

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Februari – Juni 2019. Tempat penelitian yang digunakan yaitu di Laboratorium Mikrobiologi (Laboratorium 7) dan Laboratorium Farmakognosi (Laboratorium 9) Universitas Setia Budi Surakarta.

B. Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian observasional dengan pendekatan *Cross sectional*, yaitu penelitian yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah naga merah terhadap *Staphylococcus aureus* dari kultur murni dan kultur sampel klinis dari Rumah Sakit. Penelitian ini dilakukan dengan cara mengekstrak kulit buah naga merah dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu, 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% yang kemudian diuji daya hambat antibakteri menggunakan metode difusi. Zona hambat yang terbentuk dibandingkan dengan kontrol positif (Kloramfenikol) dan kontrol negatif (DMSO 2%). Penelitian ini juga menguji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode dilusi cair dan uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode dilusi padat.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah naga merah yang diperoleh dari pasar Cawas, Klaten, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah naga merah yang diambil dengan kriteria buah yang memiliki warna kulit merah mengkilap, jumbai atau sisik berwarna kemerahan yang diperoleh dari pasar Cawas, Klaten, Jawa Tengah.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel independen (variabel bebas)

Variabel bebas adalah variabel yang dapat diubah-ubah dan mempengaruhi variabel terikat (dependent). Variabel bebas dalam penelitian ini konsentrasi ekstrak kulit buah naga merah.

2. Variabel dependen (variabel terikat)

Variabel terikat adalah variabel yang dapat berubah dan dipengaruhi oleh variabel bebas (independent). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya hambat terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dari kultur laboratorium dan isolat sampel pus pasien yang dinilai dengan terbentuknya zona hambat.

3. Definisi operasional variabel

Pertama, kulit buah naga merah yang diambil dari buah yang kriteria buah yang memiliki warna kulit merah mengkilap, jumbai atau sisik berwarna kemerahan yang diperoleh dari pasar Cawas, Klaten, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk kulit buah naga merah adalah kulit yang diambil kemudian dicuci bersih dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dikeringkan dengan diangin-anginkan di tempat yang terhindar dari sinar matahari dibantu dengan pengeringan di oven kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan dengan ukuran 40 mesh.

Ketiga, ekstrak etanolik kulit buah naga merah diperoleh dengan metode perkolasi menggunakan pelarut etanol 70% yang kemudian dipekatkan sampai bebas etanol, setelah itu dibuat beberapa konsentrasi dengan menggunakan DMSO 2%.

Keempat, penelitian ini menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dari kultur murni dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan kultur dari isolat sampel pus pasien Rumah Sakit.

Kelima, metode difusi adalah metode yang digunakan untuk mengukur daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri. Kontrol negatif menggunakan pelarut DMSO 2% dan kontrol positif menggunakan antibiotik (Kloramfenikol). Metode dilusi adalah berupa seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi, dengan kontrol negatif hasil ekstraksi dan kontrol positif menggunakan suspensi bakteri.

E. Bahan dan Alat

1. Alat

Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah alat perkolator, evaporator, oven, timbangan atau neraca analitik, ayakan ukuran 40 mesh, *becker glass*, *boor proof*, cawan petri steril, kapas, lidi steril, pipet ukur steril, lampu

spiritus, inkas, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, jarum ose, *object glass*, mikroskop, inkubator, *autoclave*, kompor, mistar, dan alat pelindung lengkap.

2. Bahan

2.1. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*).

2.2. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang diambil dari kultur isolat sampel pus pasien Rumah Sakit Dr. Moewardi dan biakan murni bakteri *Staphylococcus aureus* yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

2.3. Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Mueller Hilton Agar* (MHA), *Vogel Jhonson Agar* (VJA), dan *Brain Heart Infusion* (BHI).

2.4. Bahan Lain

Bahan kimia yang digunakan antara lain pelarut etanol 70%, Xylen, akuadest, pewarnaan Gram (cat kristal violet, lugol iodine, alkohol acetone, dan cat safranin), hidrogen peroksida 3%, Kloramfenikol, HCL 2N, HCL pekat, CH₃COOH, H₂SO₄ pekat, pereaksi Dragendrof, serbuk seng, FeCl₃ 1%, Kloroform, plasma citrat, kalium tellurit, HCL 2%, etanol-asam klorida, amil alkohol, asam asetat anhidrat, DMSO 2%, dan standar Mc. Farland 10⁸ CFU/ml.

F. Prosedur Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Tahap pertama penelitian adalah determinasi tanaman yang dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman buah naga merah sesuai kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi FMIPA Universitas Sebelas Maret.

2. Pembuatan Serbuk Kulit Buah Naga

Buah naga merah sebanyak 15 kg dicuci dengan air mengalir sampai bersih, kemudian dikupas dan dipisahkan kulitnya. Kulit yang telah didapatkan di sortasi basah dan potong kecil-kecil, setelah itu dikeringkan dengan diangin-anginkan di tempat yang terhindar dari sinar matahari selama empat hari. Kulit buah naga merah yang sudah diangin-anginkan kemudian dioven dengan suhu 50°C selama 24 jam kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh (Hardiana, 2016).

3. Penentuan Nilai Kadar Air Serbuk Kulit Buah Naga Merah

Penetapan kadar air kulit buah naga merah dengan menimbang bahan serbuk sebanyak 20 gram dan dimasukkan dalam labu alas bulat kemudian ditambahkan *Xylen* 100 ml atau sampai semua bahan terendam. Pasang alat destilasi *Bidweel Sterling* dan dipanaskan dengan api kecil, pemanasan dihentikan apabila sudah tidak ada air yang menetes lagi pada tabung *Receiver* kemudian baca volume air yang telah terdestilasi pada skala *Receiver* (Anggraini, 2017).

4. Pembuatan Ekstrak Perkolasi Kulit Buah Naga Merah

Serbuk kulit buah naga yang telah didapatkan di timbang kemudian di masukkan ke *Beaker Glass* dan ditambah dengan etanol 70%, ditutup dan didiamkan selama 24 jam, kemudian dimasukkan kedalam bejana silindris yang diberi sekat berpori, etanol dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk secara terus menerus dengan kecepatan 1ml/menit dan diatur supaya cairan keluar seimbang dengan cairan yang ditambahkan dari atas perkolator. Perkolasi dihentikan jika cairan yang keluar tidak berwarna dan jika diuapkan tidak meninggalkan sisa (Anggraini, 2017).

5. Uji Bebas Etanol

Ekstrak yang telah pekat diuji sudah bebas etanol atau belum dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Anggraini, 2017).

6. Identifikasi Golongan Senyawa

6.1. Flavonoid

Sebanyak 2 ml ekstrak ditambah 2 ml etanol 95%, 0,05 gram serbuk seng dan 2 ml HCL 2N. Larutan didiamkan selama 1 menit dan kemudian ditambah 2 ml HCL pekat. Hasil positif jika terbentuk warna merah jingga atau kuning (Rumagit *et al*, 2015).

6.2. Alkaloid

Ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 2 ml ditambahkan dengan 5 tetes reagen Dragendroff, jika terbentuk endapan jingga maka positif mengandung alkaloid (Ergina *et al*, 2014).

6.3. Tanin

Ekstrak kulit buah naga merah dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl_3 1%, jika bahan mengandung tanin maka akan dihasilkan larutan berwarna hijau kehitaman atau biru tua (Simaremare, 2014).

6.4. Saponin

Sebanyak 2 ml ekstrak ditambah 10 ml aquadest panas dalam tabung reaksi. Dikocok kuat-kuat selama 10 detik, kemudian ditambah beberapa tetes HCL 2N. Hasil positif jika terbentuk busa stabil (Lanisthi *et al*, 2015).

6.5. Steroid dan triterpenoid

Ekstrak kulit buah naga merah sebanyak 2 ml ditambahkan CH_3COOH glasial sebanyak 10 tetes dan H_2SO_4 pekat sebanyak 2 tetes. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan selama beberapa menit, adanya steroid ditunjukkan oleh warna biru atau hijau, sedangkan triterpenoid memberikan warna merah atau ungu (Lanisthi *et al*, 2015).

7. Sterilisasi

Media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan *Autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat yang digunakan seperti cawan petri, tabung

reaksi, *Beaker Glass*, gelas ukur, dan erlenmeyer disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat seperti jarum ose disterilkan dengan pembakaran menggunakan lampu spiritus dan inkas disterilkan dengan menggunakan formalin.

8. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Bahan *Mueller Hinton Agar* (MHA) ditimbang sebanyak 28,5 gram, dimasukkan ke dalam panci dan ditambah aquadest sebanyak 750 ml selanjutnya dipanaskan hingga larut, setelah itu dimasukkan ke dalam *Beaker Glass* kemudian dituang ke tabung reaksi masing-masing 10 ml dan ditutup dengan kapas lalu disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media didinginkan sampai suhu $\pm 50^{\circ}\text{C}$, selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri steril, setelah dingin medium padat dibungkus dengan kertas dan disimpan di dalam kulkas (Astutik, 2018).

9. Pembuatan Media *Brain Heart Infusion* (BHI)

Bahan *Brain Heart Infusion* (BHI) ditimbang sebanyak 1,85 gram, dimasukkan ke dalam panci dan ditambah aquadest sebanyak 50 ml kemudian dipanaskan, setelah itu dimasukkan ke dalam *Beaker Glass* kemudian dituang ke dalam tabung reaksi masing-masing 5 ml disumbat dengan kapas lalu disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit, jika telah dingin dibungkus kertas kemudian disimpan dalam kulkas (Astutik, 2018).

10. Pembuatan Media *Vogel Johnson Agar* (VJA)

Bahan *Vogel Johnson Agar* (VJA) ditimbang sebanyak 3,05 gram dimasukkan ke dalam panci dan ditambah aquadest sebanyak 50 ml selanjutnya

dipanaskan hingga larut, setelah itu dimasukkan ke dalam *Beaker Glass* kemudian dituang ke dalam tabung reaksi dan disumbat dengan kapas, disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media didinginkan sampai suhu $\pm 50^\circ\text{C}$, selanjutnya dituangkan ke dalam cawan petri steril dan ditambah kalium tellurit, setelah memadat dibungkus dengan kertas dan disimpan di dalam kulkas (Anggraini, 2017).

11. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus*

11.1. Isolasi dan Identifikasi *Staphylococcus aureus* dari kultur laboratorium dan kultur isolat pus pasien

Sampel diinokulasikan secara goresan menggunakan jarum ose steril pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pertumbuhan koloni diamati pada medium *Vogel Johnson Agar* (VJA), hasil positif jika koloni berwarna hitam. Koloni yang tumbuh dilanjutkan ke medium cair *Brain Heart Infusion* (BHI). Pertumbuhan koloni kemudian dilakukan pengecatan Gram dan diamati dibawah mikroskop (Astutik, 2018).

11.2. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan Uji Katalase

Koloni yang tumbuh diuji katalase, larutan H_2O_2 3% ditetaskan di *Object Glass* kemudian diambil 1 ose koloni kemudian diamati adanya gelembung (pelepasan oksigen) (Dewi, 2013).

11.3. Identifikasi *Staphylococcus aureus* dengan Uji Koagulase

Koloni yang tumbuh diuji koagulase, plasma dipipet sebanyak 200 μl secara aseptis dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Biakan *Staphylococcus aureus* diambil dan ditambahkan sebanyak 3-4 koloni dan

dicampurkan dengan hati-hati. Hasil positif jika terbentuk gumpalan atau endapan di dasar tabung (Dewi, 2013).

12. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dari media *Vogel Johnson Agar* (VJA) diambil 2 ose dan dimasukkan ke dalam media cair BHI (*Brain Heart Infusion*) kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri diencerkan dengan media BHI baru hingga diperoleh kerapatan bakteri yang sesuai dengan standar Mc. Farland 10^8 CFU/ml (Astutik, 2018).

13. Pengujian Aktivitas Bakteri

13.1. Uji Daya Hambat pada *Staphylococcus aureus*

Media *Muller Hilton Agar* (MHA) yang telah padat di cawan petri steril di swab dengan suspensi bakteri secara merata kemudian didiamkan selama 5 menit, kemudian media tersebut dilubangi menggunakan *boor proof* dengan diameter 6 mm. Lubang tersebut dimasukkan larutan ekstrak yang akan diuji aktivitasnya sebanyak 50µL, selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sumuran.

13.2. Uji Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) pada *Staphylococcus aureus*

Penentuan KHM dilakukan dengan metode dilusi cair / *broth dilution test* (*Serial dilution*). Media uji yang digunakan yaitu *Brain Heart Infusion* (BHI). Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 8 tabung steril dengan konsentrasi 100%; 90%; 80%; 70%; 60%; 50%, kontrol (+), dan Kontrol (-). Tabung 1 yang merupakan kontrol negatif berisi larutan ekstrak kulit Buah Naga Merah sebanyak 2 ml. Tabung 2 sampai 7 berisi masing-masing konsentrasi

sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml secara aseptik. Tabung 8 sebagai kontrol positif hanya berisi suspensi bakteri, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi terkecil pada tabung yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji ditetapkan sebagai nilai KHM. Nilai KHM dinyatakan sebagai konsentrasi terendah ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) yang masih dapat menghambat bakteri uji.

13.3. Uji Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) pada *Staphylococcus aureus*

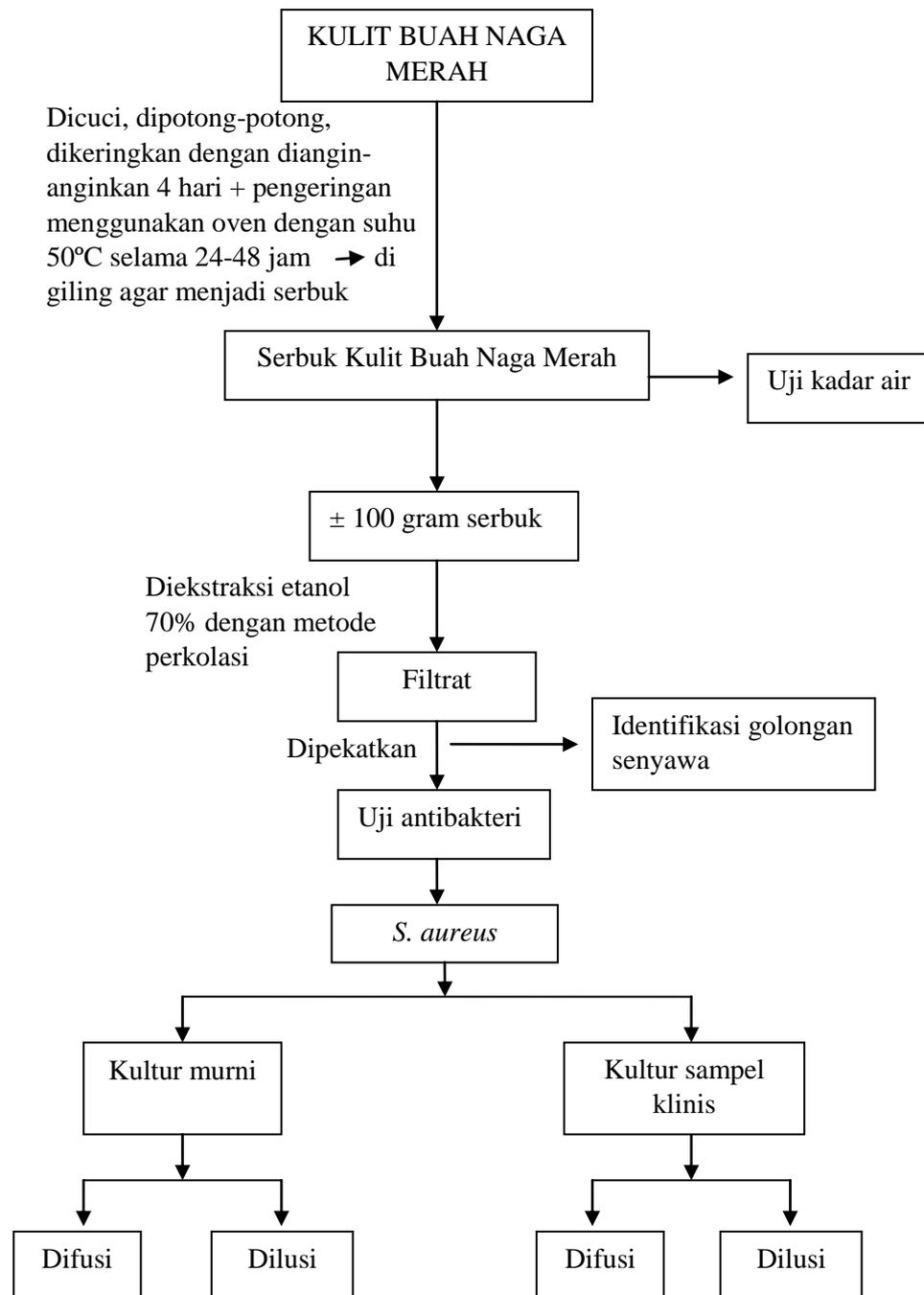
Penentuan KBM dilakukan dengan menggunakan metode dilusi padat. Media uji yang digunakan adalah *Vogel Johnson Agar* (VJA). Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ditentukan dengan cara tabung yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media VJA, kemudian diinkubasi 37°C selama 24-48 jam. Pengamatan hasil metode dilusi dilihat dari ada atau tidaknya koloni warna hitam dan di sekitar koloni berwarna kuning pada permukaan media. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) ditunjukkan pada konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh (Sari, 2017).

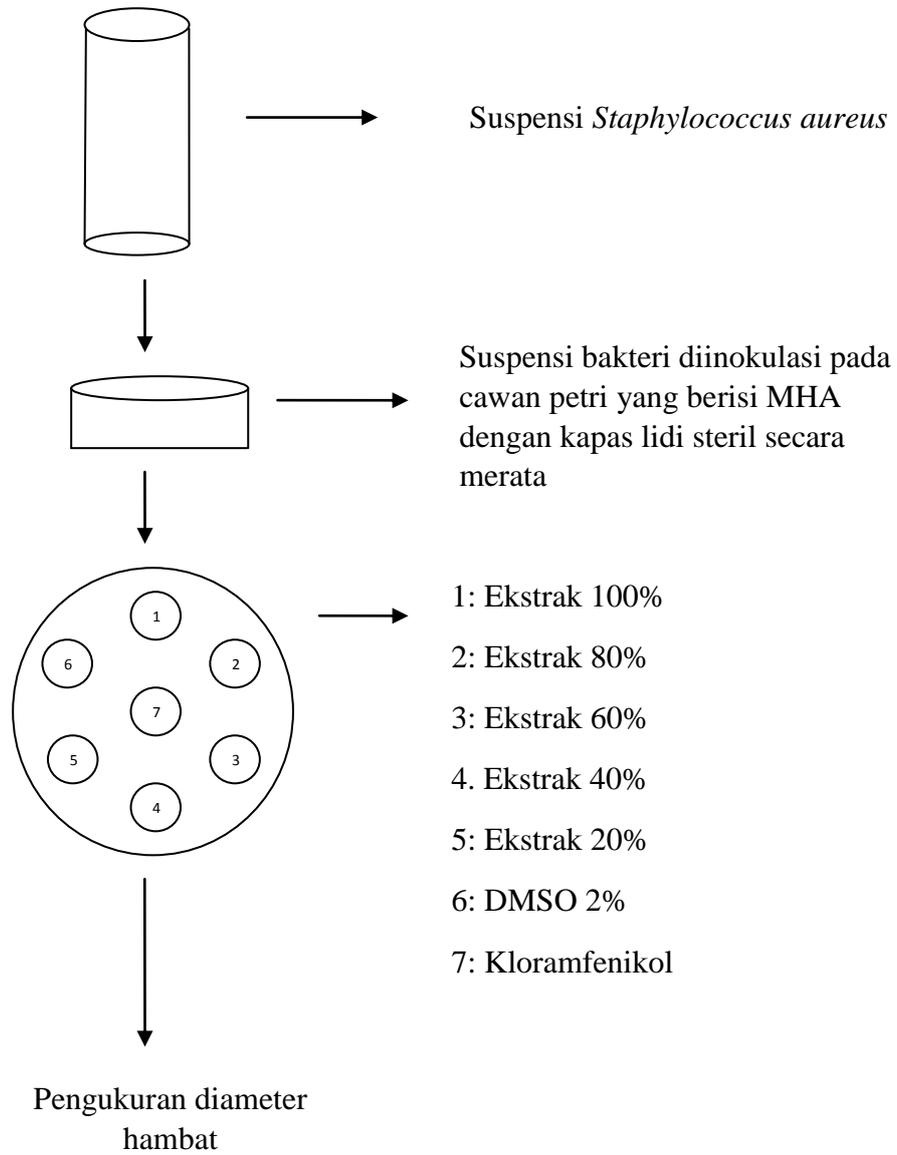
G. Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dari uji aktivitas antibakteri ekstrak etanolik kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* kultur murni dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan kultur isolat sampel pus pasien dari Rumah Sakit secara difusi dan dilusi dianalisis dengan menggunakan uji statistik. Uji statistik yang digunakan yaitu Analisis of Varians (ANOVA) satu arah dengan software spss 21. Analisis data dengan

statistik dilakukan untuk mengetahui ada beda atau tidak diameter hamat dari bakteri *Staphylococcus aureus* kultur murni dari laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta dan isolat sampel pus pasien dari Rumah Sakit serta kontrol positif dan kontrol negatif.

H. Skema Penelitian



Skema Uji Difusi

Skema Uji Dilusi

