

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya. Waktu penelitian bulan Desember 2011 hingga Februari 2012.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan Penelitian

Bahan yang dipergunakan dalam penelitian ini antara lain isolat murni kultur koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Sains dan Teknologi UNAIR (*Staphylococcus epidermidis*), simplisia kulit buah dan biji manggis yang diambil dari perkebunan manggis (*Garcinia mangostana*) di Lumajang, media *Nutrient Agar* (NA), media *Muller-Hinton Agar* (MHA) dan *Muller-Hinton Broth* (MHB), *ethanol*, aquades, spirtus, Alkohol 70%.

3.2.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *autoclave*, *laminar air flow*, spektrofotometer, *waterbath* (Julaba), neraca analitik, *colony counter*, oven, inkubator, penangas, blender, vortex, *cuvet glass*, gelas ukur 10mL, pipet volum 10 mL, pipetor, mikro pipet 1000 μ L, tip pipet, cawan petri, botol kultur (100 mL), spatula, labu *enlemeyer* (100 mL; dan 500 mL), *beaker glass* (100 mL; dan 500mL), jangka sorong (LC-0,05mm), kamera, kertas filter, corong,

jarum ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, bunsen, batang pengaduk, sendok *stainless steel*, kapas, *aluminium foil*, *tissue*.

3.3. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap. Kulit buah dan biji manggis (*Garcinia mangostana*) diekstrak dengan pelarut etanol. Ekstrak kulit buah dan biji dengan beberapa konsentrasi yang berbeda (0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 500, dan 1.000 ppm,) yang dilakukan dengan tiga kali ulangan, kemudian diujikan pada *Staphylococcus epidermidis* untuk membandingkan efek antimikroba di antara keduanya. Efek antimikroba ekstrak kulit buah dan biji manggis (*Garcinia mangostana*) dapat diindikasikan dengan diameter daerah penghambatan pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* yang merupakan respon dari bahan aktif dalam ekstrak kulit buah dan biji manggis (difusi), serta dengan menentukan nilai konsentrasi ekstrak kulit buah dan biji manggis terkecil yang dapat menghambat *Staphylococcus epidermidis* (dilusi).

3.4. Variabel Penelitian

Penelitian ini menggunakan variabel bebas, terikat, dan terkendali.

1. Variabel bebas : konsentrasi ekstrak kulit buah dan biji manggis (ppm).

2. Variabel terikat : diameter daerah penghambatan (mm), nilai MIC dan MBC (ppm).
3. Variabel terkontrol : volume ekstrak (mL), diameter kertas cakram (mm), waktu inkubasi (24 jam untuk uji dilusi dan 48 jam untuk uji difusi), kepadatan mikroba uji (*Optical Density*) (10^8 CFU/mL).

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Penyiapan Bahan Penelitian

Untuk membuat suatu ekstrak, terlebih dahulu dilakukan pengumpulan bahan berupa kulit dan biji buah manggis. Agar homogen, warna dan usia kulit buah manggis diusahakan seragam dari kulit buah manggis yang telah matang. Tingkat kematangan buah manggis berdasarkan Indeks atau tahapan, yaitu warna kulit buah ungu kemerahan. Buah mulai masak dan siap dikonsumsi. Getah telah hilang dan isi buah mudah dilepaskan. Tahapan ekstraksi adalah sebagai berikut:

- (1) Mencuci kulit buah dan biji manggis hingga bersih, memotong menjadi potongan yang lebih kecil, kemudian mengering anginkan sampai kering. Untuk mempermudah saat penggerusan. Kemudian menggerus dengan alat penumbuk dan *blender* hingga halus dan ditimbang sebanyak 400 gram.
- (2) Merendam serbuk kulit buah manggis atau dimaserasi dengan pelarut *ethanol* sebanyak 800 mL dalam tabung kaca sampai hasil tumbukan terendam seluruhnya, diaduk-aduk.

- (3) Filtrat yang didapatkan ditampung kemudian menambahkan lagi pelarut *ethanol* hingga didapatkan filtrat yang tidak berwarna.
- (4) Menyaring hasil rendaman dengan kertas saring, hingga diperoleh filtrat-filtrat lalu dimasukkan ke dalam *rotary vacuum evaporator* sampai solven *ethanol* habis menguap. Bahan kental serta pekat yang tertinggal disebut ekstrak. Kemudian masing-masing ditimbang.

3.5.2. Peremajaan isolat murni bakteri

Kultur murni bakteri ditanam secara aseptik pada tabung reaksi yang berisi media NA (*Nutrient Agar*) padat miring dengan menggunakan jarum ose digoreskan (*streak*), kemudian diinkubasi pada inkubator selama 24 jam dengan suhu kamar.

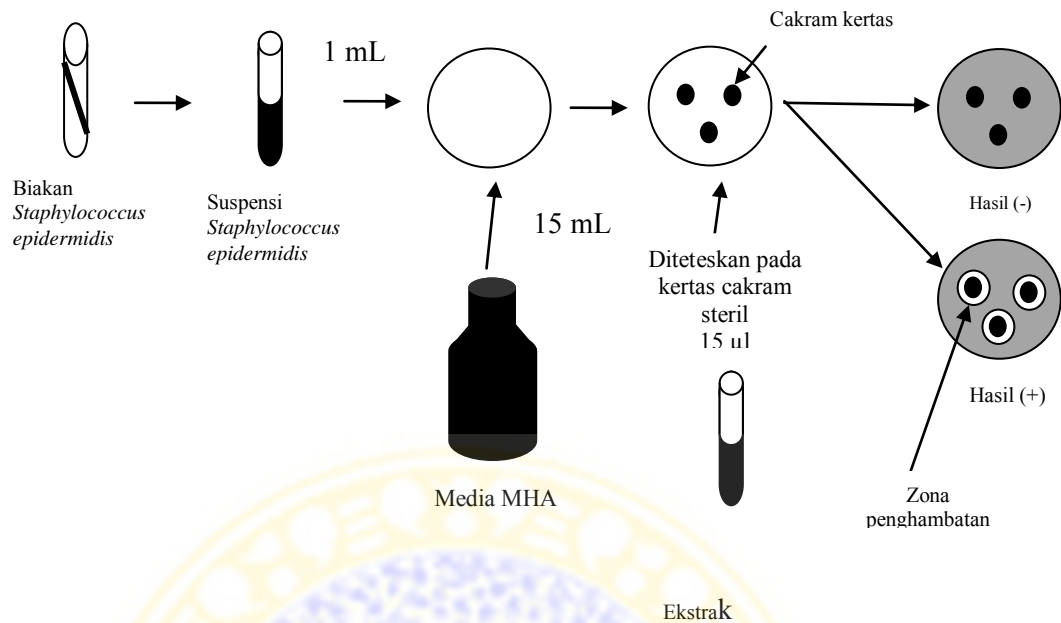
3.5.3. Uji Aktivitas Antimikroba

Untuk mengetahui aktivitas antimikroba dari masing-masing senyawa aktif ekstrak kulit buah dan biji manggis (*Garcinia mangostana*), digunakan metode cakram kertas dan metode pengenceran dalam tabung dengan cara sebagai berikut:

3.5.3.1. Metode Kertas Cakram (*disc diffusion method*)

Metode kertas cakram dilakukan dengan menyiapkan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) steril sebagai media pertumbuhan khusus untuk uji antimikroba. Suspensi mikroba uji dibuat dengan mengatur kekeruhan mikroba sampai didapat nilai rapat optis (*Optical Density*) setara dengan standar McFarland 0,5 (10^8 CFU/ml) Sebanyak 1 mL suspensi mikroba uji dimasukkan ke dalam cawan petri

steril, kemudian ditambahkan 15 mL media *Mueller Hinton Agar* (MHA) ke dalam cawan tersebut lalu dihomogenkan dengan cara menggerakkan cawan seperti angka delapan, setelah itu didiamkan sampai memadat. Selanjutnya sebanyak 3 lembar kertas cakram steril dengan diameter 6 mm dan ketebalan yang sama diletakkan di permukaan agar dengan jarak yang diupayakan sama satu sama lain membentuk segitiga. Sebelum diletakkan di permukaan agar, pada kertas tersebut diinjeksikan masing-masing sebanyak 15 μ l ekstrak kulit buah dan biji manggis dari masing-masing konsentrasi. Dimana ekstrak kulit buah dan biji manggis dilarutkan dalam pelarut *aquadest*. Injeksi ekstrak kulit dan biji buah manggis dilakukan pada beberapa cawan dengan konsentrasi yang berbeda, yaitu (0, 12,5, 25, 50, 100, 200, 500, dan 1.000 ppm.). Masing-masing mempunyai 3 ulangan. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Adanya aktivitas antimikroba ditunjukkan terbentuknya daerah penghambatan (halo) disekitar cakram uji (Bailey dan Scott, 2004). Diameter daerah hambatan diukur dengan menggunakan jangka sorong (LC-0,05mm). Jika menunjukkan hasil positif, dilakukan uji dengan metode pengenceran untuk mengetahui nilai MIC. Uji penghambatan dengan metode cakram kertas ditunjukkan pada gambar 3.1.

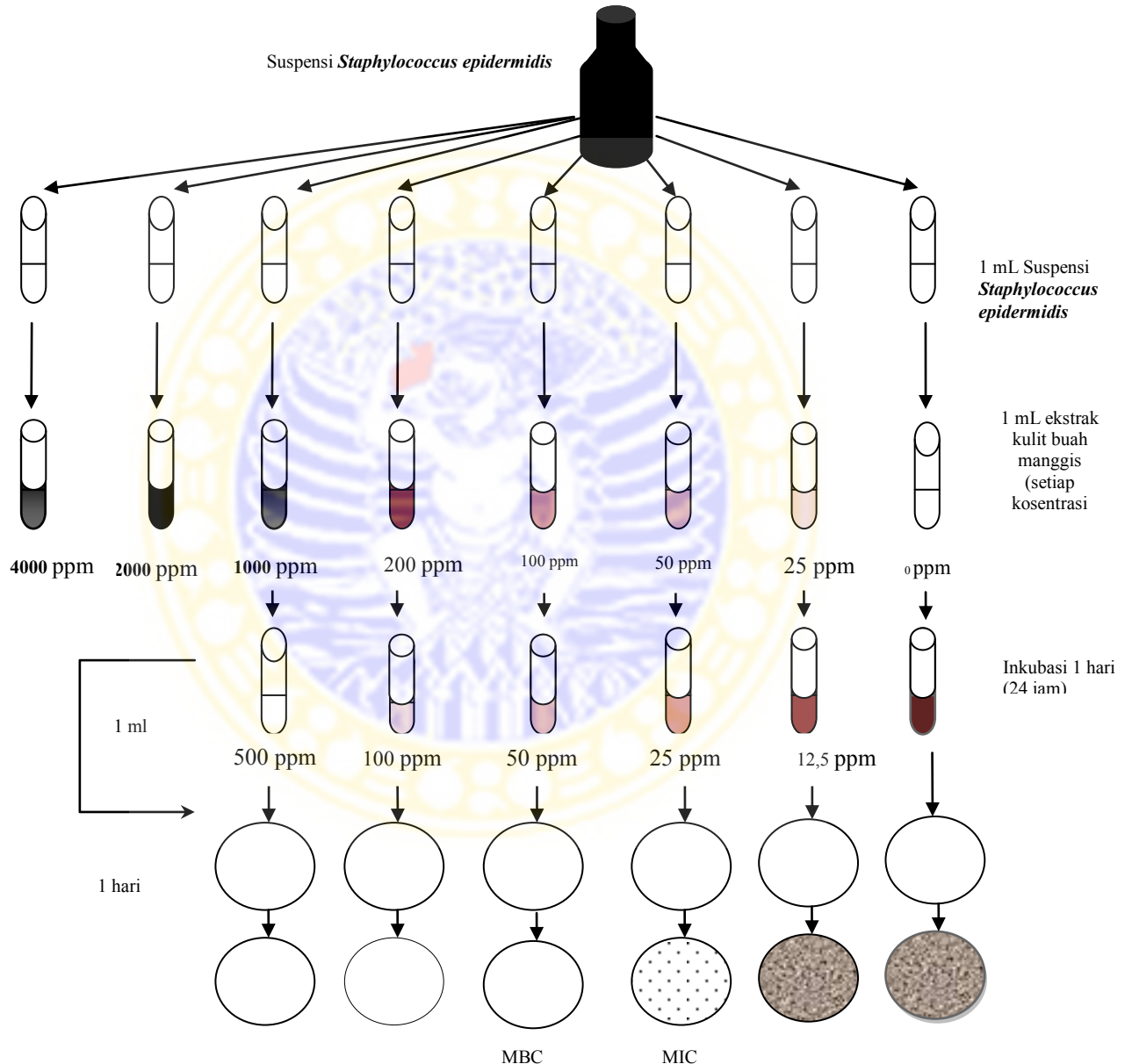


Gambar 3.1. Uji Penghambatan dengan metode kertas cakram (*difusi*)

3.5.3.2. Metode Pengenceran dalam Tabung (*tube dilution method*)

Metode pengenceran dalam tabung dibuat dengan membuat suspensi mikroba uji pada media *Mueller-Hinton Broth* (MHB) dengan mengatur kekeruhan mikroba sampai didapat nilai rapat optis (*Optical Density*) setara dengan standar McFarland 0,5 (10^8 CFU/ml). Masing-masing sebanyak 1 mL ekstrak kulit dan biji buah manggis dengan beberapa konsentrasi (12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, dan 200 ppm) dimasukkan dalam tabung reaksi yang sebelumnya telah diisi dengan 1 mL suspensi mikroba uji. Kultur dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam. Apabila terdapat aktivitas antimikroba, maka tidak ada kekeruhan (larutan jernih) dalam kultur tersebut. Dari seluruh kultur diambil sebanyak 1 mL untuk ditumbuhkan pada media MHA dan diinkubasi selama 24 jam. Ketika terjadi pertumbuhan pada media MHA, maka pada konsentrasi tersebut merupakan nilai MIC ekstrak kulit buah dan biji manggis dan apabila

tidak terjadi pertumbuhan pada media MHA tersebut, maka pada konsentrasi tersebut didapatkan nilai MBC ekstrak kulit buah manggis dan nilai MBC ekstrak biji manggis (Bailey dan Scott, 2004). Uji penghambatan dengan metode dilusi lebih jelasnya ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2. Uji penghambatan dengan metode dilusi.

3.6. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini adalah diameter daerah penghambatan ekstrak buah dan biji manggis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis*, nilai MIC, nilai MBC dan jumlah sel bakteri (CFU/mL). Data TPC, data nilai MIC dan MBC ekstrak kulit buah dan biji manggis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dianalisis secara deskriptif.

Data diameter daerah penghambatan ekstrak kulit buah dan biji manggis terhadap pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dianalisis secara statistik. Uji ANAVA dilakukan atas dasar asumsi bahwa data berdistribusi normal dan variansi data homogen. Jika $p < 0,05$ (ada beda nyata) pada uji ANAVA, maka analisis dilanjutkan uji *Duncan*. Jika $p < 0,05$ (tidak ada beda nyata) pada *Homogeneity of Variance* variansi data tidak homogen, maka analisis dilanjutkan dengan uji non-parametrik *K-Independent sampel* yaitu *Kruskal-Wallis*. Jika $p < 0,05$ (ada beda nyata) pada uji *Kruskal-Wallis* maka analisis dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney*.