

## BAB III

### METODE PENELITIAN

#### A. Jenis Penelitian

Penelitian termasuk penelitian laboratorium yang menguji daya antibakteri ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) terhadap bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925 secara *in vitro*.

#### B. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan juni- setember 2011. Penelitian dilakukan di Laboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dan pembuatan ekstrak dilakukan di LPPT universitas Gadjah Mada.

#### C. Subyek Penelitian

##### 1. Bahan Ekstrak

Kulit batang asam jawa diperoleh dari kebun warga di desa kalongan kecamatan tasikmadu, kabupaten karanganyar, Jawa tengah. ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica*

L) dibuat di LPPT Universitas Gadjah Mada

Bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925 yang digunakan sebagai subjek penelitian diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional**

##### **1. Identifikasi Variabel Penelitian**

###### **a. Variabel Pengaruh**

Ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*)

###### **b. Variabel Terpengaruh**

Kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925.

###### **c. Variabel Terkendali**

1. ekstrak Etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*)

2. *Strain* Bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925

3. suhu inkubasi 37°C

4. waktu inkubasi 18-24 jam

5. konsentrasi suspensi kuman  $10^6$  CFU/ml

6. Etanol sebagai penyari

7. Jenis media kultur bakteri TSA (*Tryptone Soya Agar*)

8. Jenis medium pembibakan adalah medium DHH

9. Suhu Pengeraman

10. Lama Pengeraman 48 jam

## 2. Definisi Operasional

a. Ekstra etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*)

Kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) dicuci hingga bersih lalu dipotong- potong dan dikeringkan secara konstan dalam suhu kamar 32-35 °C selama 5 hari berturut- turut. Setelah kering lalu diekstrak menggunakan metode maserasi.

b. KHM (Kadar Hambat Minimal)

kadar terkecil suatu zat yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu.

c. KBM (Kadar Bunuh Minimal)

kadar terkecil suatu zat yang masih dapat membunuh mikroba tertentu.

d. Bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC

25925

bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925 adalah bakteri normal tubuh yang telah mengalami mutasi sehingga mampu membentuk pertahanan sehingga kebal terhadap

## **E. Alat dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat penelitian**

- a. Alat untuk ekstraksi
- b. ose steril yang digunakan untuk mengambil koloni kuman
- c. Kapas lidi steril untuk mengusap bakteri
- d. Cawan petri yang berdiameter 10 cm
- e. Rak tabung reaksi
- f. Lampu spirtus untuk sterilisasi
- g. Pipet ukur untuk pengenceran tabung reaksi
- h. Inkubator
- i. Pinset

### **2. Bahan penelitian**

- a. Ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*)
- b. Bakteri multiresisten antibiotik *Staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925 konsentrasi  $10^6$  CFU/ml
- c. Medium BHI (*Brain Heart Infusion*)
- d. Medium TSA
- e. aquades steril
- d. NaCl fisiologis

## F. Desain Penelitian

### 1. Pembuatan ekstrak kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*)

Kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) dicuci hingga bersih lalu dipotong- potong dan dikeringkan secara konstan dalam suhu kamar 32-35 °C selama 5 hari berturut- turut. Setelah kering kulit batang asam jawa dibuat serbuk dengan digiling menggunakan blender atau di tumbuk dengan mortar. Setelah mendapatkan serbuk, kemudian dimaserasi selama 24 jam menggunakan etanol. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan *corong Buchner*. Filtrat I diuapkan menggunakan *water bath*, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali selama 24 jam menggunakan pelarut yang sama. Filtrat disaring dan didapatkan filtrat ke II. Filtrat I dan II diampur lalu diuapkan pada suhu 60°-70° C hingga diperoleh ekstrak kental 100%.

### 2. Pembuatan suspensi kuman

Koloni bakteri multiresisten antibiotik *staphylococcus aureus* Isolat ATCC 25925 yang telah disubkultur selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang telah tumbuh dipilih dengan menggunakan ose steril, setelah itu diinokulasikan pada media cair BHI (*Brain Heart infusa*) lalu diinkubasikan selama 2 jam dengan suhu 37°C hingga bakteri nampak pertumbuhannya. Kemudian bakteri disuspensikan dalam larutan NaCl fisiologis steril kekeruhannya sama dengan suspensi

sebesar  $10^8$  CFU/ml. Kuman lalu diencerkan lagi hingga mencapai konsentrasi  $10^6$  CFU/ml.

### G. Cara Kerja

Penentuan daya antibakteri ekstrak kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*).

1. Disediakan 36 tabung volume 5 ml steril dengan 3 kali pengulangan, dimana dalam setiap pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 10 tabung dan 2 tabung (kontrol negatif dan control positif). Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal ekstrak kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*).
2. Untuk setiap pengenceran disediakan 10 tabung, ke dalam tabung ke-2 sampai tabung ke 10 dan tabung ke-12 dimasukkan 1 ml aquades steril.
3. Selanjutnya dimasukkan 1 ml ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) kedalam tabung ke-1 dan ke-2, sehingga tabung ke-1 berisi ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) konsentrasi 100%, dan tabung ke-2 berisi ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) dengan konsentrasi 50%.
4. Kemudian dilakukan pengenceran secara seri dari tabung ke-2 sampai dengan tabung ke-10, dengan cara memindahkan 1 ml larutan ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*) ke dalam tabung ke-3, dan seterusnya.

*Indica L.*) pada tabung ke-2 kedalam tabung ke-3. tabung ke-3 digojog sampai homogen, diambil 1 ml kemudian dipindahkan ke tabung nomor 4. demikian seterusnya sampai tabung ke-9 diambil 1 ml, dipindahkan ke tabung ke-10. tabung ke-11 berisi sisa pengenceran ekstrak etanol kulit batang asam jawa (*Tamarindus Indica L.*).

5. Ke dalam tabung ke-1 sampai tabung ke-10 dan tabung ke-12 (kontrol positif) 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-10 sebesar 2ml.
6. Selanjutnya seluruh tabung diinkubasikan pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ , selama 24 jam.
7. Diamati ada tidaknya pertumbuhan kuman dengan cara membandingkan dengan kontrol positif.
8. Kadar hambat minimal diperoleh dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kuman dengan konsentrasi terendah.
9. Tabung-tabung subkultur yang tidak memperlihatkan pertumbuhan kuman selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose pada medium agar TSA.

10. Kemudian diinkubasi pada  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

11. Kadar bunuh minimal akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan kuman pada agar medium TSA dengan konsentrasi terendah

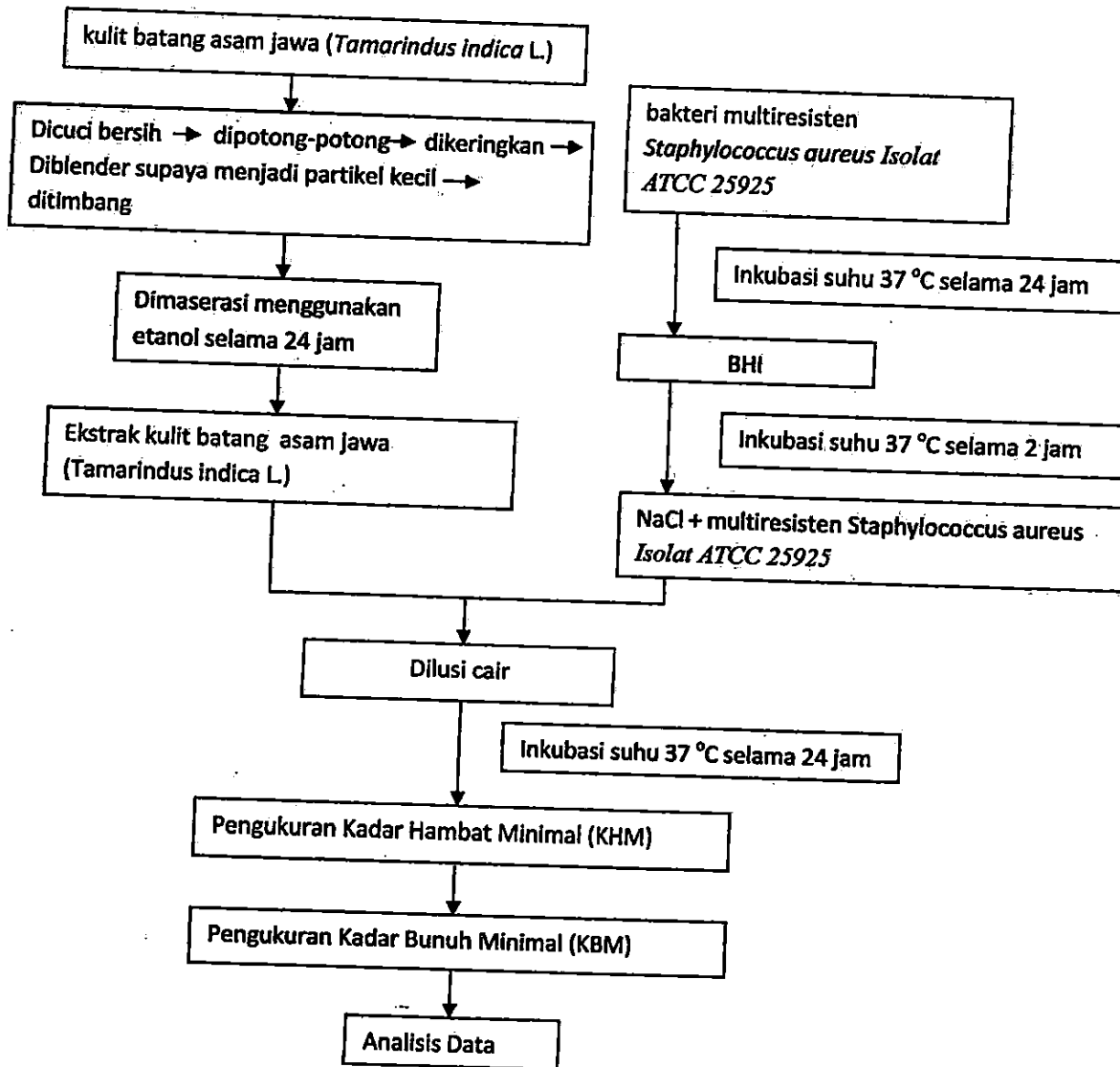
#### **H. Analisis Data**

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis deskriptif dan bersifat kuantitatif dengan cara mengukur KHM (Kadar Hambat Minimal)

dan KDM (Kadar Bunuh Minimal) sebagai standar untuk hasil hitung agar ini



### I. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian