

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Desain Penelitian**

Jenis dari penelitian ini adalah eksperimental laboratorium.

#### **B. Tempat Dan Waktu**

Pelaksanaan penelitian dilakukan di Universitas Muhammadiyah Yogyakarta, pembuatan sampel ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Pembuatan sampel kultur bakteri dan pelaksanaan uji aktivitas antibakteri akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

Penelitian dilaksanakan pada bulan November-Desember 2017.

#### **C. Subjek Penelitian**

##### **1. Bahan Uji**

Ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39% dan 0.2%.

##### **2. Bakteri Uji**

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diisolasi di Laboratorium Mikrobiologi FKIK Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

## D. Identifikasi Variabel Dan Definisi Operasional

### 1. Identifikasi Variabel

#### a. Variabel Pengaruh

Ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) dalam berbagai konsentrasi

#### b. Variabel Terpengaruh

Kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) bakteri *Streptococcus mutans*.

#### c. Variabel Terkendali

1) Konsentrasi ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)

2) Volume ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)

3) Strein Bakteri *Streptococcus mutans*

4) Waktu inkubasi 24 jam

5) Suhu inkubasi 37<sup>0</sup>C

6) Media pertumbuhan bakteri

7) Konsentrasi suspensi bakteri

### 2. Definisi Operasional Penelitian

a. Daya antibakteri adalah kemampuan suatu bahan membunuh serta menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri (Jawetz, 1996).

b. Ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah ekstrak daun ciplukan yang sudah diekstrak dengan metode maserasi dengan penyari etanol 70%.

- c. Metode maserasi adalah ekstraksi sederhana dengan merendam bahan simplisia kedalam larutan penyari. Cairan akan menembus dinding sel dan akan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang diluar sel, maka zat aktif (zat terlarut) ditarik keluar (Najib, 2018).
- d. Daya antibakteri ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah daya hambat dan daya bunuh dari ekstrak daun ciplukan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang ditentukan dengan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM).
- e. KHM adalah konsentrasi terendah dari suatu zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu.
- f. KBM adalah konsentrasi terendah dari suatu zat yang dapat membunuh mikroorganisme tertentu.
- g. Metode dilusi adalah metode di mana sejumlah zat antimikroba dimasukkan ke dalam bakteriologi berbentuk padat ataupun cair (Jawetz, 1996).
- h. Bakteri uji *Streptococcus mutans* adalah merupakan bakteri gram-positif berbentuk bulat yang mempunyai karakteristik dapat membentuk pasangan atau rantai selama pertumbuhannya (Argimön & Caufield, 2011).

## **E. Alat Dan Bahan Penelitian**

### **1. Alat Penelitian**

- a. Autoklaf
- b. Pinset
- c. Lampu spiritus
- d. *Mortal* dan alat penumbuk atau *blender*
- e. *Neraca*
- f. *Vakum rotary evaporator*
- g. Inkubator
- h. Cawan petri untuk media agar
- i. Mikro pipet
- j. Ose steril
- k. Kapas lidi
- l. Corong *Buchner*
- m. *Water bath*
- n. Tabung reaksi dan rak tabung reaksi
- o. Glass beker

## **2. Bahan Penelitian**

- a. Ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.)
- b. Bakteri *Streptococcus mutans*
- c. Media *Tryptone Soya Agar* (TSA)
- d. Media cair *Brain Heart Infusion* (BHI)
- e. Etanol 70%
- f. NaCl fisiologis
- p. *Aquades*

## F. Cara Kerja

### 1. Persiapan

Persiapan alat dan bahan serta sterilisasi alat.

### 2. Identifikasi tanaman

Tanaman ciplukan yang sudah dikumpulkan, diambil beberapa sampel untuk dilakukan identifikasi taksonomi tanaman.

### 3. Pembuatan ekstrak etanol daun ciplukan

- a. Tanaman ciplukan yang sudah diidentifikasi diambil daunnya yang segar dicuci bersih dengan air. Kemudian daun ciplukan dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 60<sup>0</sup>C selama lima hari. Daun ciplukan dibuat serbuk dengan cara ditumbuk menggunakan *mortar* atau blender. Setelah mendapat serbuk, kemudian dimaserasi selama 24 jam menggunakan etanol 70%. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan corong *buchner*. Hasil yang diperoleh disaring menggunakan corong *buchner*. Filtrate yang dihasilkan kemudian dimasukkan kedalam *vacuum rotary evaporator* dengan pemanasan suhu 70%. Hasil filtrat dari *vacuum rotary evaporator* kemudian dipindahkan ke cawan porselin lalu dipanaskan diatas pemanas *water bath* agar didapatkan ekstrak kental 100%.
- b. Kemudian ekstrak daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan yaitu 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39% dan 0.2% dengan menggunakan aquades steril.

#### 4. Pembuatan suspensi kuman

Koloni bakteri *Streptococcus mutans* disubkultur dalam lempeng agar TSA selama 24 jam pada suhu 37<sup>0</sup>C. Koloni yang tumbuh dipilih dengan menggunakan ose steril, diinokulasikan pada 2 ml media bahan cair BHI lalu diinkubasikan pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 2-5 jam sampai pertumbuhan bakteri tampak. Kemudian dibuat suspensi bakteri dengan cara suspensi dalam larutan NaCl fisiologis steril sampai kekeruhan sama dengan suspensi larutan standar Brown III yang diidentifikasi dengan konsentrasi kuman sebesar 10<sup>8</sup>CFU/ml. Bakteri tersebut diencerkan lagi dengan medium cair BHI sehingga konsentrasi menjadi 10<sup>6</sup>CFU/ml.

#### 5. Uji aktivitas daya antibakteri

Uji daya antibakteri ekstrak etanol daun ciplukan (*Physalis angulata* L.) yaitu dengan metode pengenceran tabung (*Tube Dilution Method*) sebagai berikut :

- a. Disediakan 48 tabung steril dengan 4 kali pengulangan, di mana setiap pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 10 tabung dan 2 tabung untuk sisa pengenceran, kontrol pertumbuhan kuman (kontrol positif) dan kontrol media (kontrol negatif). Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimum dan kadar bunuh minimum dari daun ciplukan.
- b. Persiapan tabung uji: disiapkan 12 tabung reaksi steril (2 untuk kontrol):

- 1) Tabung I diisi 1 ml filtrat ekstrak 100% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 2) Tabung II diisi 1 ml filtrat ekstrak 50% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 3) Tabung III diisi 1 ml filtrat ekstrak 25% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 4) Tabung IV diisi 1 ml filtrat ekstrak 12,5% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 5) Tabung V diisi 1 ml filtrat ekstrak 6,25% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 6) Tabung VI diisi 1 ml filtrat ekstrak 3,13% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 7) Tabung VII diisi 1 ml filtrat ekstrak 1,56% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 8) Tabung VIII diisi 1 ml filtrat ekstrak 0,78% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 9) Tabung IX diisi 1 ml filtrat ekstrak 0,39% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 10) Tabung X diisi 1 ml filtrat ekstrak 0,2% + 1 ml suspensi bakteri + BHI
  - 11) Tabung XI diisi 2 ml BHI (kontrol -)
  - 12) Tabung XII diisi 2 ml suspensi bakteri (Kontrol +)
- c. Selanjutnya seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C, selama 24 jam.

- d. Diamati ada tidaknya pertumbuhan kuman dengan cara membandingkan kadar kekeruhan dengan kontrol positif.
  - e. Kadar hambat minimum diperoleh dengan mengamati tabung yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi terendah.
  - f. Tabung-tabung subkultur yang tidak memperlihatkan pertumbuhan kuman selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose pada medium agar nutrien.
  - g. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.
  - h. Kadar bunuh minimum akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium agar nutrien dengan konsentrasi terendah.
6. Pembacaan hasil

Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kejernihan/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 ekstrak etanol daun ciplukan dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*

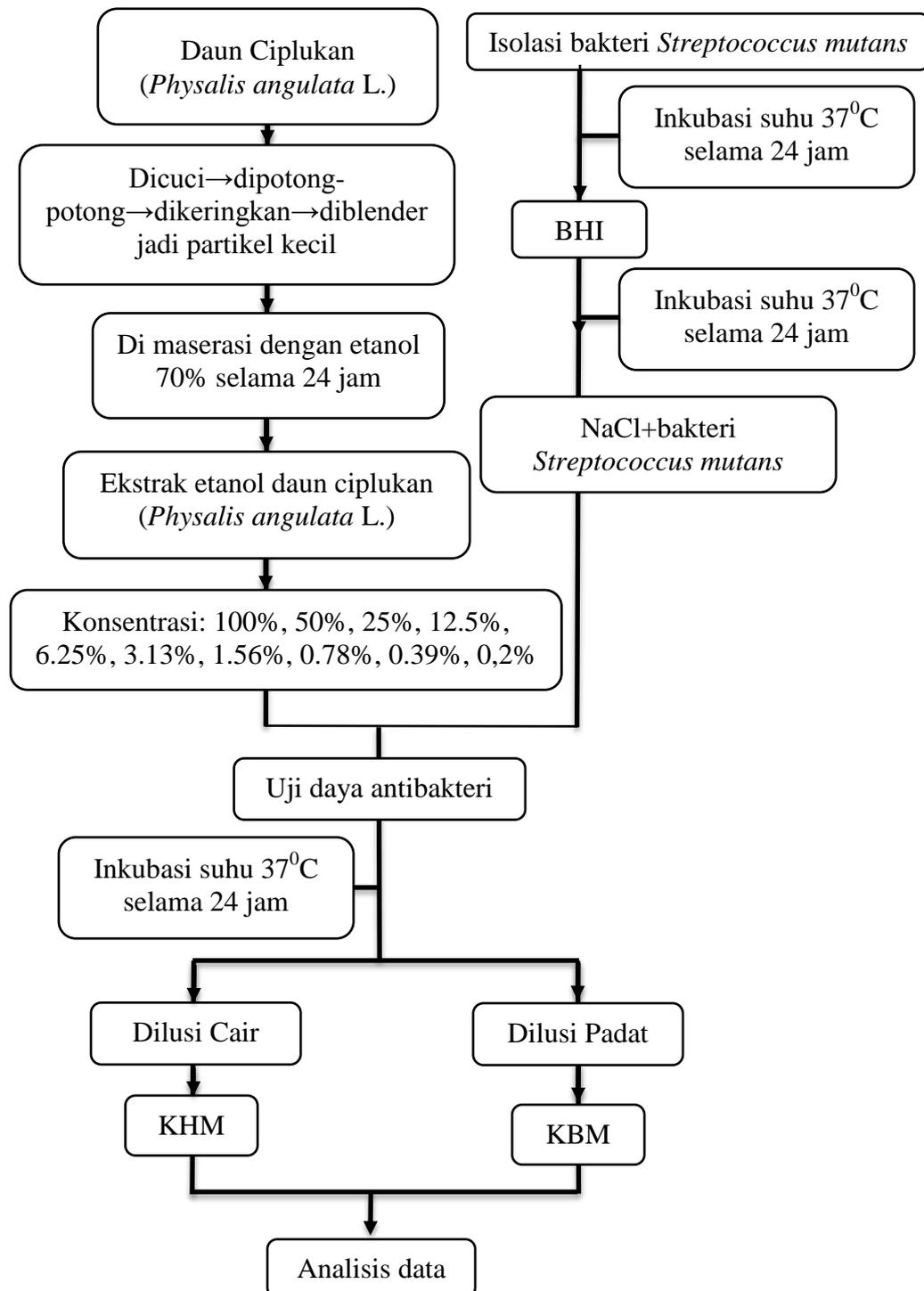
sehingga ekstrak daun ciplukan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

- c. Sedangkan pembacaan KBM ditentukan dengan melihat konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media agar TSA.

#### **G. Analisis Data**

Hasil penelitian berupa analisis Deskriptif Kuantitatif dengan mengukur kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) dari ekstrak daun ciplukan terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

## H. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian