

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris murni secara *in vitro*.

B. Populasi dan Sampel

1. Bakteri uji : bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari karies gigi anak di RSGM UMY
2. Bahan uji : kulit nanas dengan konsentrasi 6,25% yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perkebunan yang ada di Yogyakarta.

C. Tempat dan Waktu

Pembuatan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dilakukan di laboratorium penelitian dan pengujian terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pengujian pengaruh ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) terhadap *Streptococcus mutans* dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juni 2014

D. Identifikasi Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh : Ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25% pada waktu kontak 30 detik, 60 detik, 120 detik dan 180 detik.
2. Variabel terpengaruh : Pertumbuhan *Streptococcus mutans*
3. Variabel terkendali :
 - a. Ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*)
 - b. Biakan *Streptococcus mutans*
 - c. Suhu pembiakan *Streptococcus mutans* 37⁰C
 - d. Lama pembiakan *Streptococcus mutans* selama 24 jam
 - e. Larutan kuman yang digunakan adalah larutan standar dengan konsentrasi 10⁶ CFU/ml. CFU adalah *Coloni Forming Unit*. CFU/ml adalah satuan yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi atau kekeruhan suatu larutan.
 - f. Jenis media kultur *Streptococcus mutans* adalah *Tryptone Soya Agar* (TSA)
 - g. Suhu inkubasi metode dilusi 37⁰C
 - h. Sterilisasi alat
4. Variabel tidak terkendali :
 - a. Jenis buah nanas (*Ananas comosus*)

E. Definisi Operasional

1. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri yang diambil dari karies gigi anak di RSGMP. UMY
2. kulit nanas merupakan bagian terluar dari buah nanas yang mengandung senyawa aktif, fenol, selafonoid dan enzim *bromelin*.
3. Metode maserasi adalah metode pembuatan ekstrak dengan perendaman simplisia dalam larutan etanol dalam 3 hingga 5 hari yang kemudian akan dievaporasi dan diambil ekstraknya.
4. Metode dilusi adalah metode pengukuran anti mikroba dengan cara pengenceran berseri (cair) dan metode dilusi padat
5. Kadar Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.
6. Kadar Bunuh Minimal (KBM) merupakan kadar terkecil suatu zat yang masih dapat membunuh mikroba tertentu.
7. Kontrol positif berupa tabung reaksi yang berisi biakan *Streptococcus mutans* tanpa diberi ekstrak kulit nanas dan kontrol negatif berupa tabung reaksi yang berisi larutan ekstrak kulit nanas dari tabung reaksi sebelumnya tanpa diberi akuades maupun *Streptococcus mutans*. Kontrol digunakan sebagai tingkat acuan pembandingan kejernihan dan tingkat pertumbuhan *Streptococcus mutans*.
8. Ekstraksi adalah proses pengeluaran enzim dari dalam sel sel jaringan

- h. Masker
- i. Sarung tangan

G. Cara Kerja Penelitian

1. Persiapan penelitian

a. Cara pembuatan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*)

Pembuatan ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan metode maserasi. Buah nanas dicuci kemudian dikupas kulitnya dan dipotong-potong. Kulit nanas dikeringkan. Kulit nanas dibuat serbuk menggunakan blender. Serbuk dimaserasi selama 24 jam menggunakan etanol, kemudian disaring menggunakan corong *Buchner*. Filtrat diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya menggunakan *Rotary Evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kulit nanas.

b. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

- 1) *Streptococcus mutans* diambil dari biakan murni dengan menggunakan ose steril dan ditanam pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA)
- 2) Media *Tryptone Soya Agar* (TSA) diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam
- 3) Biakan *Streptococcus mutans* yang tumbuh pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) dimasukkan kedalam larutan NaCl 1 ml, kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 2-5 jam

- 4) Larutan suspensi bakteri dimasukkan kedalam media *Brain Heart Infusion* (BHI) hingga mencapai konsentrasi 10^8 CFU/ml. Kemudian dilakukan pengenceran sampai didapatkan konsentrasi 10^6 CFU/ml.

2. Jalan penelitian

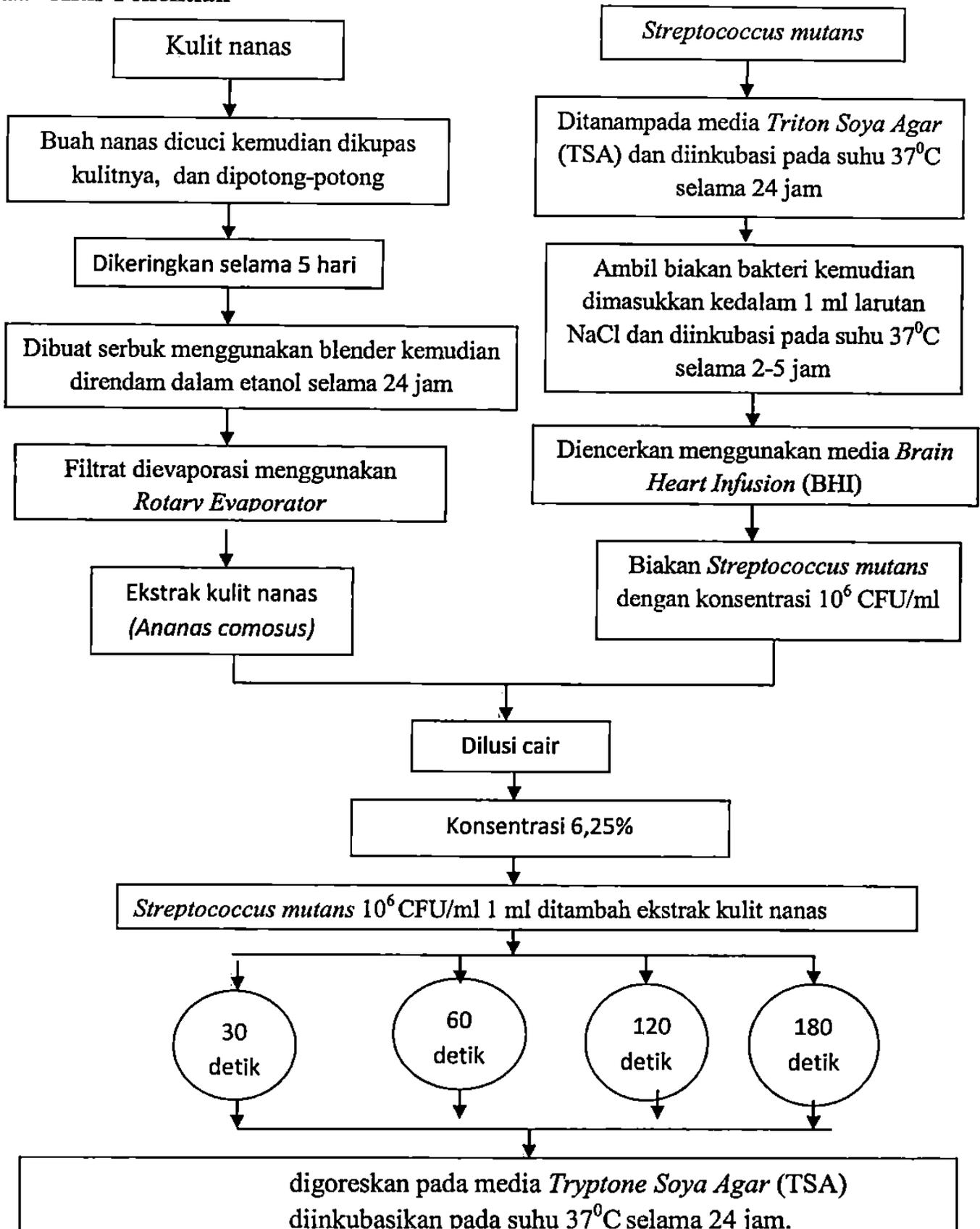
- a. Tabung reaksi disiapkan sebanyak 4 tabung.
- b. Media *Tryptone Soya Agar* (TSA) disiapkan 4 buah.
- c. Tabung 1 diisi larutan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml pada waktu kontak 30 detik ditambah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25%. Hasilnya digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- d. Tabung 2 diisi larutan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml pada waktu kontak 60 detik ditambah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25%. Hasilnya digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- e. Tabung 3 diisi larutan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml pada waktu kontak 120 detik ditambah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25%. Hasilnya digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

- f. Tabung 4 diisi larutan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml pada waktu kontak 180 detik ditambah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25%. Hasilnya digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA). kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g. Kadar Bunuh Minimal (KBM) diketahui dengan melihat hasil dari konsentrasi bunuh minimal. Tabung 1-4 diisi larutan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml ditambah ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) dengan konsentrasi 6,25%, kemudian menghitung waktu kontak. Yaitu 30 detik, 60 detik, 120 detik, dan 180 detik. Setelah di dapatkan hasil dari setiap tabung kemudian Hasilnya digoreskan pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA) diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.
- h. Mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dengan melihat jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA).

3. Cara Pengukuran Hasil Penelitian

Pengaruh ekstrak kulit nanas (*Ananas comosus*) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* ditentukan dengan mengamati Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM). Kadar hambat minimum ditentukan dengan melihat jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media *Tryptone Soya Agar* (TSA)

H. Alur Penelitian



I. Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini dilakukan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk*. Uji *One Way Anova* digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni dari keempat waktu kontak yang telah ditentukan, dilanjutkan *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui perbedaan besarnya antara kedua kelompok.