

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk penelitian laboratorium yang bersifat eksperimental yang dilakukan secara observasional *in vitro*. Jenis dari penelitian ini adalah *True Eksperimental Design*. Adapun alasan menggunakan jenis rancangan ini karena pada eksperimen jenis ini semua variabel penelitian dapat dikendalikan, sehingga efek variabel luar (variabel pengacau) tidak akan berpengaruh (Nursalam, 2003).

B. Tempat dan Waktu

Penelitian *in vitro* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Daya antibakteri diuji dengan menggunakan metode dilusi cair. Sebagai bahan uji ekstrak etanol kayu siwak (*Salvadora persica*) dengan metode sokletasi dibuat dalam beberapa konsentrasi. Dalam pengujian diperlukan 2 macam kontrol yaitu kontrol positif yang berisi suspensi bakteri pada media BHI-DS dan kontrol negatif berisi sisa ekstrak yang ditambah BHI-DS. *Staphylococcus aureus* isolat 248 yang telah diuji resistensinya digunakan sebagai bioindikator daya antibakteri terhadap bahan uji.

Penelitian ini dilaksanakan secara eksperimen selama sebulan di laboratorium. Pada dua minggu pertama, penelitian dilakukan di Laboratorium

ekstrak etanol kayu siwak (*Salvadora persica*) dengan metode sokletasi. Kemudian, minggu ketiga penelitian melakukan pengujian dan pengamatan *in vitro* terhadap pertumbuhan koloni bakteri *staphylococcus aureus* isolat

C. Subyek Penelitian

Kayu Siwak yang digunakan diperoleh dari toko peralatan haji di Asrama Haji Pondok Gede. Kayu siwak yang dipilih berasal dari Arab.

Staphylococcus aureus resisten multiantibiotik dipilih sebagai bakteri uji karena kasus resistensinya pada akhir-akhir ini meningkat seiring dengan ditemukannya antibiotika baru, sering menimbulkan peradangan pada rongga mulut dan mudah didapatkan.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel

a). Variabel Pengaruh

- 1). Perlakuan coba : Ekstrak etanol kayu siwak dengan konsentrasi perbandingan antara berat dan volume (b/v) mulai dari 25 % b/v, 12,5 % b/v, 6,25 % b/v, 3,12 % b/v, 1,56 % b/v, 0,78 % b/v, 0,38 % b/v, 0,19 % b/v dan 0,09 % b/v.
- 2). Perlakuan kontrol : daya antibakteri ekstrak etanol kayu siwak dikontrol dengan sisa ekstrak yang ditambah *Brain Heart Infusion* (BHI) dan suspensi bakteri pada media BHI-

b). Variabel Terpengaruh

Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media agar darah, yang ditunjukkan dengan ada tidaknya koloni bakteri pada media.

c). Variabel Terkendali

- 1). Bakteri *Staphylococcus aureus* isolat 248 yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UGM sudah diuji resisten terhadap 14 jenis antibiotika.
- 2). Suhu inkubasi, merupakan suhu optimum yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu 37⁰ C.
- 3). Waktu inkubasi, merupakan waktu yang dibutuhkan untuk mencapai pertumbuhan eksponensial. Untuk bakteri *Staphylococcus aureus* adalah selama 4-6 jam. Larutan kuman yang digunakan adalah larutan standar dengan konsentrasi 10⁸ CFU/ml, dimana yang dimaksud dengan CFU adalah *Coloni Forming Unit*, sedangkan CFU/ml adalah satuan yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi atau kekeruhan suatu larutan.
- 4). Media pembiakan, yaitu menggunakan *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai media pembiakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Dengan menggunakan media BHI, maka bakteri tersebut akan tumbuh

- 5). Kontaminasi dari bakteri lain, dikendalikan dengan cara menjaga sterilitas media dan tindakan (pengambilan media, penuangan, dan lain-lain), serta alat-alat yang digunakan dalam keadaan steril dan dikerjakan dengan cara aseptik termasuk operatornya.
- 6). Pengamatan, dikendalikan dengan cara melakukan tiga kali pengulangan untuk menjaga realibilitas.

2. Definisi Operasional Penelitian

a). Efektifitas

Adalah kemampuan intervensi untuk menghasilkan efek menguntungkan yang dikehendaki dalam penggunaan yang sebenarnya (Dorland, 1998).

b). Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan, dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang ditetapkan (Indah *et al.*, 2004).

c). Metode Sokletasi

Metode ekstraksi dengan menggunakan alat soklet. Metode ini

mempunyai kelarutan dalam pelarut dengan zat kotor yang tidak diperlukan yang tidak mempunyai kelarutan dalam pelarut. Jika campuran zat yang diinginkan mempunyai kelarutan yang tinggi terhadap pelarut yang digunakan, filtrasi sederhana bisa digunakan untuk memisahkan zat dengan substansi yang tidak larut (Wikipedia, 2007).

d). Siwak (*Salvadora persica*)

Siwak atau *Miswak*, merupakan bagian dari batang, akar atau ranting tumbuhan *Salvadora persica* yang kebanyakan tumbuh di daerah Timur Tengah, Asia dan Afrika. Siwak berbentuk batang yang diambil dari akar dan ranting tanaman arak yang berdiameter mulai dari 0,1 cm sampai 5 cm. Pohon arak adalah pohon yang kecil seperti belukar dengan batang yang bercabang-cabang, berdiameter lebih dari 1 kaki. Jika kulitnya dikelupas berwarna agak keputihan dan memiliki banyak juntaian serat. Akarnya berwarna coklat dan bagian dalamnya berwarna putih. Aromanya seperti seledri dan rasanya agak pedas (Al-Khateeb, 1991).

e). Pertumbuhan

Adalah pertambahan yang teratur dari semua komponen suatu organisme, multiplikasi sel merupakan konsekuensi dari adanya pertumbuhan. Pada mikroorganisme bersel satu, multiplikasi menghasilkan pertambahan jumlah organisme yang membentuk suatu populasi atau suatu biakan koloni (Jawetz *et al.*, 1995)

f). *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah anggota dari famili *Staphylococcaceae*, yang merupakan bakteri gram-positif berbentuk bulat, biasanya tersusun dalam rangkaian tidak beraturan seperti anggur (Jawetz *et al.*, 1995).

g). Zat antibakteri

Zat antibakterial adalah zat yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme melalui penghambatan pertumbuhan bakteri (Gan *et al.*, 1995).

h). Resistensi bakteri

Resistensi bakteri ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel bakteri oleh zat antibakteri (Gan *et al.*, 1995).

i). Resistensi bakteri multiantibiotik

Resistensi bakteri multiantibiotik ialah suatu sifat tidak terganggunya kehidupan sel bakteri oleh lebih dari satu macam zat antibakteri.

E. Bahan dan Alat Penelitian

a). Bahan Penelitian

1. Ekstrak etanol kayu siwak

2. Bakteri *Staphylococcus aureus* isolat 248 yang resisten multiantibiotik
3. Media *Brain Heart Infusion* (BHI) dan BHI-DS (*Double Strenght*)
4. Aquades steril
5. NaCl
6. Media agar darah sebagai media pertumbuhan bakteri
7. Larutan standar *MacFarland* sebagai pembanding

b). Alat Penelitian

1. Seperangkat alat ekstraksi kayu siwak
2. Tabung reaksi
3. Pipet dan mikropipet
4. Ose steril untuk mengambil kuman
5. Lampu spiritus
6. Cawan petri, sebagai tempat media agar darah
7. Inkubator, dengan suhu 37⁰ C untuk menginkubasi bakteri

F. Cara Kerja

1. Tahap Persiapan

a). Ekstraksi kayu siwak

Pembuatan bahan ekstrak kayu siwak dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

serbuk kayu siwak, lalu masukkan ke dalam alat penyari *Soxhlet* yang telah dipasang kertas saring, kemudian tambahkan etanol 96% paling sedikit dua kali sirkulasi. Lalu ditambahkan batu didih. Penyarian dilakukan selama 2 jam dengan kecepatan 6-8 sirkulasi per jam. Setelah dingin, dipisahkan sari dari bagian yang tidak terlarut dengan penyari melalui kertas saring. Sisihkan sari jernih yang didapat dalam flakon dan tutup. Sisanya diuapkan diatas penangas air konsistensi kental. Setelah dingin, tambahkan 10 ml KOH etanolik 10 % sambil diaduk-aduk sehingga timbul endapan. Setelah mengendap, pisahkan sari dari bagian yang tidak larut melalui kapas/kertas saring. Sari jernih yang didapat didiamkan dalam almari es.

b). Sterilisasi alat dan Bahan

Cawan Petri, Tabung Reaksi, Media Agar Darah, Media BHI, Media BHI-DS dan seluruh alat dan bahan (kecuali ekstrak serbuk kayu siwak) yang akan digunakan disterilisasi di dalam autoclave selama 30 menit dengan mengatur tekanan sebesar 15 dyne/cm^3 (1 atm) dan suhu sebesar 121° C setelah sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan dan dibungkus dengan kertas.

c). Pembuatan stok suspensi bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan untuk perbanyak stok, dengan

..... dalam 2 ml *Brain Heart*

Infusion (BHI), kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 4-6 jam di dalam inkubator.

2. Jalannya Penelitian

a). Pengenceran ekstrak

Ekstrak diencerkan melalui perbandingan 1 gr ekstrak dengan aquades steril 1 ml (berat/volume). Sehingga dihasilkan konsentrasi awal sebesar 50 %.

b). Cara menentukan KHM dan KBM

- 2.1. Siapkan 11 tabung dan diberi nomor 1-11.
- 2.2. Tabung 1 merupakan hasil pengenceran ekstrak dengan konsentrasi awal 50 %.
- 2.3. Aquades steril sebanyak 1 ml dimasukkan, masing-masing pada tabung 2-9.
- 2.4. Dari tabung 1 diambil 1 ml dan masukkan ke dalam tabung 2, campur hingga homogen. Dari tabung 2 diambil 1 ml untuk dimasukkan ke tabung 3 dan seterusnya sampai tabung 9 (konsentrasi terkecil).
- 2.5. Diambil 1 ml dari tabung 9 lalu dimasukkan ke dalam tabung 10 dan digunakan sebagai kontrol negatif.
- 2.6. 1 ml suspensi bakteri 10⁶ CFU/ml dimasukkan ke dalam tabung 1-9

- 2.7. Semua tabung diinkubasi pada 37⁰ C selama 18-24 jam.
- 2.8. Dengan menggunakan ose steril, setiap tabung diambil satu ose dan digoreskan pada agar darah. Inkubasi pada 37⁰ C selama 18-24 jam.
- 2.9. Nilai KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan seluruh tabung. Nilai KBM ditentukan dengan melihat tabung terakhir (konsentrasi terkecil) yang masih mampu membunuh bakteri, ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni *S. aureus* isolat 248 pada agar darah.
- 2.10. Percobaan dilakukan dengan pengulangan sebanyak tiga kali untuk memperoleh hasil yang lebih konsisten.

3. Tahap Pengujian

a). Validitas Pengukuran

Validitas pengaruh bahan uji ditentukan dengan menilai KBM ekstrak etanol kayu siwak dengan metode sokletasi terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* isolat 248. Pembacaan KBM didasarkan pada konsentrasi terkecil bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* isolat 248 pada media agar darah.

b). Realibilitas Pengukuran

Pengukuran KBM hasil penelitian dibandingkan dengan kontrol

kondisi, waktu, inkubasi, perlakuan bakteri dan konsentrasi bahan uji yang sama. Dikatakan mempunyai daya antibakteri bila pada media agar darah tidak ada pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* isolat 248.

G. Analisis Data