

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*true experiment–post test only control group design*) dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui efektifitas antibakteri ekstrak etanol daun ceplukan (*Physalis minima L.*) terhadap *Streptococcus mutans* secara in-vitro.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang dilaksanakan dari bulan Oktober 2013 sampai Januari 2014.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun Ceplukan (*Physalis minima L.*) diperoleh UPT Materia Medica di Kota Batu.

4.4 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan rumus estimasi besar pengulangan sebagai berikut (Loekito, 1998) :

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah pengulangan

Dalam penelitian ini digunakan 5 macam perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda.

$$p = 5$$

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang harus dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya adalah sebanyak 4 kali pengulangan.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Ekstrak etanol daun ceplukan dengan konsentrasi 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%. Konsentrasi didapatkan setelah uji eksplorasi dilakukan.

4.5.2 Variabel Terikat

Tingkat pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*

4.6 Definisi Operasional

- a. Ekstrak etanol daun ceplukan (*Physalis minima L.*) adalah ekstrak yang diperoleh dari daun ceplukan yang telah dikeringkan, kemudian dihaluskan, direndam dalam etanol 96%, diaduk, didiamkan (maserasi), dan diambil filtratnya dengan penyaringan yang kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C.
- b. Bakteri *Streptococcus mutans* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB . Standar kepadatan bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1×10^6 CFU/ml. CFU/ml merupakan singkatan dari *Colony Forming Unit* / mililiter. Hasil pewarnaan Gram pada bakteri *Streptococcus mutans* adalah warna ungu, dengan bentuk kokus berantai atau berpasangan.
- c. Kadar Hambat Minimum (KHM) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah dari antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu. Untuk melihat KHM, dilihat tingkat kekeruhan pada tabung. Bila terlihat kekeruhan maka menunjukkan adanya bakteri resisten terhadap zat antibakteri tersebut. Bila tidak tampak kekeruhan, berarti bakteri sensitif terhadap zat antibakteri. Selanjutnya hasil kekeruhan yang terlihat dicatat dengan menilai adanya pertumbuhan bakteri (+) atau tidak ada pertumbuhan bakteri (-).
- d. Kadar Bunuh Minimum (KBM) atau *MBC Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) adalah konsentrasi terendah dari antibakteri

yang dapat membunuh mikroorganisme tertentu. Untuk melihat KBM, dilihat ada tidaknya bakteri pada setiap konsentrasi di media padat BHI. Kemudian hasil tersebut dicatat dengan menilai adanya bakteri (+) atau tidak ada bakteri (-), lalu jumlah koloni pada setiap konsentrasi dihitung dengan menggunakan *colony counter*.

- e. *Original Inoculum* (OI) adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat dan digunakan untuk mencari kategori KBM (Kadar Bunuh Minimum)
- f. Kontrol Kuman (tabung dengan bakteri tanpa larutan ekstrak etanol daun ceplukan) adalah tabung dengan konsentrasi 0% yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bakteri *Streptococcus mutans* yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.
- g. Kontrol Bahan adalah bahan berupa larutan ekstrak etanol daun ceplukan dengan konsentrasi 100% yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril atau tidak.

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat

- a. Petridisk
- b. Pipet
- c. Tabung reaksi
- d. Rak tabung
- e. Gelas ukur
- f. Beaker glass
- g. Erlenmeyer

- h. Corong *Buchner*
- i. Pengaduk
- j. Bunsen
- k. Korek Api
- l. Ose
- m. Inkubator
- n. *Rotary evaporator*
- o. Timbangan analitik
- p. Korek api
- q. Autoklaf
- r. Spektrofotometers.
- s. Label
- t. Kertas saring
- u. Colony Counter

4.7.2 Bahan

- a. Daun ceplukan (*Physalis minima L.*) yang sudah menjadi serbuk
- b. *Streptococcus mutans*
- c. Media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
- d. Media *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)
- e. Alkohol 96%
- f. Etanol 96%
- g. NaCl
- h. Kristal violet
- i. Lugol
- j. Safranin

- k. Aquades
- l. Minyak imersi
- m. Kertas penghisap
- n. Kapas
- o. H₂O₂ 3%
- p. *Optochin disk*.

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun Ceplukan

a. Proses Pengeringan

1. Daun Ceplukan dipotong kecil-kecil
2. Jemur dengan panas matahari sampai benar-benar kering

b. Proses ekstraksi

1. Setelah kering, haluskan dengan blender
2. Timbang sebanyak 100 gram sampel kering ke dalam labu Erlenmeyer ukuran 1 L
3. Rendam dengan etanol 96% hingga volume 900ml
4. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
5. Diamkan selama 12 jam hingga mengendap

c. Proses Evaporasi

1. Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil
2. Masukkan ke dalam labu evaporasi pada evaporator
3. Isi water bath dengan air sampai penuh (2,5 liter)

4. Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath (atur hingga 90°C) sambungkan dengan aliran listrik
5. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu
6. Tunggu hingga aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung ($\pm 1,5 - 2$ jam untuk 1 labu)
7. Hasil yang diperoleh kira-kira 1/3 dari 100 gram daun Ceplukan kering, yaitu ± 25 ml
8. Masukkan hasil ekstraksi dalam botol
9. Simpan dalam freezer (4°C)

4.8.2 Identifikasi Bakteri

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

1. Satu ose akuades steril ditetaskan pada gelas objek, lalu diambil sedikit bakteri untuk disuspensi dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas objek, lalu dibiarkan kering di udara.
2. Suspensi bakteri yang sudah kering difiksasi dengan cara melewatkan beberapa kali di atas api. Sediaan siap untuk diwarnai.
3. Kristal violet ditetaskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
4. Lugol ditetaskan pada sediaan dan ditunggu selama satu menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

5. Alkohol 96% diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 5-10 detik. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Safranin diteteskan pada sediaan dan ditunggu selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
7. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.
8. Sediaan dilihat di bawah mikroskop.
9. Hasil positif : *Streptococcus mutans* berwarna ungu (Gram positif).

4.8.2.2 Uji Katalase

Untuk membedakan antara kuman *Staphylococcus* dan *Streptococcus* dilakukan uji katalase, yaitu dengan menambahkan larutan H_2O_2 3% pada perbenihan cair. *Streptococcus* akan memberikan hasil negatif yang ditunjukkan dengan tidak munculnya gelembung udara.

Langkah – langkah uji katalase sebagai berikut:

1. Buat suspensi kuman pada gelas objek
2. Tambahkan 1 tetes larutan salin/ aquadest steril pada gelas objek
3. Tambahkan 1 ose koloni kuman
4. Tetesi dengan 1 tetes H_2O_2 3%
5. Amati timbulnya gelembung – gelembung udara pada media perbenihan.

4.8.2.3 Tes Optochin

1. Membagi *Chocolate Agar Plate* menjadi empat kuadran
2. Melakukan striking 1 atau 1½ kuadran pada *CAP*

3. Letakkan optochin disk di tengah inokulum dengan penjepit steril
4. Mengatur posisi disk dengan menekan disk pelan-pelan pada permukaan agar, tetapi tidak membenamkan disk dalam agar
5. Inkubasi selama 1 malam pada suhu 37°C dalam inkubator
6. Mengamati zona hambatan di sekeliling disk. Jika terdapat zona ≥ 14 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 6 mm dan zona ≥ 16 mm yang mengelilingi disk dengan diameter 10 mm, hasil tes adalah positif dan diidentifikasi sebagai *Streptococcus pneumoniae*. Jika terdapat zona hambat < 14 mm, hasil diidentifikasi sebagai *Streptococcus mutans*.

4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Ambil 5 koloni ($d \geq 1$ mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda = 625$ nm. Dari hasil yang diperoleh dibuat perbenihan cair bakteri yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$

4.8.4 Prosedur Pelaksanaan

1. Disediakan 7 tabung steril yaitu 5 tabung sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol kuman dan 1 tabung sebagai kontrol bahan

2. Pembuatan konsentrasi ekstrak etanol daun ceplukan didapatkan dari metode pengenceran seri dengan cara perbandingan antara volume ekstrak (ml) dengan *aquadest* (ml). Konsentrasi yang digunakan adalah 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; dan 15%

3. Pengenceran seri :

- a. Ekstrak etanol daun ceplukan 15% dibuat dengan cara mengambil 0,15 ml ekstrak 100% ditambah 0,85 ml *aquadest*.
- b. Ekstrak etanol daun ceplukan 12,5% dibuat dengan cara mengambil 0,125 ml ekstrak 100% ditambah 0,875 ml *aquadest*.
- c. Ekstrak etanol daun ceplukan 10% dibuat dengan cara mengambil 0,1 ml ekstrak 100% ditambah 0,9 ml *aquadest*.
- d. Ekstrak etanol daun ceplukan 7,5% dibuat dengan cara mengambil 0,075 ml ekstrak 100% ditambah 0,925 ml *aquadest*.
- e. Ekstrak etanol daun ceplukan 5% dibuat dengan cara mengambil 0,05 ml ekstrak 100% ditambah 0,95 ml *aquadest*.
- f. Kontrol Kuman (KK) merupakan biakan *Streptococcus mutans*.
- g. Kontrol Bahan (KB) merupakan ekstrak etanol daun ceplukan dengan konsentrasi 100%.

4. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml.

5. Perbenihan cair bakteri dimasukkan pada semua tabung konsentrasi, masing-masing sebanyak 1 ml, sehingga konsentrasi akhir ekstrak etanol daun ceplukan (*Physalis minima L.*) adalah :

Tabung 1 : 15%

Tabung 2 : 12,5%

Tabung 3 : 10%

Tabung 4 : 7,5%

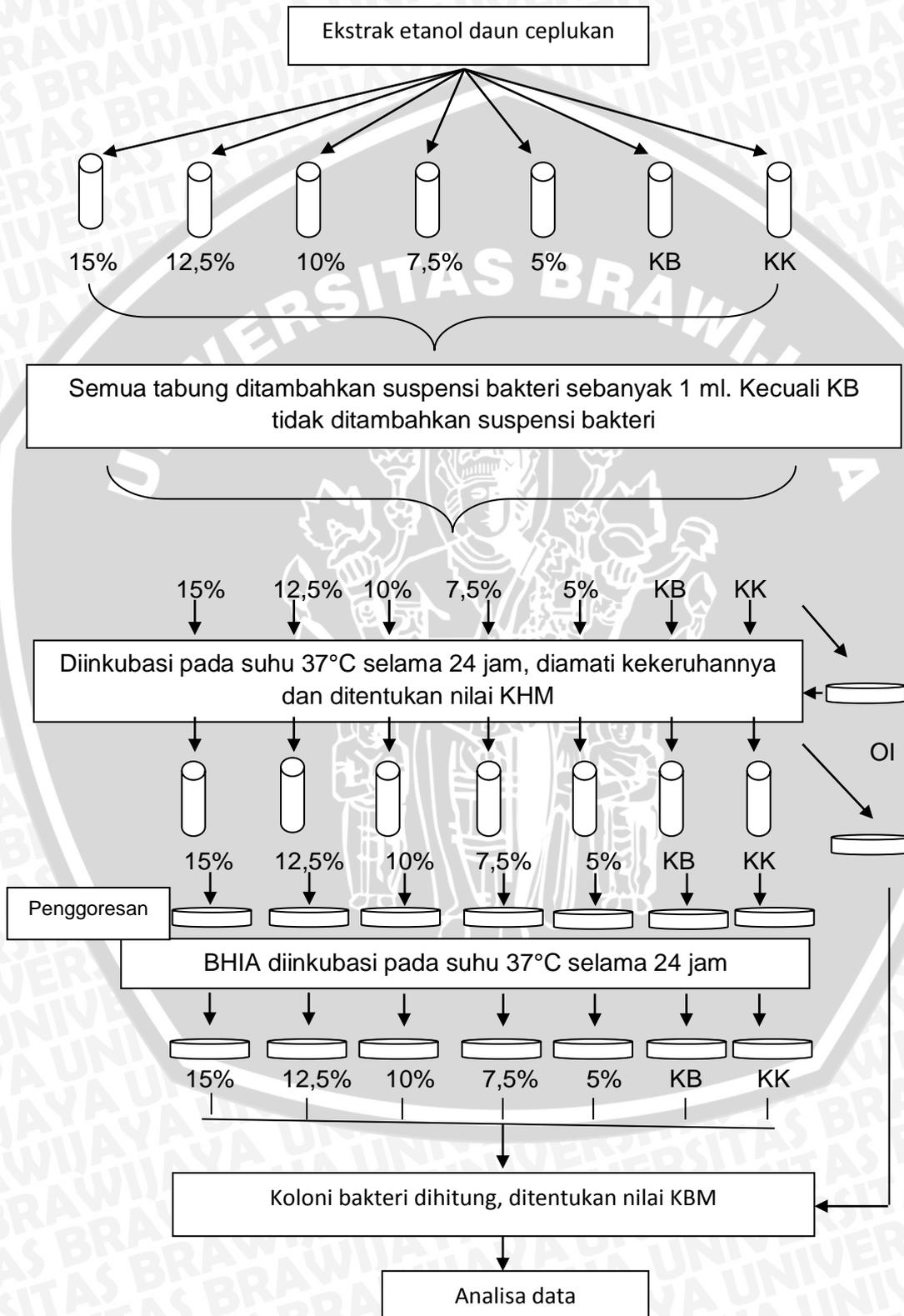
Tabung 5 : 5%

Tabung 6 : kontrol kuman

Tabung 7 : kontrol bahan

6. Kontrol Kuman (0%) digoreskan pada media BHIA sebagai *Original Inoculum*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
7. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
8. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung dibantu dengan latar belakang berupa garis hitam yang berbeda ketebalannya. Selanjutnya dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose, lalu diinokulasikan pada media BHIA. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
9. Pada hari ketiga, data KBM didapatkan dan pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengamatan kuantitatif dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media BHIA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *Original Inoculum*.

Kerangka Operasional Penelitian



Keterangan :

KK : Kontrol Kuman

KB : Kontrol Bahan

4.8.5 Analisis Data

Setelah diperoleh data hasil percobaan tersebut, data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi normalitas dan homogenitas varian menggunakan shapiro-wilk dan *levene homogeneity test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, analisis data yang digunakan adalah dengan menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun ceplukan terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun ceplukan terhadap jumlah koloni bakteri *Streptococcus mutans* dan mengetahui bagaimana sifat hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan menjadi penurunan jumlah koloni, dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Apabila data yang diperoleh dalam penelitian tidak berdistribusi normal, maka menggunakan analisis non-parametrik Kruskal-Wallis dan uji korelasi Spearman.

