
 19. Masker
 20. Mikro pipet
 21. Pisau steril
 22. *Rotary evaporator*
 23. Sonikator
 24. Timbangan
 25. Tisu
- b. Bahan
1. Ekstrak etanol kulit buah nanas

2. Etanol 70%
3. Kapas
4. Agar darah
5. Aquades
6. Bakteri *Fusobacterium nucleatum*

G. Jalannya Penelitian

1. Menyiapkan Peralatan dan Bahan

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu dicuci bersih dan dikeringkan. 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 autoklaf 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.

2. Pembuatan Ekstrak Kulit Nanas

Kulit nanas yang digunakan pada penelitian ini adalah nanas matang jenis Nanas Batu yang didapat dari pedagang buah Pasar Bringharjo. Nanas ini dipilih karena paling banyak ditemui dan dikonsumsi oleh masyarakat. Sehingga limbah kulit nanas yang tidak terpakai bisa dijadikan bahan penelitian.

Cara pembuatan kulit nanas adalah sebagai berikut:

- i. Mencuci 300 gram kulit nanas kemudian duri yang ada pada bagian luar kulit dibuang.
- ii. Selanjutnya kulit nanas dipotong kecil-kecil, kemudian diangin-

inginkan pada suhu kamar.

- iii. Kulit nanas tersebut selanjutnya dimaserasi dengan pelarut etanol 70 % selama 3×24 jam (tiap 24 jam dikocok) lalu dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Dilakukan pengulangan yang sama hingga hari ke 9 dengan penggantian pelarut setiap 3 hari sekali.
- iv. Didapatkan maserat sebanyak 3,7 liter, kemudian diuapkan sampai bebas dari pelarut etanol menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 450°C dan dilakukan pengeringan untuk mendapatkan ekstrak kering kulit nanas dengan menggunakan *freeze dryer* selama 5 jam. Sehingga didapatkan ekstrak berwarna coklat pekat dengan konsistensi solid sebanyak 4,82 gram.
- v. Pembuatan ekstrak kulit nanas dalam berbagai konsentrasi menggunakan sediaan ekstrak konsentrasi 100% didapat dari 1 gram ekstrak kulit nanas dicampur dengan 1 ml etanol 90%. Sediaan ekstrak 75% dilakukan dengan mengambil 0,75 gram ekstrak kulit nanas dicampur dengan 1 ml etanol 70%. Sediaan ekstrak 50% dilakukan dengan mengambil 0,5 gram ekstrak kulit nanas dicampur dengan 1 ml etanol 70%. Sediaan ekstrak 25% dilakukan dengan mengambil 0,25 gram ekstrak kulit nanas dicampur dengan 1 ml etanol 70%.

3. Persiapan Bakteri Uji

Bakteri *Fusobacterium nucleatum* yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Kota Yogyakarta diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY dengan cara diinkubasi 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 10^8 CFU/ml. Kemudian diencerkan lagi dengan menggunakan medium cair BHI sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml.

4. Cara penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)

- i. Pada penelitian ini dilakukan 3 kali percobaan, di setiap percobaan menggunakan 10 tabung reaksi dengan volume 5 ml.
- ii. Tabung reaksi disiapkan dan diberi nomor 1 sampai 10.
- iii. Aquades sebanyak 1 ml dimasukkan pada tabung ke-2 sampai dengan tabung ke-8.
- iv. Tabung ke-1 diisi ekstrak pada konsentrasi awal yaitu 100% sebanyak 1 ml.
- v. Tabung ke-2 ditambahkan ekstrak 100% sebanyak 1 ml kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 50%.
- vi. Tabung ke-3 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-2 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 25%.
- vii. Tabung ke-4 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-3 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 12,5%.

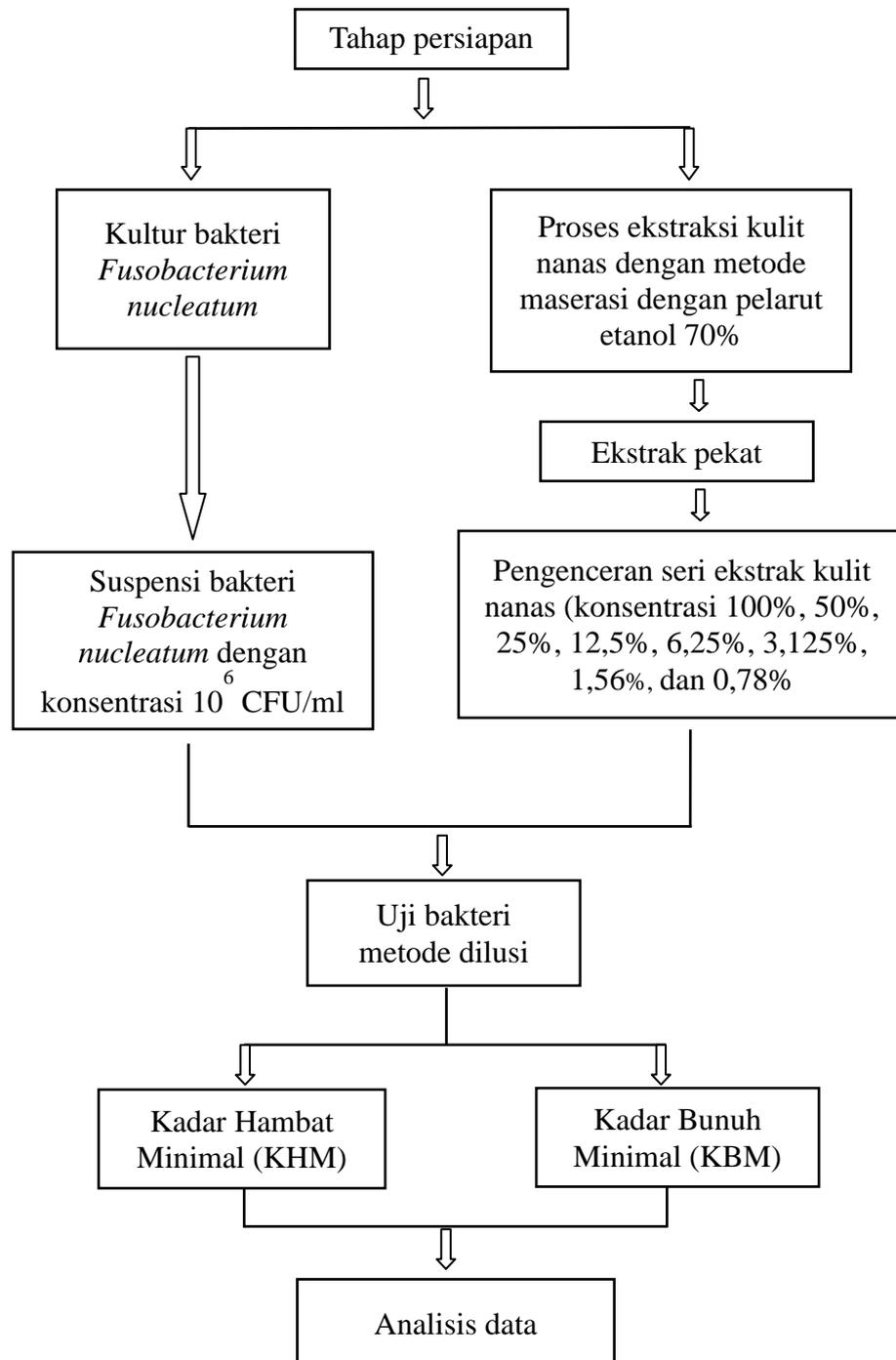
- viii. Tabung ke-5 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-4 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 6,25%.
- ix. Tabung ke-6 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-5 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 3,125%.
- x. Tabung ke-7 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-6 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 1,56%.
- xi. Tabung ke-8 ditambahkan 1 ml larutan yang diambil dari tabung ke-7 kemudian dicampur hingga homogen, sehingga konsentrasi larutan menjadi 0,78%.
- xii. Tabung ke-9 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari sisa pengenceran pada tabung ke-8 sebagai kontrol negatif.
- xiii. Tabung ke-10 diisi 1 ml aquades dan 1 ml larutan suspensi bakteri sebagai kontrol positif.
- xiv. Tabung ke-1 sampai tabung ke-8 yang sudah berisi ekstrak kulit nanas sesuai konsentrasinya ditambahkan larutan suspensi bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml untuk tiap tabung.
- xv. Semua tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- xvi. Pertumbuhan bakteri dilihat dengan mengamati tingkat kejernihan larutan pada setiap tabung setelah diinkubasi dan membandingkannya dengan kontrol positif.

- xvii. Kadar Hambat Minimal (KHM) diperoleh dengan mengamati tabung ke-1 sampai 8 yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah.
- xviii. Larutan yang tidak memperlihatkan pertumbuhan kuman diambil menggunakan ose steril kemudian ditanam pada media *Tryptone soya agar* (TSA).
- xix. Setelah ditanam pada media TSA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- xx. 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 *Fusobacterium nucleatum* didapatkan dengan mengamati Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Kadar Hambat Minimal (KHM) ditentukan dengan mengamati secara langsung ada atau tidaknya kekeruhan pada tabung dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Kekeruhan pada tabung menandakan terdapat pertumbuhan bakteri. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan melihat ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri dalam media TSA pada konsentrasi terendah.

H. Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian