

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian daya antibakteri ekstrak metanol biji asam jawa terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ini merupakan penelitian eksperimental murni yang dilakukan dengan metode dilusi padat. Pada penelitian ini dibuat ekstrak metanol biji asam jawa dalam beberapa konsentrasi yaitu: 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,563%, 0,781%, 0,391%.

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* strain lokal yang masih sensitif terhadap terapi biasa (standar).

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

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

D. Varibel Penelitian

1. Variabel bebas

Ekstrak metanol biji asam jawa dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,563%, 0,781%, 0,391%.

2. Variable tergantung

Kadar bunuh minimum (KBM) ekstrak metanol biji asam jawa terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

E. 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 yang dibiakkan pada media Agar atau kadar agen antibakteri terendah yang tidak menunjukkan pertumbuhan atau ada penurunan 99,9% dari inokulum asal sub kultur setelah dilakukan penggoresan 1 ml biakan bakteri dengan ekstrak metanol biji asam jawa konsentrasi tertentu dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3. Ekstrak metanol biji asam jawa

Ekstrak metanol biji asam jawa adalah hasil ekstraksi serbuk biji asam jawa dengan penyari metanol. Biji asam jawa didapatkan dari

daerah Lendang Nangka, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi Nusa Tenggara Barat.

4. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan penarikan zat pokok yang diinginkan dari bahan mentah obat dengan menggunakan pelarut yang dipilih dimana zat yang akan diinginkan larut. Pada penelitian ini zat pelarut yang dipakai adalah metanol.

5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif strain lokal yang masih sensitif terhadap terapi standar.

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain inkubator, jangka sorong, 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 yang digunakan adalah biji asam jawa yang diekstraksi metanol dengan metode *Microwave Assisted Extraction (MAE)* serta bakteri yang digunakan yaitu bakteri gram negatif (*Pseudomonas aeruginosa*).

G. Jalannya Penelitian

Proses pembuatan ekstrak metanol biji asam jawa dan jalannya penelitian setelah pembuatan ekstrak metanol biji asam jawa dilaksanakan dengan tahapan sebagai berikut:

1. Pembuatan ekstrak metanol biji asam jawa

a. Maserasi Bubuk 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. Tumbukan biji asam jawa kemudian diblender sampai menjadi serbuk.

Perbandingan jumlah metanol dan bubuk biji asam jawa dalam proses maserasi yaitu 5:1. Proses maserasi berlangsung selama 5 hari dengan diaduk secara teratur 2 kali sehari untuk mencegah terjadinya penggumpalan bubuk biji asam jawa dalam larutan metanol. Wadah yang digunakan juga harus tertutup sehingga larutan

metanol tidak menguap. Pada hari kelima, hasil maserasi di saring menggunakan kertas saring dan ekstrak yang dihasilkan ditampung dalam wadah tertutup.

b. Re-maserasi Bubuk Biji Asam Jawa

Sisa bubuk biji asam jawa dari proses penyaringan kemudian ditimbang lagi untuk proses re-maserasi. Perbandingan larutan metanol dan sisa bubuk biji asam jawa pada proses re-maserasi yaitu 2,5:1. Proses re-maserasi berlangsung selama 3 hari dengan diaduk secara teratur 2 kali sehari. Hasil re-maserasi pada hari ketiga kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ekstrak yang dihasilkan disimpan dalam wadah tertutup.

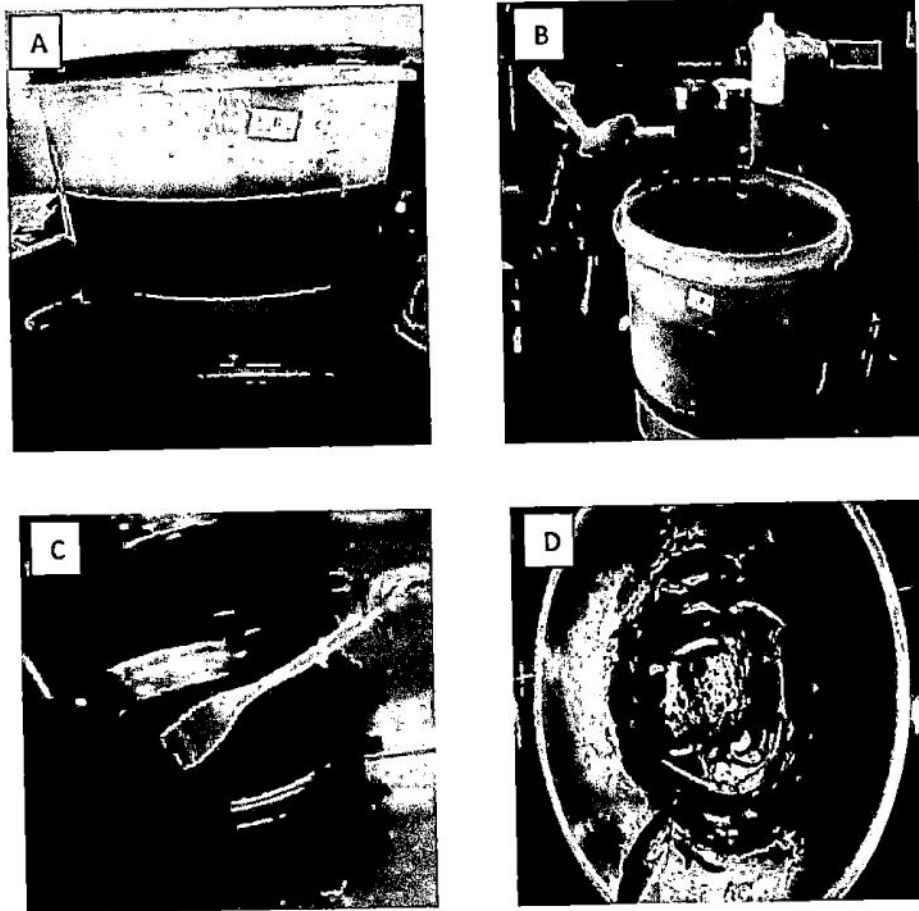
c. Proses Pengeringan Ekstrak

Ekstrak yang dihasilkan dari proses maserasi dan re-maserasi masih mengandung larutan metanol. Pengeringan bertujuan untuk menghilangkan larutan metanol dari ekstrak yang dihasilkan tersebut. 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.

2. Penyiapan bakteri uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah dari bakteri gram negatif yaitu *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri tersebut didapatkan dari laboratorium mikrobiologi fakultas kedokteran UGM. Bakteri uji yang digunakan merupakan bakteri yang masih sensitif

terhadap terapi standar. Bakteri ini kemudian dibuat suspensi dengan cara menginokulasikan 1 ose biakan murni ke dalam 5 ml Nutrient Broth (NB), kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam di dalam inkubator.



Gambar 3. Proses pembuatan ekstrak metanol biji asam jawa

- A. Maserasi biji asam jawa
- B. Penyaringan biji asam jawa
- C. Pemanasan biji asam jawa
- D. Ekstrak metanol biji asam jawa

(Dokumentasi pribadi, 2012)

3. Melakukan uji efek 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 digojok 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 6,25%, ke-5 3,125%, ke-6 1,563%, ke-7 0,781%, 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).

4. Melakukan pengamatan dan menyimpulkan hasil penelitian

Hasil pengamatan dituangkan dalam bentuk tabel. Tabel tersebut menunjukkan gambaran pada konsentrasi minimal berapa persen ekstrak metanol biji asam jawa dapat membunuh bakteri uji. Setelah itu menyimpulkan hasil penelitian terhadap efek antibakteri ekstrak metanol biji asam jawa.

H. Analisis Data

Analisa data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis deskriptif dengan cara mengukur kadar bunuh minimum (KBM) ekstrak metanol biji asam jawa terhadap pertumbuhan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*.