

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium untuk membuktikan pengaruh daya antibakteri ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*.

B. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada untuk pembuatan ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan metode masreasi. Identifikasi dan determinasi tanaman ciplukan (*Physalis angulata* L.) dilakukan di Bagian Toksonomi Tumbuhan Fakultas Ilmu Biologi Universitas Gadjah Mada. Penyiapan inokulum bakteri uji dan pelaksanaan uji daya antibakteri dilakukan di Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan Juni tahun 2013 sampai bulan Juli tahun 2013.

C. Subyek penelitian

a. Bahan Uji

Buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) diperoleh dari kebun di daerah Imogiri, Bantul. Pembuatan sampel ekstrak etanol buah ciplukan

(*Physalis angulata* L.) dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu UGM. Dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13%, 1.56%, 0.78%, 0.39% dan 0.2%.

b. Bakteri Uji

Bakteri uji yang digunakan adalah *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

D. Identifikasi Variabel Penelitian dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel Penelitian

a. Variabel Pengaruh

Konsentrasi ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.).

b. Variabel Terpengaruh

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

c. Variabel Terkendali

1. Konsentrasi ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.)
2. Strain Bakteri *Streptococcus mutans*
3. Waktu inkubasi 18 – 24 jam
4. Suhu inkubasi 37°C
5. Jenis media kultur bakteri *Mueller Hinton Agar*
6. Jenis medium pembiakan adalah medium BHI
7. Etanol sebagai penyari
8. Konsentrasi suspensi kuman 10⁶ CFU/ml

9. Suhu Pengeraman
10. Lama Pengeraman 24 jam

2. Definisi Operasional Penelitian

- a. Ekstraksi etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah buah ciplukan yang sudah diekstrak dengan metode maserasi dengan penyari etanol 70 %.
- b. *Streptococcus mutans* merupakan bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang sendirian berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu sekitar 180⁰-400⁰ Celcius. *Streptococcus mutans* biasanya ditemukan pada rongga gigi manusia yang luka menjadi bakteri yang paling kondusif menyebabkan karies (Nugraha, 2008).
- c. Daya antibakteri ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) adalah daya hambat atau daya bunuh dari ekstrak buah ciplukan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang ditentukan dengan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM).
- d. Kadar hambat minimal (KHM) adalah kadar terkecil suatu zat yang masih dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu.
- e. Kadar bunuh minimal (KBM) adalah kadar terkecil suatu zat yang masih dapat membunuh mikroba tertentu.

- f. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu kamar.
- g. Buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) terdapat zat aktif saponin, flavonoid, alkaloid, asam malat, tannin, kriptoxantin, vitamin C dan gula (Agoes, 2010).

E. Bahan dan Alat Penelitian

1. Bahan Penelitian

- a. Medium *Mueller Hinton Agar*
- b. Medium BHI (*Brain Heart Infusion*)
- c. Aquades steril
- d. Ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis Angulata* L.)
- e. Bakteri *Streptococcus mutans*
- f. NaCl fisiologis
- g. Larutan Standart Brown III

2. Alat Penelitian

- | | |
|---------------|---------------------|
| a. Pinset | h. Kapas |
| b. Mikropipet | i. Timbangan |
| c. Handscoon | j. Gunting |
| d. Oven | k. Kertas saring |
| e. Ose | l. Gelas Erlenmeyer |
| f. Masker | m. Cawan petri |
| g. Blender | n. Inkubator |

- | | |
|--------------------------|----------------------|
| o. Corong gelas | v. Selang water pump |
| p. Labu evaporator | w. Spiritus |
| q. Labu penampung etanol | x. Autoklaf |
| r. Evaporator | |
| s. Tabung | |
| t. Rak tabung | |
| u. Pendingin spiral | |

F. Cara Kerja Penelitian

1. Persiapan

Sebelum melakukan penelitian alat-alat yang akan digunakan dibersihkan terlebih dahulu dengan air ledeng yang mengalir lalu dikeringkan. Setelah itu alat-alat tersebut disterilkan dengan menggunakan autoklaf. Selanjutnya, semua alat yang sudah disterilkan dan bahan yang akan digunakan saat melakukan penelitian, disiapkan dalam satu meja agar memudahkan saat melakukan penelitian.

2. Pembuatan Ekstrak

- a. Tanaman ciplukan yang sudah diidentifikasi diambil buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) di cuci bersih dengan air sampai bersih lalu dipotong menjadi beberapa bagian. Buah ciplukan dikeringkan dengan menggunakan oven pada temperatur 60^oC selama lima hari. Buah 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 Bucher. Filtrat I diuapkan menggunakan pelarut yang sama. Filtrat disaring dan didapatkan

filtrat ke II. Filtrat I dan II dicampur lalu diuapkan pada suhu 60⁰C-70⁰C hingga diperoleh ekstrak kental 100%.

- b. Kemudian ekstrak buah 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.

3. Penyiapan Inokulum Bakteri Uji

Koloni bakteri *Sterptococcus mutans* disubkultur dalam lempeng agar TSA selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Koloni yang tumbuh dipilih dengan menggunakan ose steril, diinkulasikan pada 2 ml media bahan cair BHI lalu diinkubasikan pada suhu 37⁰C 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 10⁸ CFU/ml. Kuman tersebut diencerkan lagi dengan medium cair BHI sehingga konsentrasi menjadi 10⁶ CFU/ml.

4. Pelaksanaan uji daya antibakteri

Penentuan daya antibakteri dengan penentuan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak buah ciplukan dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*)

- a. Disediakan 36 tabung reaksi volume 5 ml steril untuk 3 kali pengulangan, dimana setiap seri percobaan dalam satu ulangan menggunakan 10 buah tabung dan 2 tabung untuk sisa

pengenceran, kontrol pertumbuhan kuman (kontrol positif) dan kontrol media (kontrol negatif). Pengenceran pertama untuk menguji kadar hambat minimal dan kadar bunuh minimal ekstrak buah ciplukan (*Physalis angulata* L.).

- 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 1 ml suspensi bakteri + 1 ml BHI (kontrol+)
 - 12) Tabung XII diisi sisa pengenceran ekstrak + 1 ml BHI (kontrol -)

- c. Selanjutnya seluruh tabung diinkubasikan pada suhu 37°C , selama 24 jam.
- d. Diamati ada tidaknya pertumbuhan kuman dengan cara membandingkan dengan kontrol positif.
- e. Kadar hambat minimal diperoleh dengan mengamati tabung subkultur yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan kuman dengan konsentrasi terendah.
- f. Tabung-tabung subkultur yang tidak memperlihatkan pertumbuhan kuman selanjutnya ditanam dengan menggunakan ose pada medium *Mueller Hinton Agar*.
- g. Kemudian diinkubasikan pada 37°C selama 24 jam.
- h. Kadar bunuh minimal akan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan kuman pada agar medium *Mueller Hinton Agar* 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 ekstrak etanol buah ciplukan dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda positif (+) : dengan melihatnya kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*

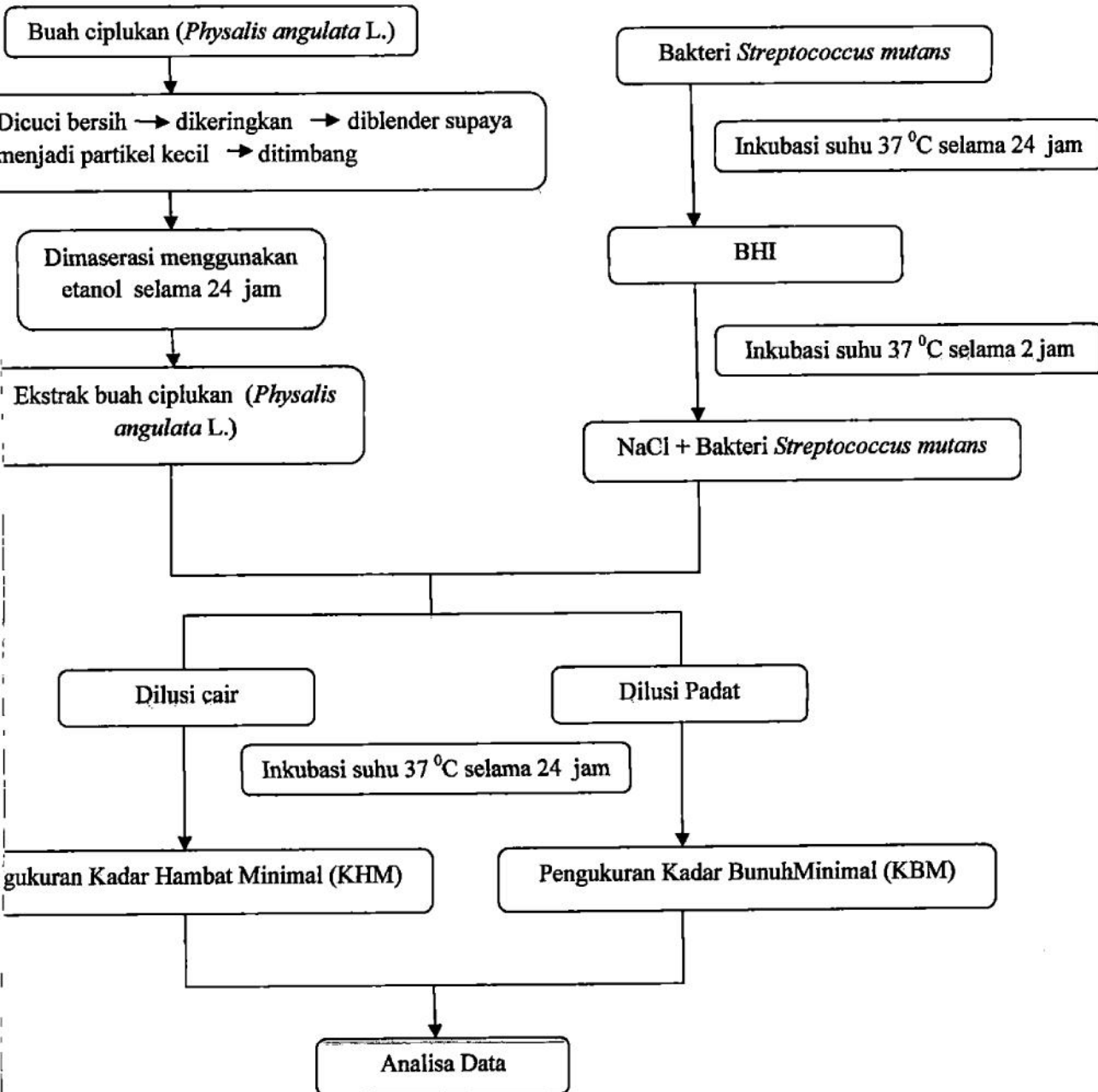
sehingga buah ciplukan tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Pembacaan KBM ditentukan dengan melihat konsentrasi terkecil dari bahan uji yang masih dapat membunuh bakteri. Hal ini di tandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media *Mueller Hinton Agar*.

G. Analisa Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis data deskriptif dan bersifat kuantitatif dengan cara mengukur KHM (kadar hambat minimal) dan KBM (kadar bunuh minimal) ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.).

H. Alur Penelitian



Gambar 4 . Alur Penelitian

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

Penelitian ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro merupakan penelitian untuk mengetahui daya antibakteri dari buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) dengan cara menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Kadar hambat minimal (KHM) dapat ditentukan dengan cara mengamati pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terkecil dimana bakteri tersebut masih dapat tumbuh. Kadar bunuh minimal dapat ditentukan dengan cara mengamati tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar. Bakteri uji yang digunakan adalah bakteri *Streptococcus mutans*.

Penelitian ini dilakukan dengan tiga kali pengulangan, dari masing - masing perlakuan dapat diperoleh kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari ekstrak etanol buah ciplukan (*Physalis angulata* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. Metode dilusi cair diujikan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri pada konsentrasi terkecil yaitu deret tabung terakhir yang masih tampak jernih. Pemilihan metode dilusi cair dikarenakan lebih peka dan terjamin homogenitasnya antara media, bahan uji dan suspensi bakteri, sehingga bahan uji lebih mudah berinteraksi dengan bakteri karena suspensi tersebar merata. Hasil penelitian menggunakan metode dilusi cair dengan 10 tabung konsentrasi tetapi pada beberapa tabung konsentrasi tidak dapat terbaca hasilnya