

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian dilaksanakan dari bulan Oktober sampai November 2016, di Laboratorium Penelitian Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### **B. Variabel Penelitian**

1. Variabel bebas : dosis kombucha
2. Variabel tergantung : diameter zona hambat (DZH)
3. Variabel terkontrol : *Staphylococcus aureus*, suhu inkubasi 37 °C, media agar Mc Conkey, lama inkubasi 48 jam

#### **C. Variabel Operasional**

DZH adalah diameter yang menunjukkan hambatan suatu senyawa antibakteri yang diuji dan dinyatakan dalam satuan millimeter (mm). Penghitungan diameter zona hambat dilakukan setelah melakukan perlakuan inkubasi selama 48 jam.

#### **D. Alat dan Bahan**

Sampel yang digunakan adalah jamur kombucha yang didapatkan dari Jakarta, teh yang digunakan adalah teh merek poci yang di dapatkan dari pasar Godean, Sleman Yogyakarta. Alat yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada tabel .

Tabel 1. Rincian Alat dan Bahan

<b>Bahan</b>		
No	Nama Bahan	Sumber / Merk Type
1	Gula putih	Gulaku
2	Aquadest	
3	Daun teh	Poci
4	Bibit teh kombucha	
5	Agar	Mc Conkey
<b>Alat</b>		
No	Nama Alat	Sumber / Merk Type
1	Timbangan digital	AND® EK 2000i
2	Alat-alat gelas lab	Pyrex®
3	Propipet	
4	Kompor	
5	Cawan petri	
6	Oce	
7	LAF	

## **E. Cara Kerja**

### **1. Penyiapan Bahan**

Teh kombucha sebanyak 1 lembar dengan diameter 3 cm dipisahkan dengan air setarternya. Timbang gula putih 10 % (b/v) dari volume air, teh hitam sebanyak 0,5% (b/v) teh dan air 1 liter.

### **2. Kultur teh kombucha**

Tahap ini bertujuan unutupuk mengembangkan kultur teh kombucha yang akan diinokulasikan ke dalam medium fermentasi. Proses peremajaan kultur teh kombucha dilakukan dengan tahapan-tahapan, diantaranya adalah tahapan

persiapan medium, tahap inokulasi, tahap inkubasi (fermentasi). Tahap persiapan medium teh kombucha : aquadest dipanaskan dalam wadah kaca steril suhu 100 °C selama 10 menit, kemudian diukur volumenya sebanyak 1000 ml dan ditambahkan 0,5% (b/v) teh, kemudian ditambahkan gula pasir 10% (b/v) pada larutan yang sudah diseduh kemudian disaring. Medium didinginkan sampai suhu ruangan atau 27 °C. Tahap persiapan sebelum fermentasi. Tahap ini dilakukan dengan menambahkan *starter* kombucha dan kultur kombucha sebanyak 1 lembar kedalam seduhan medium yang ditempatkan kedalam wadah kaca yang sudah disterilkan dan tutup dengan kain kemudian diikat dengan karet gelang. Dan tahap inkubasi (fermentasi) : hasil peremajaan kultur teh kombucha difermentasi selama 12 hari dan disimpan pada suhu kamar.

### **3. Sterilisasi alat dan bahan**

Alat dan bahan yang akan digunakan harus dilakukan sterilisasi terlebih dahulu. Alat-alat yang berebahan gelas disterilisasinya dengan menggunakan oven pada suhu 170<sup>0</sup> selama 2 jam. Pinset disterilkan dengan menggunakan bunsen. Bahan-bahan seperti media Mac Conkey disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup>C selama 15 menit dan aquadest disterilkan dengan penangas hingga mendidih selama 15 menit. Sampel yang telah dibuat variasi konsentrasi, semua alat, dan bahan kecuali suspense bakteri sebelum melakukan pengujian harus disterilisasikan dengan menggunakan lampu UV selama 30 menit.

### **4. Pembuatan Kelompok Perlakuan dan Kontrol Positif**

Kontrol positif yang digunakan adalah siprofloksasin. Satu tablet siprofloksasin 500 mg memiliki total bobot seberat 731 mg, sehingga kadar siprofloksasin yang digunakan untuk pengujian sebesar 0.68 mg/mg serbuk. Bobot siprofloksasin pada 2 mg memiliki kadar sebesar 1,36 mg. Sebelum mendispersikan siprofloksasin terlebih dahulu mengembangkan PGA 2.5%, PGA yang telah dikembangkan dengan aquadest ditambahkan serbuk siprofloksasin 2 mg, diaduk hingga siprofloksasin homogen dan terdispersi dalam PGA, sehingga total kadar siprofloksasin sebesar 0,000544 %

##### **5. Penentuan Konsentrasi Diameter Zona Hambat (DZH)**

Siapkan sebanyak 4 buah tabung reaksi untuk *Staphylococcus aureus* dan diberi label, lalu dilakukan tahap kerja sebagai berikut:

- a. Seri konsentrasi 1% larutan teh kombucha didapatkan dari pengenceran 1 ml teh kombucha dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml. Larutan dimasukkan dalam tabung reaksi No. 1
- b. Seri konsentrasi 5% larutan teh kombucha didapatkan dari pengenceran 5 ml teh kombucha dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml. Larutan dimasukkan dalam tabung reaksi No. 2
- c. Seri konsentrasi 10% larutan teh kombucha didapatkan dari pengenceran 10 ml teh kombucha dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml. Larutan dimasukkan dalam tabung reaksi No. 3
- d. Seri konsentrasi 15% larutan teh kombucha didapatkan dari pengenceran 15 ml teh kombucha dilarutkan dalam aquadest hingga 100 ml. Larutan dimasukkan dalam tabung reaksi No. 4

- e. Seri kontrol positif dibuat dengan melarutkan sejumlah 1,36 mg tablet siprofloksasin dalam 250 ml aquadest dalam labu takar, sehingga diperoleh kadar 0,00544 mg/ml.

## **6. Pembuatan Media Agar**

Media agar yang digunakan berasal dari Mac Conkey. Sebanyak 20 g serbuk agar Mac Conkey dilarutkan dalam 385 ml aquadest. Selanjutnya dimasukkan ke dalam alat gelas dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit. Kemudian media Mac Conkey tersebut dituangkan pada 16 cawan petri dalam kondisi aseptik dalam *Laminar Air Flow* dan ditunggu hingga mengeras.

## **7. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus***

Biakan diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY. Bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 ose disuspensikan ke dalam 9 ml aquades steril, kemudian diencerkan dengan cara yang sama sampai kekeruhannya sama dengan kekeruhan larutan Mc Farland's 0,5 (10 sel/ ml).

## **8. Uji Daya Antibakteri**

Suspensi bakteri yang sudah disiapkan kemudian diusapkan pada cawan petri yang telah berisi media Mac Conkey dengan menggunakan kapas lidi steril dan merata. Selanjutnya *paper disk* direndam ke dalam larutan uji sesuai dengan masing-masing perlakuan. Khusus untuk kontrol positif diambil sebanyak 10µl dari larutan siprofloksasin yang telah diencerkan. *Paper disk* yang telah berisi masing-masing variasi konsentrasi teh kombucha dan kontrol positif kemudian

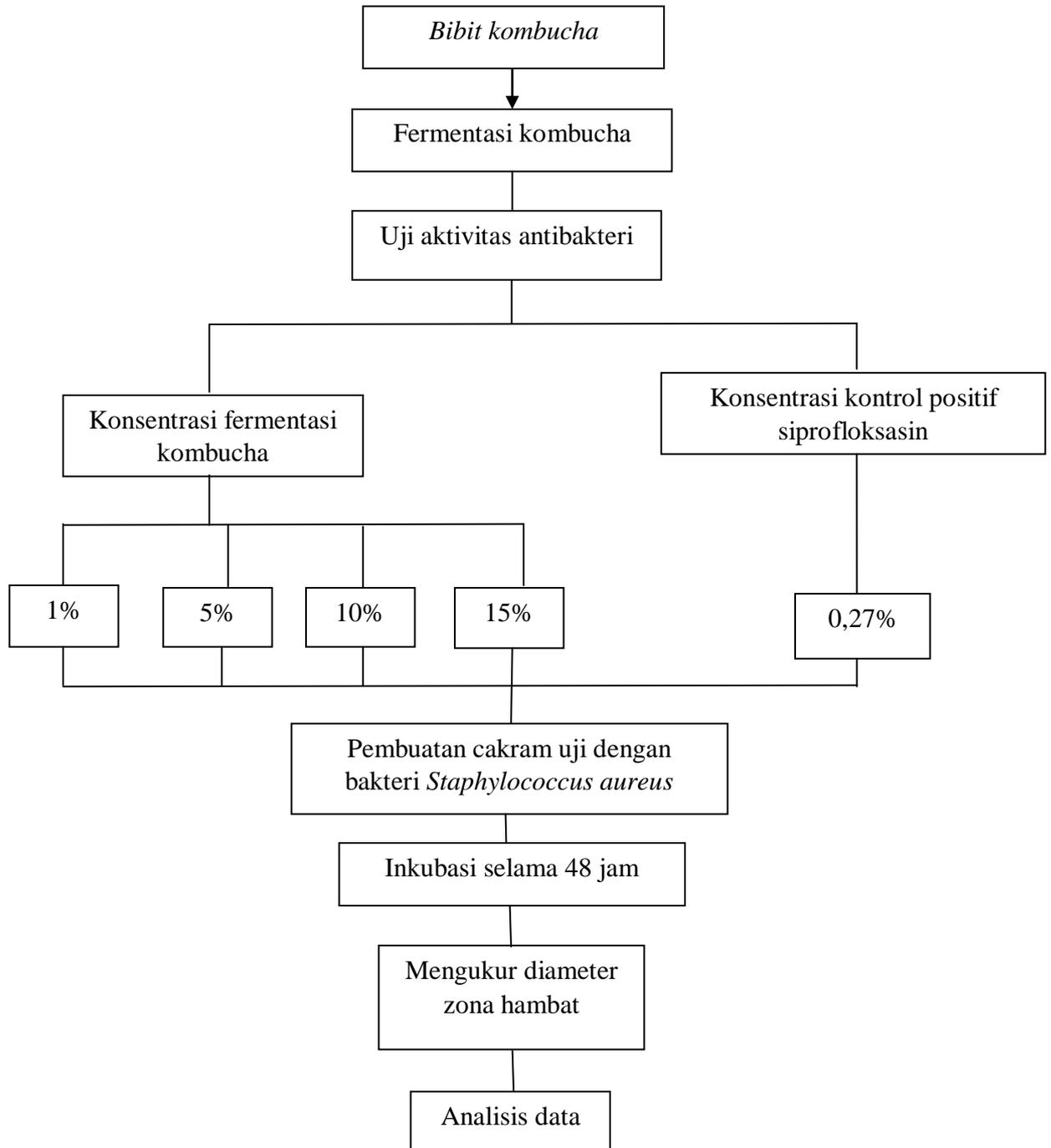
ditempelkan pada permukaan median agar. Perlakuan ini dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Setelah itu di inkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C selama 48 jam. Hasilnya dapat dilihat dengan terbentuknya diameter hambat secara radial (DZH) disekitar *paper disk* dan diukur dengan menggunakan jangka sorong/penggaris. Diameter hambat dari masing-masing larutan teh kombucha dengan variasi konsentrasi tersebut, selanjutnya dibandingkan dengan diameter hambat yang dihasilkan dari kontrol positif.

## **9. Pengamatan**

Pengamatan dilihat secara kuantitatif dengan mengukur diameter zona hambat media agar yang diletakan kertas cakram larutan teh kombucha. Pengukuran dilakukan setelah di inkubasi selama 48 jam menggunakan jangka sorong didaerah lingkaran bening. Pengukuran dilakukan dari beberapa sisi lingkaran kemudian dirata-ratakan. Apabila tidak terdapat lingkaran bening, maka larutan teh kombucha tidak memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*.

Data pengamatan seri konsntrasi diameter zona hambat yang didapatkan dianalisis menggunakan analisis staistik ANOVA dilanjutkan analisis *post hoc tukey* untuk mngetahui perbedaan antar kelompok dari seri kosentrasi. Analisis statistik *independent T test* dilakukan mengetahui perbedaan signifikan konsentrasi diameter zona hambat terbesar konsentrasi teh kombucha dengan konrol positif siprofloksasin.

## F. Skema Langkah Kerja Uji Anti Bakteri



Gambar 1. Skema Langkah Kerja