

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

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

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental semu laboratoris (*in vitro*). *In vitro* adalah jenis pemeriksaan yang dilakukan dalam tabung reaksi, piring kultur sel atau di luar tubuh makhluk hidup, syarat penelitian tersebut adanya kontak secara langsung tanpa barrier antara bahan atau suatu komponen bahan dengan sel, enzim, atau isolasi dari suatu sistem biologik.

#### **B. Populasi dan Sampel Penelitian**

##### 1. Bahan Uji

Ekstrak kulit buah nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%, 0,78%; 0,39%.

##### 2. Bakteri Uji

Pengujian ekstrak kulit nanas dengan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

##### 3. Besar Sampel

Jumlah sampel yang digunakan dihitung menggunakan rumus federer. Kelompok perlakuan terdiri dari 11 yaitu konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%, 0,78%; 0,39% ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*), kontrol negatif, kontrol positif.

Besar sampel yang digunakan pada penelitian ini dapat dihitung dengan Rumus Federer (1963)  $= (n-1) (t-1) \geq 15$  dengan  $t =$  jumlah kelompok perlakuan dan  $n$  adalah jumlah ulangan. Diketahui  $t = 11$  , ditanyakan  $n$  ?

$$(n-1) (11-1) \geq 15$$

$$10n - 10 \geq 15$$

$$10n \geq 15 + 10$$

$$10n \geq 25$$

$$n \geq 3$$

Jadi pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak 3 kali.

Besar sampel penelitian sebanyak 33.

### C. Lokasi dan waktu

Proses ekstraksi kulit buah nanas dilakukan di LPPT (Laboratorium Penelitian dan pengujian Terpadu) Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengujian ekstrak kulit buah nanas (*Ananas comosus*) dengan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah di Yogyakarta. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Juni 2015.

#### D. Identifikasi Variabel

##### 1. Variabel pengaruh

Ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) pada konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%; 1,56%, 0,78%; 0,39% yang diperoleh dengan dilusi (metode pengenceran berseri).

##### 2. Variabel terpengaruh

Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

##### 3. Variabel terkontrol

- a. Biakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- b. lama pembiakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (24 jam)
- c. Jenis media pembiakan adalah *Brain Heart infusion* (BHI)
- d. Larutan kuman yang digunakan adalah larutan standar dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml. CFU adalah *Colony Forming Unit*. CFU/ml merupakan satuan yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi atau kekeruhan suatu larutan
- e. Jenis media kultur *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah *Triom Soya Agar* (TSA)
- f. Suhu inkubasi metode dilusi  $37^{\circ}\text{C}$
- g. Jenis buah nanas
- h. Asal buah nanas
- i. Warna buah nanas hijau
- j. Arah potongan kulit nanas

- k. Sterilisasi alat.
4. Variabel tak terkendali
    - a. Zat aktif yang terkandung dalam ekstrak kulit nanas
    - b. Umur buah nanas
    - c. Ketebalan kulit buah nanas.

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

1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* adalah bakteri gram negatif yang berbentuk kokobasil, tidak berspora, tidak bergerak, tidak bercabang, dan bersifat anaerob fakultatif.
2. Kulit nanas adalah bagian terluar buah yang memiliki tekstur tidak rata dan berduri kecil pada permukaan.
3. Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperature ruangan (Dirjen POM, 2000).
4. Metode dilusi yaitu metode pengukuran antimikroba dengan cara pengenceran berseri (cair) dan metode dilusi padat (Pratiwi, 2008).
5. Kadar Hambat Minimal (KHM) yaitu kadar minimal yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Pratiwi, 2008).
6. Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba dan untuk menentukan ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media TSA setelah pemberian antibakteri yang diuji (Pratiwi, 2008).

7. Kontrol positif adalah tabung reaksi yang berisi biakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* tanpa diberi ekstrak kulit nanas
  8. Kontrol negatif adalah tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak kulit nanas dari tabung reaksi sebelumnya tanpa diberikan akuades maupun bakteri
- Aa. Kontrol digunakan sebagai acuan pembandingan kejernihan dan tingkat pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

#### **F. Instrument Penelitian**

1. Alat Penelitian
  - a. Corong *Buchner*
  - b. Blender
  - c. Timbangan Elektrik
  - d. *Rotary Evaporator*
  - e. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
  - f. Tabung elmeyer
  - g. Ose steril
  - h. Pipet ukur
  - i. *Autoclave*
  - j. Inkubator
  - k. Cawang petri
  - l. Vortex
  - m. Kompor listrik
  - n. Potsio (Pot sampel)
  - o. Masker

- p. Kapas steril
  - q. Sarung tangan.
2. Bahan Penelitian
- a. Biakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
  - b. Larutan etanol 70%
  - c. Akuades steril
  - d. Kulit nanas (*Ananas Comosus*)
  - e. NaCl
  - f. Media *Brain Heart Infusion* (BHI)
  - g. Media *Triton Soya Agar* (TSA).

## **G. Cara Penelitian**

1. Persiapan Penelitian
- a. Perijinan penggunaan Laboratorium

Membuat surat perijinan penggunaan laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY untuk digunakan selama penelitian berlangsung. Setelah itu menguji validitas dan reabilitas instrumen penelitian dengan memastikan bahwa semua alat sudah dalam keadaan steril.

- b. Cara pembuatan ekstrak kulit nanas

Ekstrak kulit nanas dibuat dengan metode maserasi. Buah nanas dicuci dan diangin-anginkan kemudian dikupas kulitnya serta dipotong-potong. Kulit nanas dioven dengan temperatur (50°C) selama 4-5 hari, setelah itu kulit nanas dijadikan bentuk serbuk dengan blender. Serbuk dimaserasi menggunakan etanol 70% selama 24 jam,

kemudian disaring dengan corong *Buchner*. Filtrat diupakan untuk menghilangkan pelarutnya sampai habis dengan menggunakan *Rotary Evaporator* sehingga didapatkan ekstrak kental kulit buah nanas.

c. Pemiakan bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

- 1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* diambil dengan menggunakan ose steril dan dilakukan subkultur pada media TSA (*Triton Soya Agar*)
- 2) Media TSA (*Triton Soya Agar*) diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam
- 3) Biakan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang tumbuh pada media TSA dimasukan kedalam larutan NaCL 1ml, selanjutnya diinkubasi dengan suhu 37°C selama 2- 5jam
- 4) Larutan Suspensi bakteri dimasukan kedalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) sampai mendapatkan konsentrasi  $10^8$  CFU/ml, kemudian dilakukan pengenceran sampai didapatkan konsetrasi  $10^6$  CFU/ml.

2. Jalan Penelitian

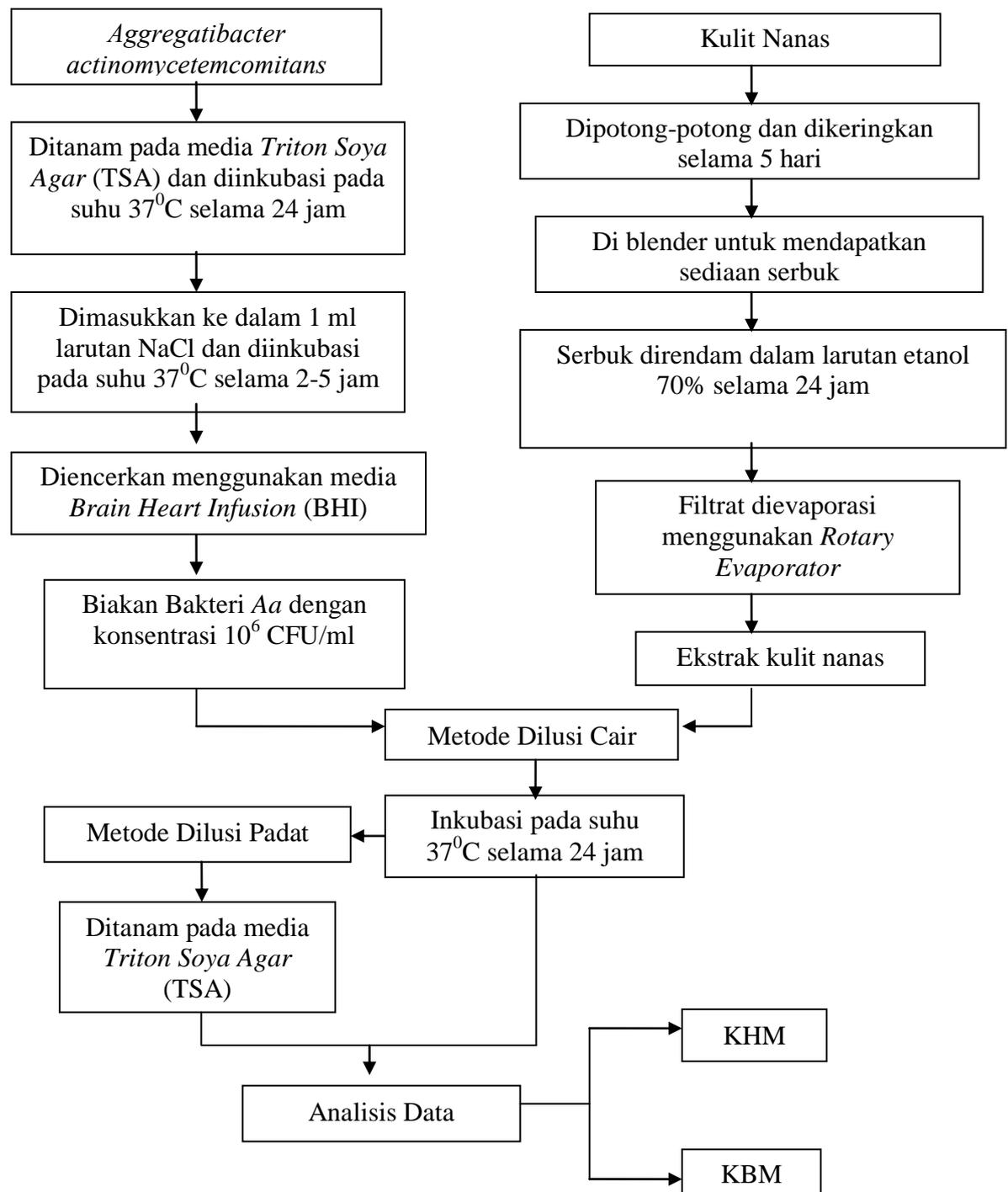
- a. Tabung reaksi berjumlah 11 disiapkan dan di tandai nomor 1-11
- b. Akuades dimasukan sebanyak 1 ml pada tabung 2-10
- c. Tabung 1 diisi larutan ekstrak pada konsentrasi awal sebanyak 1 ml yang merupakan konsetrasi 100%

- d. Tabung 2 diisi larutan ekstrak pada konsentrasi awal sebanyak 1 ml setelah itu dicampur hingga homogen, maka konsentrasi larutan menjadi 50%
- e. Tabung 3 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 2, maka konsentrasi larutan menjadi 25%
- f. Tabung 4 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 3, maka konsentrasi larutan menjadi 12,5%
- g. Tabung 5 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 4, maka konsentrasi larutan menjadi 6,25%
- h. Tabung 6 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 5, maka konsentrasi larutan menjadi 3,125%
- i. Tabung 7 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 6, maka konsentrasi larutan menjadi 1,56%
- j. Tabung 8 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 7, maka konsentrasi larutan menjadi 0,78%
- k. Tabung 9 diisi larutan sebanyak 1 ml yang diambil dari tabung 8, maka konsentrasi larutan menjadi 0,39%
- l. Tabung 10 (kontrol negatif) diisi larutan sebanyak 1ml yang diambil dari tabung 9, yang berisi larutan ekstrak kulit nanas 0,39% sebanyak 1 ml.
- m. Tabung 1-9 setelah diisi ekstrak kulit nanas sesuai konsentrasinya, kemudian diisi larutan suspensi bakteri *Aa* dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml sebanyak 1 ml pada tiap tabung

- n. Tabung 11 (kontrol positif) diisi larutan akuades 1 ml dan larutan suspensi bakteri *Aa*
  - o. Seluruh tabung di inkubasi dengan suhu 37°C dengan waktu 24 jam
  - p. Pertumbuhan bakteri dilihat dengan mengamati tingkat kejernihan larutan disetiap tabung
  - q. Kadar Hambat Minimal (KHM) didapatkan dengan mengamati tabung yang menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terendah
  - r. Larutan yang tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri diambil menggunakan ose steril dan ditanam pada TSA, kemudian diinkubasi 37°C selama 24 jam
  - s. Kadar Bunuh Minimal (KBM) diperlihatkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri di media TSA pada konsentrasi terendah
  - t. Percobaan dilaksanakan dengan pengulangan sebanyak tiga kali yang didapatkan berdasarkan rumus Federer.
3. Cara Pengukuran Hasil Penelitian

Pengaruh pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* terhadap ekstrak kulit nanas ditentukan dengan mengamati Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). KHM dapat ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan larutan pada tabung reaksi yang dibandingkan dengan larutan tabung kontrol positif dan kontrol negatif. KBM dapat ditentukan dengan mengamati terdapat atau tidak terdapat pertumbuhan koloni *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada media TSA.

## H. Alur Penelitian



Gambar 1. Skema Alur Penelitian

## I. Analisa Data

Data hasil penelitian mengenai daya antibakteri ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) terhadap pertumbuhan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dianalisis dengan menggunakan uji statistik deskriptif, yaitu data penelitian yang diperoleh dan dianalisis dengan deskriptif untuk mengetahui rata-ratanya. Analisa statistika deskriptif bertujuan untuk memberikan gambaran mengenai suatu data agar data yang tersaji mudah dipahami bagi pembaca.