

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental murni laboratorium yang dilakukan secara *in vitro*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

- a. Penelitian ini dimulai dengan melakukan identifikasi tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- b. Pembuatan ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) di Laboratorium Pengujian LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- c. Pembuatan kultur bakteri dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- d. Pembuatan obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- e. Uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

2. Waktu penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Agustus 2014 – September 2014.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Bahan Uji

Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

2. Bakteri Uji

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Pengaruh

Konsentrasi ekstrak daun ciplukan dalam bentuk sediaan obat kumur dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

2. Variabel Terpengaruh

- a. Kadar hambat minimal (KHM) *Streptococcus mutans*
- b. Kadar bunuh minimal (KBM) *Streptococcus mutans*

3. Variabel Terkendali

- a. Suhu inkubator 37° C
- b. Lama inkubasi 24 jam
- c. Konsentrasi larutan *Streptococcus mutans* (10^8 CFU/ml)
- d. Volume obat kumur (50 ml)
- e. Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang digunakan berasal dari tempat yang sama.

4. Variabel Tak Terkendali
 - a. Kontaminasi organisme lain.
 - b. Zat-zat aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.).

E. Definisi Operasional

1. Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah daun yang berwarna hijau, segar tanpa ada hama yang didapatkan dari daerah Desa Tlogo, Kelurahan Ambarketawang, Kecamatan Gamping, Kabupaten Sleman, Yogyakarta.
2. Ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah sari pekat dari daun ciplukan untuk mendapatkan zat aktif yang terkandung dalam daun tersebut, sehingga menjadi bentuk sediaan kering, kental ataupun cair, dengan menggunakan metode maserasi.
3. Obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah sediaan obat kumur yang dibuat dari campuran ekstrak etanol daun ciplukan, bahan perasa, pemanis, pengawet, dan aquades hingga volume 50 ml, yang kemudian dilakukan uji antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.
4. Pertumbuhan bakteri adalah pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* yang membentuk koloni-koloni setelah bakteri tersebut diinkubasi selama 18 - 24 jam dengan suhu 37⁰ C.
5. Daya antibakteri ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah ekstrak daun ciplukan yang memiliki daya hambat atau daya bunuh

terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang ditentukan dengan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM).

6. Kadar hambat minimal (KHM) adalah konsentrasi minimal dari ekstrak etanol daun ciplukan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.
7. Kadar bunuh minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal dari ekstrak etanol daun ciplukan yang dapat membunuh bakteri *Streptococcus mutans*.
8. Bakteri *Streptococcus mutans* merupakan kelompok *Streptococcus viridans* yang memiliki sifat α -hemolitik. Keberadaannya berperan penting untuk kesehatan membran mukosa tetapi juga memiliki peran dalam terbentuknya karies gigi (Jawetz *et al.*, 2002).

F. Alat dan Bahan Penelitian

1. Bahan penelitian:
 - a. Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)
 - b. Bakteri *Streptococcus mutans*
 - c. Larutan NaCl
 - d. Etanol 70%
 - e. Aquades
 - f. *Chlorhexidine gluconate* 0,2%
 - g. *Asam Benzoat* (pengawet)
 - h. *Sodium Saccharin* (pemanis)
 - i. *Peppermint Oil* (perasa)
 - j. *Media Brain Heart Infusion* (BHI)

- k. Media *Trypticase Soy Agar* (TSA)
 - l. Kapas
 - m. *Handscone*
 - n. Masker
2. Alat penelitian:
- a. Ose steril
 - b. Lampu spritus
 - c. Corong *bunchner*
 - d. Kertas saring
 - e. *Waterbath*
 - f. *Incubator*
 - g. Cawan petri
 - h. Blender
 - i. *Spreader*
 - j. Almari pengering
 - k. Rak tabung
 - l. Tabung reaksi
 - m. Pipet tetes
 - n. *Laminar Flow*
 - o. Timbangan digital
 - p. *Rotary vaccum evaporator*
 - q. Gelas ukur 100 ml
 - r. Labu takar 50 ml

s. Erlenmeyer 100 ml

G. Jalannya Penelitian

1. Persiapan

Penyiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat yang akan digunakan.

2. Identifikasi tanaman

Tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) diambil beberapa sampel untuk dilakukan identifikasi taksonomi tanaman yang akan dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3. Pembuatan ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)

Tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang sudah dilakukan identifikasi taksonomi, sebanyak 1000 gram diambil daunnya yang masih segar dicuci dengan air mengalir sampai bersih lalu dipotong menjadi beberapa bagian. Kemudian daun ciplukan dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 50⁰ C selama 5 jam. Daun ciplukan dibuat serbuk dengan menggunakan blender. Setelah menjadi serbuk, dengan menggunakan etanol 70% sebanyak 1 liter lalu dimaserasi selama 24 jam. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan corong *buncher*. Filtrat I diuapkan menggunakan *waterbath*, sedangkan ampasnya dimaserasi kembali selama 24 jam menggunakan pelarut yang sama. Filtrat disaring dan didapatkan filtrat ke II. Filtrat I dan II dicampur kemudian diuapkan pada suhu 60 – 70⁰C sampai diperoleh ekstrak kental dengan konsentrasi 100%. Kemudian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L) diencerkan

sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% dengan menggunakan etanol 70%.

4. Pembuatan Obat Kumur

Daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) yang telah diekstrak di laboratorium dibuat dalam bentuk formula obat kumur. Obat kumur dalam bentuk 5 formula dengan kandungan obat kumur sesuai pada Tabel 1. sebagai berikut:

Tabel 1. Komposisi Obat Kumur Ekstrak Etanol Daun Ciplukan
(*Physalis angulata* L.)

Bahan	Formula	Formula	Formula	Formula	Formula
	I	II	III	IV	V
	5%	10%	15%	20%	25%
Ekstrak Etanol	2.5	5	7.5	10	12.5
<i>Peppermint oil</i> (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Na-Sakarin (gr)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Asam Benzoat (gr)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
Aquades ad (ml)	50	50	50	50	50
Volume Akhir (ml)	50	50	50	50	50

a. Formula 1

Pada tabung Erlenmeyer dilakukan pelarutan Na-Sakarin 0,3 gram dan Asam Benzoat 0,025 gram dengan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian pada labu takar 50 ml campurkan ekstrak etanol daun ciplukan 5% sebanyak 2,5 ml + *Peppermint oil* 0,5 ml + larutan Na-sakarin dan Asam benzoat + aquades steril hingga volume 50 ml.

b. Formula 2

Pada tabung Erlenmeyer dilakukan pelarutan Na-Sakarin 0,3 gram dan Asam Benzoat 0,025 gram dengan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian pada labu takar 50 ml campurkan ekstrak etanol daun ciplukan 10% sebanyak 5 ml + *Peppermint oil* 0,5 ml + larutan Na-sakarin dan Asam benzoat + aquades steril hingga volume 50 ml.

c. Formula 3

Pada tabung Erlenmeyer dilakukan pelarutan Na-Sakarin 0,3 gram dan Asam Benzoat 0,025 gram dengan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian pada labu takar 50 ml campurkan ekstrak etanol daun ciplukan 15% sebanyak 7,5 ml + *Peppermint oil* 0,5 ml + larutan Na-sakarin dan Asam benzoat + aquades steril hingga volume 50 ml.

d. Formula 4

Pada tabung Erlenmeyer dilakukan pelarutan Na-Sakarin 0,3 gram dan Asam Benzoat 0,025 gram dengan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian pada labu takar 50 ml campurkan ekstrak etanol daun ciplukan 20% sebanyak 10 ml + *Peppermint oil* 0,5 ml + larutan Na-sakarin dan Asam benzoat + aquades steril hingga volume 50 ml.

e. Formula 5

Pada tabung Erlenmeyer dilakukan pelarutan Na-Sakarin 0,3 gram dan Asam Benzoat 0,025 gram dengan aquades steril sebanyak 10 ml. Kemudian pada labu takar 50 ml campurkan ekstrak etanol daun ciplukan 25% sebanyak 12,5 ml + *Peppermint oil* 0,5 ml + larutan Na-sakarin dan Asam benzoat + aquades steril hingga volume 50 ml.

5. Pembiakan bakteri

Dalam lempeng media *Trypticase Soy Agar* (TSA) bakteri *Streptococcus mutans* disubkultur selama 18 - 24 jam pada suhu 37⁰C. Kemudian dengan menggunakan ose steril beberapa koloni bakteri dipilih dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl sebanyak 1-2 ml. Lalu diinkubasikan selama 2–4 jam pada suhu 37⁰C. Kemudian diencerkan dengan menambah BHI (*Brain Heart Infusion*) hingga diperoleh jumlah kuman yang sesuai dengan larutan Standart Brown III yang diidentifikasi dengan konsentrasi kuman sebesar 10⁸ CFU/ml. Kemudian bakteri *Streptococcus mutans* diencerkan lagi dengan menggunakan medium cair BHI sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10⁶ CFU/ml.

6. Uji daya antibakteri

Uji daya antibakteri ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) yaitu dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*) yang dilakukan sebagai berikut:

- a. Disediakan 28 tabung steril dengan 4 kali pengulangan, setiap pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 5 tabung dan 2 tabung digunakan untuk sisa pengenceran, kontrol pertumbuhan kuman (kontrol positif) dan kontrol media (kontrol negatif). Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal dari daun ciplukan.
- b. Persiapan tabung uji disiapkan 7 tabung reaksi steril (2 untuk kontrol):
 - 1) Tabung I diisi 1 ml formula 1 + 1 ml suspensi bakteri 10⁶ CFU/ml.

- 2) Tabung II diisi 1 ml formula 2 + 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.
 - 3) Tabung III diisi 1 ml formula 3 + 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.
 - 4) Tabung IV diisi 1 ml formula 4 + 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.
 - 5) Tabung V diisi 1 ml formula 5 + 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.
 - 6) Tabung VI diisi 1 ml *Chlorhexidine gluconate* 0,2% + 1 ml suspensi bakteri (kontrol -)
 - 7) Tabung VII diisi 1 ml formula dasar obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan konsentrasi 0% + 1 ml suspensi bakteri 10^6 CFU/ml (kontrol +).
- c. Kemudian seluruh tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- d. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap ada tidaknya pertumbuhan kuman dengan cara membandingkan kadar kekeruhan dengan kontrol positif.
- e. Kadar hambat minimal didapatkan dengan cara mengamati tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kuman dengan konsentrasi terendah.
- f. Tabung-tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kuman selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA).
- g. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

- h. Kadar bunuh minimal ditunjukkan dengan tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada media TSA dengan konsentrasi terendah.

Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan di dalam tabung reaksi yang dibandingkan dengan kontrol standar.

Pembacaan nilai didasarkan pada:

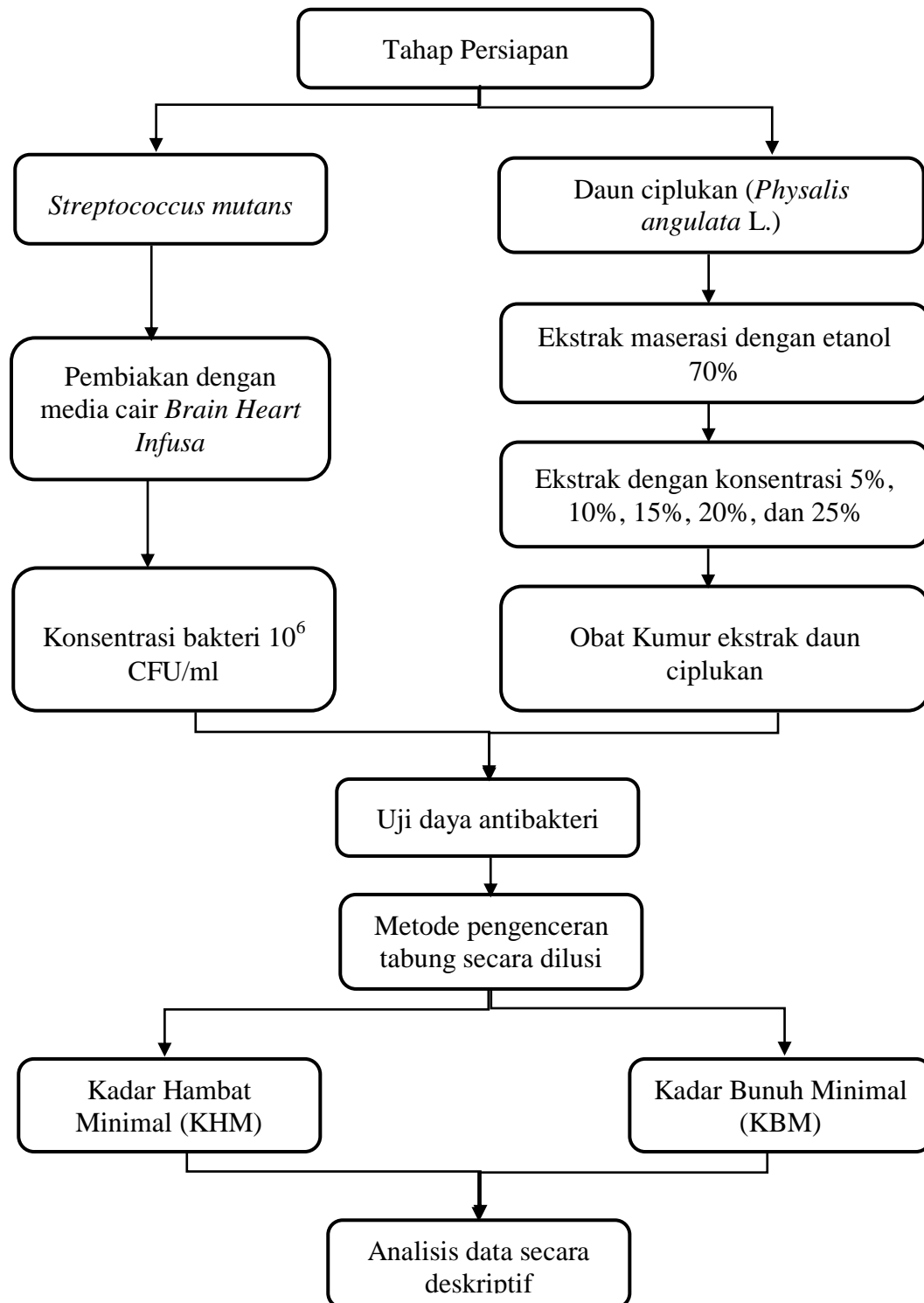
- a. Tanda negatif (-): dengan melihat adanya kejernihan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* sehingga obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+): dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* sehingga obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Sedangkan pembacaan KBM dapat ditentukan dengan menguji konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini ditunjukkan dengan ada tidaknya pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA).

H. Analisis Data

Data hasil penelitian, dianalisis secara deskriptif. Hasil penelitian dengan melihat kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) daya antibakteri obat kumur ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

I. Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian