BAB III
METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada uji efektivitas dari ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*) terhadap pertumbuhan *Cutibacterium acnes* adalah penelitian eksperimental murni (*The Experimental Design*) laboratorium. Pada penelitian, antibakteri dari ekstrak daun teh (*C. sinensis*) dengan berbagai konsentrasi dan kurun waktu tertentu yang diujikan terhadap pertumbuhan *C. acnes*.

Untuk desain penelitian yang dilakukan adalah dengan menggunakan Perbandingan Kelompok Statis (*Static Gramoup Comparison*) yaitu menyeleksi dua kelas (kelas eksperimen dan kontrol) dalam penelitian. Dalam desain ini kelompok eksperimen menerima perlakuan yakni pemberian antibakteri ekstrak daun teh dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% serta lamanya waktu inkubasi dengan rentang 24 jam dan 48 jam. Hasil ini kemudian dibandingkan dengan kelompok kontrol yakni antibiotika kloramfenikol yang dilarutkan pada media Mueller Hinton Broth (MHB) berisi *C. acnes.*

Tabel 3.1 Desain Eksperimen

Kelompok	Perlakuan	Pengamatan
Eksperimen	1. Pemberian antibakteri ekstrak daun teh (*Camellia sinensis*) dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50% 2. Lamanya waktu inkubasi dengan rentang 24 jam dan 48 jam.	Diamati pertumbuhan bakteri pada media
Kontrol	Antibakteri kloramfenikol yang dilarutkan pada media MHB	Diamati kejernihan media MHB

3.1 Populasi dan Sampel

Populasi dari penelitian ini adalah daun teh hijau (*Camellia sinensis*) varietas sinensis yang didapat dari Desa Indragiri Kecamatan Rancabali Kabupaten Bandung.

Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak daun teh (*C. sinensis*) varietas sinensis sebagai antibakteri dengan variasi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%.

Sampel yang digunakan adalah ekstrak daun teh dan biakan bakteri *C. acnes*. Dengan jumlah unit eksperimennya diambil dari perhitungan rumus Federer (1991):

$$(t-1)(r-1) \geq 20$$
$$(12-1)(r-1) \geq 20$$
$$11(r-1) \geq 20$$

$$11r-11 \geq 20$$
$$11r \geq 31$$
$$r \geq 2{,}8$$
$$r \geq 3$$

Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medik Politeknik Kesehatan Bandung dalam waktu satu minggu.

3.3 Cara Pengumpulan Data

Data penelitian ini merupakan data primer. Data primer diperoleh melalui proses eksperimen laboratorium yaitu dengan melakukan inkubasi *C. acnes* pada media Muller Hinton Broth (MHB) dan Mueller Hinton Agar Darah (MHAD) yang telah diberi antibakteri dari ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) lalu diamati pertumbuhannya dalam rentang waktu yang telah ditentukan, selanjutnya dibandingkan dengan antibakteri kloramfenikol sebagai kontrol.

3.1 Alat, Bahan dan Cara Kerja

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain erlenmeyer, batang pengaduk, *hotplate*, cawan petri, tabung reaksi, gelas kimia, mikropipet, pipet volume, pipet tetes, inkubator, mikroskop, neraca analitik, autoklaf, oven, *rotary evaporator*, bunsen, ose, kertas saring, jangka sorong, penjepit tabung, pinset, rak tabung reaksi, spatula, *object glass*.

3.5.2 Bahan

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain daun teh, DMSO, media MHA, media MHB, 5-7% darah kambing, Etanol 70%, NaCl 0,9%, Kristal violet, lugol, alkohol 95%, safranin, kloramfenikol, H_2SO_4 1%.

3.5.3 Cara Kerja

3.5.3.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian harus disterilisasi agar terbebas dari mikroorganisme yang dapat menjadi kontaminan. Alat-alat dibungkus dengan kertas coklat, kemudian disterilisasi menggunakan oven pada suhu 180°C selama 60 menit. Media cair dan agar disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.5.3.2 Pembuatan Media

1) Pembuatan *Muller Hinton Agar* Darah (MHAD)
   (1) Sebanyak 38 gram media Muller Hinton Agar ditimbang lalu ditambahkan 1 liter aquadest gunakanan batang pengaduk untuk menghomogenkan larutan.
   (2) Larutan agar didihkan menggunakan *hot plate* sambal tetap diaduk.
   (3) Media disterilkan dalam autoklaf media pada suhu 121°C selama 15 menit.
   (4) Tunggu sampai suhu media hangat kuku 45°C-50°C.
   (5) Darah kambing sekitar 5-7% ditambahkan

(1) Sebanyak 20 ml media dituangkan kedalam cawan petri steril
(2) Media disimpan pada suhu 2°C-8°C.

1) Pembuatan *Muller Hinton Broth* (MHB)
   (1) Sebanyak 21 gram Muller Hinton Broth ditimbang lalu tambahkan 1 liter aquadest, gunakan batang mengaduk untuk menghomogenkan larutan.
   (2) Media dipanaskan hingga larut sambil diaduk sesekali.
   (3) 10 ml larutan media dituang kedalam tabung reaksi, tutup dengan kapas.
   (4) Media disterilkan dalam autoklaf media pada suhu 121°C selama 15 menit
   (5) Media disimpan pada suhu 2°C-8°C.

3.5.3.1 Pembuatan Antibakteri dari Ekstrak Daun Teh

1) Sebanyak 250 gram serbuk daun teh (*Camellia sinensis*) ditimbang
2) Serbuk daun the direndam dengan etanol 70%
3) Sesekali rendaman diaduk pada 6 jam pertama, kemudian diamkan selama 18 jam.
4) Maserat dipisahkan dengan cara filtrasi.
5) Penyaringan dilakukan menggunakan jumlah pelarut yang sama untuk mengulang proses filtrasi.
6) Semua maserat diuapkan menggunakan *rotatory evaporator* dengan suhu 50°C untuk diperoleh ekstrak kental. (depkes RI 2009)

3.5.3.2 Peremajaan Biakan Murni Bakteri *Cutibacterium acnes*

1) Biakan murni *C. acnes* diambil sebanyak satu ose.
2) Biakan murni digoreskan secara aseptik pada media *Blood Agar*.
3) Media *Blood Agar* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator.

3.5.3.3 Pewarnaan Gram

1) Apusan kultur dari bakteri dibuat pada *object glass*.
2) Preparat difiksasi diatas nyala api.
3) Preparat diwarnai dengan kristal violet selama 1 menit.

1) Preparat dicuci dengan air mengalir.
2) Preparat ditetesi lugol diamkan selama 1 menit.
3) Preparat dicuci dengan air mengalir.
4) Preparat ditetesi alkohol 95% selama 20 detik.
5) Preparat dicuci dengan air mengalir.
6) Preparat diwarnai dengan safranin selama 1 menit.
7) Preparat dicuci dengan air mengalir.
8) Preparat diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x gunakan minyak imersi.

3.5.3.1 Pembuatan Standar Kekeruhan McFarland 0,5

1) H2SO4 1% dipipet sebanyak 9,95 ml dan $BaCl_2$ 1% sebanyak 0,05 ml, dimasukkan kedalam tabung reaksi
2) Kedua larutan dicampurkan pada tabung tersebut, dikocok sampai homogen dan terbentuk larutan keruh
3) Larutan ini merupakan standar Mc Farland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri yang konsentrasinya $1,5x10^8$ CFU/ml dan digunakan sebagai pembanding suspense bakteri uji
4) Larutan Mc Farland 0,5 disimpan pada suhu 4°C-25°C dan terlindung dari cahaya matahari dengan *self life* selama 12 minggu.

3.5.3.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji yang Diencerkan

1) Bakteri yang akan diuji disuspensikan kedalam 10 ml NaCl 0,9%
2) Setarakan kekeruhan dengan larutan standar Mc Farland 0,5
3) Lima tabung berisi NaCl 0,9% sebanyak 9 ml disiapkan
4) Sebanyak 1 ml suspensi setara standar Mc Farland 0,5 diambil dan dimasukkan kedalam tabung pertama
5) Homogenkan
6) Sebanyak 1 ml suspensi dari tabung pertama diambil dan dimasukkan kedalam tabung kedua
7) Ulangi perlakuan diatas hingga tabung kelima, lalu homogenkan.
8) Maka didapat hasil pengenceran Mc Farland $0,5x10^{-5}$