

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan rancangan penelitian *post-test only control design*. Penelitian dilakukan dengan metode *in vitro* (dilusi). Pada penelitian ini dibuat ekstrak metanol biji asam jawa dalam beberapa konsentrasi yaitu: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%, 0,391%.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium mikrobiologi dan laboratorium penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Mei 2012.

C. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak metanol biji asam jawa yang telah diencerkan masing-masing dalam konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78% dan 0,391%.

2. Variable tergantung

Efek antibakteri ekstrak metanol biji asam jawa terhadap bakteri penginfeksi luka bakar yang diukur dengan menentukan KBM (Kadar Bunuh Minimum).

3. Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang diusahakan sama untuk setiap perlakuan meliputi, suhu inkubasi, waktu, pH dan media.

D. Definisi Operasional

1. Daya antibakteri

Daya antibakteri adalah kemampuan suatu zat untuk mencegah pertumbuhan atau aktivitas metabolisme mikroba.

2. KBM (Kadar bunuh minimum)

KBM (Kadar bunuh minimum) adalah konsentrasi ekstrak metanol biji asam jawa terendah yang mampu membunuh bakteri *Staphyococcus aureus*, ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri setelah dilakukan penggosokan 1 ose biakan bakteri dengan ekstrak metanol biji asam jawa pada konsentrasi tertentu.

3. Ekstrak metanol biji asam jawa

Ekstrak metanol biji asam jawa adalah hasil ekstraksi serbuk biji asam jawa dengan penyari metanol yang telah diencerkan masing-masing dalam konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,78%.

4. Biji asam jawa

Limbah biji asam jawa (*Tamarindus indica*) dari buah asam jawa yang diambil dari pohon asam jawa di daerah Lendang Nangka, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi Nusa Tenggara Barat.

5. Pertumbuhan *Staphylococcus*

Dapat diukur dengan adanya pertumbuhan koloni yang tumbuh pada media agar.

E. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain inkubator, lemari pendingin, neraca analitik, ose, otoklaf, oven, pemanas (Toyomi, HP115F1), pembakar spirtus, perforator, mikropipet, pipet volumetri, spatula, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium mikrobiologi dan laboratorium penelitian.

2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah biji asam jawa yang diekstraksi metanol dengan metode Microwave Assisted Extraction (MAE) serta bakteri yang digunakan yaitu bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*).

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan dengan tahapan sebagai berikut:

- 1. Penyiapan biji asam jawa, alat-alat serta bahan lain yang diperlukan.**
- 2. Membuat Ekstrak biji asam jawa**

Buah asam jawa yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari daerah Lendang Nangka, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi Nusa Tenggara Barat. Bagian buah yang digunakan adalah biji yang terdapat dibagian dalam buah yang berwarna hitam kecoklatan dan sangat keras. Biji asam jawa yang diperoleh kemudian dikeringkan di dalam oven dengan suhu 60°C sampai kering. Setelah itu, biji asam jawa ditumbuk sehingga bagian dalam biji yang berwarna putih terlepas dari bagian selubung biji yang berwarna hitam kecoklatan. Bagian biji yang berwarna putih ini diambil untuk digunakan dalam penelitian ini. Bagian biji asam jawa yang putih kemudian diblender sampai menjadi serbuk. Serbuk biji asam jawa diekstrak dengan penyari metanol dengan perbandingan 1:5 (1 kg serbuk memerlukan penyari metanol 5 liter) menggunakan teknik maserasi. Serbuk biji asam jawa yang telah direndam (maserasi) dengan larutan metanol selama 120 jam kemudian diaduk 2 kali dalam sehari yaitu pagi dan sore hari. Setelah 5 hari berlangsung, maserasi serbuk biji asam jawa disaring kemudian diambil filtratnya dan disimpan didalam wadah tertutup.

Sisa hasil penyaringan direndam kembali (re-maserasi) menggunakan larutan metanol dengan perbandingan 1:2,5 (1 kg serbuk memerlukan penyari metanol 2,5 liter) selama 48 jam yang juga diaduk 2 kali dalam sehari yaitu pagi dan sore hari. Setelah itu, hasil re-maserasi disaring kembali untuk diambil filtratnya disatukan kedalam wadah filtrat hasil maserasi.

Hasil filtrat maserasi dan remaserasi kemudian diuapkan dalam penangas air. Pengeringan bertujuan untuk menghilangkan atau menguapkan larutan metanol dari ekstrak yang dihasilkan. Proses pengeringan dilakukan dengan memanaskan ekstrak pada suhu 50-70 °C. Setelah proses pengeringan, ekstrak metanol biji asam jawa ditimbang dan disimpan dalam wadah tertutup, kemudian ekstrak disimpan dalam lemari es untuk penggunaan lebih lanjut. Pada akhir proses ini, akan didapatkan ekstrak murni berupa cairan kental dari biji asam jawa.

3. Penyiapan bakteri uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah dari bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus*. Bakteri tersebut didapatkan dari laboratorium mikrobiologi FKIK UMY. Bakteri ini kemudian dibuat suspensi dengan cara:

- a. Menginokulasikan 1 ose biakan ke dalam larutan NaCl fisiologis steril yang kemudian diinkubasi selama 2-4 jam sampai pada suspensi larutan standar Brown III yang diidentikkan dengan konsentrasi kuman sebesar 10^8 CFU/ml

- b. 1 ml biakan larutan dimasukkan kedalam tabung yang berisikan 9 ml Brain Heart Infusion sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml.
- c. 1 ml biakan larutan dimasukkan kedalam tabung yang berisikan 9 ml Brain Heart Infusion sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml.

4. Melakukan uji daya antibakteri ekstrak asam jawa

- a. Disediakan 27 tabung dengan 3 kali pengulangan, dimana setiap seri pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 9 tabung.
- b. Untuk setiap satu seri pengenceran disediakan 9 tabung, ke dalam tabung ke-2 sampai tabung ke-9 dimasukkan 1 ml aquades steril
- c. Selanjutnya dimasukkan 1 ml ekstrak metanol biji asam jawa murni ke dalam tabung ke-1 dan ke-2, sehingga tabung ke-1 berisi ekstrak metanol biji asam jawa murni konsentrasi 100% dan tabung ke-2 berisi ekstrak metanol biji asam jawa murni dengan konsentrasi 50%.
- d. Kemudian dilakukan pengenceran secara seri dari tabung ke-2 sampai tabung ke-9, dengan cara memindahkan 1 ml larutan asam jawa murni pada tabung ke-2 ke dalam tabung ke-3. Tabung ke-3 digojog sampai homogen, diambil 1 ml kemudian dipindahkan ke tabung nomor 4. Demikian seterusnya sampai tabung ke-8 diambil 1 ml, dipindahkan ke tabung ke-9. Tabung ke-9 berisi sisa pengenceran ekstrak metanol biji asam jawa murni sebagai kontrol sterilitas asam jawa murni (kontrol negatif).

- e. Ke dalam tabung ke-1 sampai tabung ke-9 selanjutnya diisi masing-masing 1 ml larutan Brain Heart Infusion cair yang berisi suspensi bakteri uji dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Volume akhir dari tabung ke-1 sampai tabung ke-9 sebesar 2 ml. Konsentrasi akhir dari asam jawa murni pada tiap tabung adalah ke-1 50%, ke-2 25%, ke-3 12,5%, ke-4 6,025%, ke-5 3,0125%, ke-6 1,5626%, ke-7 0,783%, ke-8 0,391%.
- f. Selanjutnya seluruh tabung dari nomor 1 sampai nomor 8 diinkubasikan pada suhu 37°C , selama 24 jam. Sebagai kontrol sterilitas bahan (kontrol negatif) dan kontrol pertumbuhan kuman, juga ikut diinkubasikan tabung ke-9 dan tabung yang hanya berisi suspensi bakteri uji dalam medium BHI (kontrol positif).
- g. Suspensi pada tabung-tabung selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose pada medium agar nutrisi.
- h. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam.
- i. Kadar bunuh minimal akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan kuman pada medium agar nutrisi dengan konsentrasi terendah (Suryani, 2005).

5. Melakukan pengamatan dan menyimpulkan hasil penelitian

Pada konsentrasi minimal berapa persen ekstrak biji asam jawa dapat menghambat atau membunuh bakteri uji. Kemudian menyimpulkan hasil penelitian daya antibakteri ekstrak asam jawa bakteri uji, *Staphylococcus aureus* dengan mengukur KBM.

G. Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis deskriptif dengan cara mengukur KBM ekstrak metanol biji asam jawa (*Tamarindus indica*) terhadap pertumbuhan bakteri uji *staphylococcus aureus*.