

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental laboratorium untuk membuktikan pengaruh daya antibakteri ekstrak etanol kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terhadap pertumbuhan *streptococcus mutans* (kajian *in vitro*).

B. Subyek Penelitian

1. Bahan Uji

Kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang diperoleh dari kebun Ibu Dhea Indri di daerah Ngestiharjo, Bantul, Yogyakarta.

2. Bakteri Uji

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diisolasi oleh Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

C. Tempat dan Waktu

Tempat penelitian menggunakan :

1. Laboratorium Pengujian dan Penelitian Terpadu (LPPT) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta digunakan untuk ekstrak kulit dan daging buah

mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan metode perkolasi.

2. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta digunakan untuk pengembangbiakan *Streptococcus mutans* yang telah diisolasi dan untuk pengukuran kadar hambat dengan metode dilusi cair.

Waktu penelitian dilakukan : Selama bulan September 2009 sampai dengan bulan Februari 2010.

D. Identifikasi Variabel dan Definisi Operasional

1. Identifikasi Variabel

a. Variable Pengaruh

Variabel pengaruh adalah ekstrak kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.).

b. Variable terpengaruh

Variable terpengaruh adalah pertumbuhan *Streptococcus mutans*.

c. Variabel terkendali

- 1) Suhu inkubasi, merupakan suhu optimum yang sesuai untuk pertumbuhan *Streptococcus mutans* yaitu 37°C.
- 2) Kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang berwarna merah.

- 3) Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mencapai optimum. Waktu optimum yang dibutuhkan untuk tumbuhnya sampel adalah 18-24jam.
- 4) Larutan kuman yang digunakan adalah larutan standar dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml, yang dimaksud CFU adalah Colony Forming Unit, sedangkan CFU/ml adalah satuan yang digunakan untuk menunjukkan konsentrasi atau kekeruhan suatu larutan.
- 5) Media pembiakan menggunakan *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai media pembiakan bakteri *Streptococcus mutans*. Dengan menggunakan BHI, maka bakteri tersebut akan tumbuh dengan subur sedangkan bakteri lain akan terhambat pertumbuhannya.
- 6) Sterilitas media, tindakan dan alat-alat yang digunakan dalam keadaan steril serta dikerjakan dengan cara yang aseptik termasuk operatornya.

2. Definisi Operasional

- a. Ekstraksi atau penyarian merupakan suatu kegiatan penarikan zat yang dapat larut dari bahan yang tidak dapat larut dengan menggunakan pelarut cair (Depkes RI, 1986).
- b. *Streptococcus mutans* termasuk bakteri gram positif, bersifat nonmotil (tidak bergerak), bakteri anaerob fakultatif. Memiliki bentuk kokus yang berbentuk bulat atau bulat telur dan tersusun dalam rantai. Bakteri ini tumbuh optimal pada suhu sekitar 18-40°C (Nugraha,

- c. Konsentrasi sebagai takaran presentasi larutan.
- d. Daya antibakteri merupakan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri.
- e. Daya hambat merupakan suatu daya dari mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) yang mempunyai kandungan saponin sebagai daya antibakteri *Streptococcus mutans*. Diukur dengan metode dilusi cair.
- f. Kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terdapat zat saponin, alkaloid, polifenol, flavonoid, lignan, minyak atsiri, terpenoid, dan sterol (Rostinawati, 2007).
- g. Perkolasi adalah cara penyarian yang dilakukan dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi.
- h. Kadar Hambat Minimal (KHM) merupakan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

E. Instrumen Penelitian

1. Bahan penelitian

- a. Bakteri *Streptococcus mutan*.
- b. Ekstrak kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.).
- c. Media *Brain Heart Infusion* (BHI) sebagai bahan pertumbuhan bakteri
- d. Aquades steril sebagai bahan pengencer bakteri.
- e. NaCl sebagai nutrisi pertumbuhan bakteri.

- f. Larutan McFarland sebagai pembanding standar suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.
- g. Kaldu nutrisi sebagai media pertumbuhan bakteri dan pada saat pengukuran kadar hambat minimal (KHM).

2. Alat penelitian

- a. Tabung reaksi, sebagai alat penampung bahan penelitian dilusi cair dan pengembangbiakan bakteri dikaldu maupun di NaCl.
- b. Pipet, untuk mengambil larutan.
- c. Ose, mengambil koloni bakteri.
- d. Lampu spiritus, sebagai media sterilisasi.
- e. Rak tabung reaksi, sebagai penyimpanan tabung.
- f. Inkubator, untuk mengeramkan bakteri dengan suhu 37°C .

F. Cara kerja

1. Cara Pembuatan Ekstrak

- a. Pengekstrakan kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan metode perkolasi.
 - 1) Pengeringan kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) setelah dibuang bijinya.
 - a) Kulit dan daging dipotong, kemudian dikeringkan.
 - b) Bahan dihaluskan menjadi partikel-partikel kecil sehingga luas permukaan bagian sel-selnya menjadi luas dan membuat permukaan menjadi maksimum untuk pelarut bekerja.

- c) Bahan dibasahi dengan etanol.
 - d) Masukkan ke dalam perkolator.
- 2) Pengisian perkolator.
- a) Pengisian perkolator dengan tepat sangat penting dilakukan. Jika pengisian tidak merata ekstraksi tidak berjalan dengan efisien.
 - b) Bahan dimasukkan ke dalam perkolator sebagian-sebagian, dan tiap bagian yang telah dimasukkan diratakan dan ditekan. Hindari ruang kosong antara lapisan.
 - c) Kolom diperiksa untuk melihat ada tidaknya tanda-tanda kekeliruan.
 - d) Bahan dimaserasi
- 3) Waktu maserasi

Lamanya waktu berbeda-beda tergantung dari sifat atau ciri campuran obat dan pelarut. Waktu ini harus cukup supaya pelarut dapat memasuki semua rongga dari struktur bahan dan melarutkan semua zat yang mudah larut. Lamanya waktu ini bisa beberapa jam hingga beberapa hari untuk ekstraksi yang optimum.

- 4) Perkolasi dan pengumpulan perkolat

Celah (lubang) bawah dibuka dan perkolat ditampung untuk dikumpulkan pada kecepatan yang telah ditentukan. Kecepatan aliran perkolasi penting bila ingin mendapatkan ekstraksi yang efektif dan sempurna.

5) Pengaturan konsentrasi perkolat

- a) Biasanya perkolasi diteruskan sampai menghasilkan volume yang diinginkan atau sampai zat yang diinginkan tertarik habis dari bahan obat yang dibuktikan dengan pengujian yang tepat bahwa perkolat tidak mengandung zat yang diinginkan lagi.
- b) Bagi beberapa ekstrak, khususnya yang dihasilkan dari bahan obat yang poten, pengujian potensi dilakukan pada akhir dari ekstraksi untuk mengatur kadar hasil ekstrak.
- c) Tiap tambahan pelarut untuk mengencerkan ekstrak dihilangkan dengan cara menguapkan semua pelarut sepanjang masih dapat terlihat dan teraba untuk memekatkan ekstrak hingga berbentuk serbuk untuk mendapatkan potensi yang diinginkan.

2. Kaldu Nutrisi (*Nutrient Broth*)

Pertama-tama timbang 8 gram serbuk kaldu dan 1 liter air aquades kemudian diautoclave kemudian ditaruh pada tabung steril (suhu 121°C selama 15 menit), pH pada 6,8. Formula yang terdapat pada serbuk; gelatin pepton, *beef extract*.

3. Pembuatan suspensi bakteri *Streptococcus mutans*

Bakteri *Streptococcus mutans* yang telah diisolasi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta pembuatannya dengan cara diinkubasi pada 37°C selama 24jam. Kemudian bakteri ini digunakan sebagai persediaan. Bakteri persediaan diambil satu ose dan

ditanam pada 2cc media *Brain Heart Infusion* (BHI) biasa, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-4jam, digunakan untuk penelitian. Disiapkan 10cc NaCl dalam tabung dan dimasukkan suspensi bakteri yang telah ditanam dalam BHI hingga terjadi kekeruhan 10^6 CFU/ml yang akan dibandingkan dengan larutan standar McFarland. Dibuat suspensi bakteri 10^6 CFU/ml sebagai konsentrasi bakteri yang dapat menimbulkan infeksi. 10cc BHI DS diambil dan dimasukkan 100mikroliter suspensi bakteri 10^6 CFU/ml.

4. Pengujian kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM)

Disiapkan 11 tabung tiap tabung diberi nomor 1-11. Tabung 1 berisi ekstrak daging dan kulit buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dengan konsentrasi 50%. Aquades steril dimasukkan dalam tabung 2-9 dan 11 masing-masing sebanyak 1cc. Tabung 1 diambil 1cc untuk dimasukkan dalam tabung 2, dicampur hingga homogen. Tabung 2 diambil 1cc untuk dimasukkan dalam tabung 3 dan seterusnya hingga tabung 9 (konsentrasi terkecil). Tabung 11 berisi sisa pengenceran ekstrak daging dan kulit buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.). Diambil 1cc dari tabung 11 dan dimasukkan dalam tabung 10, sebagai kontrol negatif. Suspensi bakteri 10^6 CFU/ml dimasukkan dalam tabung 1-9 dan tabung 11 sebagai kontrol positif masing-masing sebanyak 1cc. Semua tabung kemudian diinkubasi pada

suhu 37°C selama 18-24jam. Setelah itu, ditentukan berapa Kadar Hambat Minimal (KHM)nya.

5. Validitas dan realibilitas pengukuran hasil penelitian

Subyek penelitian yang telah diisolasi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Ekstrak dibuat dengan metode perkolasi. Pengaruh ekstrak kulit dan daging mahkota dewa sebagai antibakteri ditentukan dengan mengamati kadar hambat minimal (KHM) terhadap pertumbuhan koloni *Streptococcus mutans* pada kaldu nutrisi. Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan ditabung reaksi yang dibandingkan dengan kontrol standart. Pembacaan nilai didasarkan pada :

- a. Tanda positif (-) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *Streptococcus mutans* sehingga ekstrak etanol kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda negatif (+) : dengan melihat tidak terjadi kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan *Streptococcus mutans* sehingga ekstrak etanol kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif. Data diperoleh setelah dilakukan percobaan dengan tiga kali pengulangan.

Minimal (KHM)nya.
suhu 37°C selama 18-24jam. Setelah itu, ditentukan berapa Kadar Hambat

2. Validitas dan reliabilitas pengukuran hasil penelitian

Subyek penelitian yang telah diseleksi di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Ekstrak dibuat dengan metode perkolasi. Pengaruh ekstrak kulit dan daging maklota dewa sebagai antibakteri ditentukan dengan mengamati kadar hambatan minimal (KHM) terhadap pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* pada kultur nutrisi. Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan ditabung reaksi yang dibandingkan dengan kontrol standar.

Pembacaan nilai didasarkan pada :

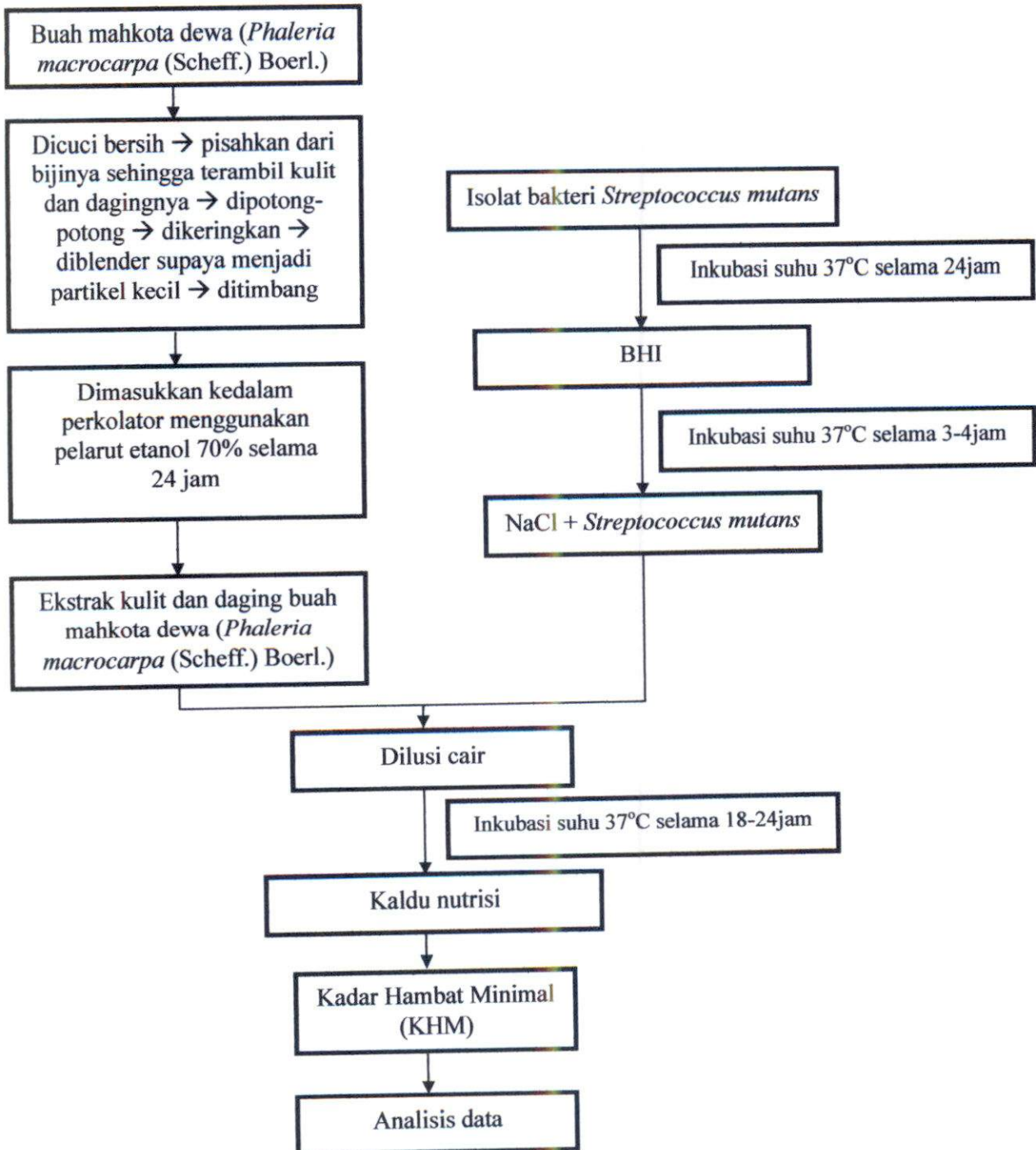
- a. Tanda positif (-) : dengan melihat adanya kekeruhan pada tabung menunjukkan tidak adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sehingga ekstrak etanol kulit dan daging buah maklota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Schott.) Boerl.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri.
- b. Tanda negatif (+) : dengan melihat tidak terjadi kekeruhan pada tabung menunjukkan adanya pertumbuhan *Staphylococcus aureus* sehingga ekstrak etanol kulit dan daging buah maklota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Schott.) Boerl.) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

G. Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini dilakukan secara deskriptif. Data diperoleh setelah dilakukan percobaan dengan tiga kali pengulangan.

Kemampuan daya anti bakteri ekstrak etanol kulit dan daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans* (kajian *in vitro*) dilihat dari kadar hambat minimal

H. Alur Penelitian



Gambar 4. Skema Alur Penelitian.