

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain penelitian *true experiment*. Penelitian dilakukan di laboratorium, dengan cara memberikan perlakuan yaitu berbagai konsentrasi ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) dan kelompok kontrol/pembanding diuji kepada kelompok uji dengan metode difusi cakram (tes *Kirby-Bauer*) yang menggunakan media *Mueller Hinton Agar* (MHA), lalu hasil yang didapat dari kelompok uji dibandingkan. Konsentrasi ekstrak yang digunakan antara lain 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%, kelompok uji yang digunakan yaitu bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, kontrol positif menggunakan antibiotik siprofloksasin dan kontrol negatif dengan akuades.

III.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Waktu penelitian dilakukan pada bulan Maret-Juli 2017 dan tempat penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Pembangunan Nasional "Veteran" Jakarta.

III.3 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) yang diperoleh dari Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia dengan metode ekstraksi refluks dan menggunakan pelarut etanol 96%. Pelarut etanol 96% dipilih sebagai pelarut untuk melarutkan serbuk daun tembakau karena menurut Ramadhan & Phaza (2010, hlm.9), pelarut etanol termasuk pelarut bersifat polar yang bekerja dengan melarutkan senyawa yang sifatnya juga polar. Pelarut etanol juga ideal dan sering digunakan karena komposisinya yang terdiri dari alkohol atau campuran alkohol dengan air sehingga dapat

melarutkan hampir semua senyawa dengan berat molekul rendah seperti flavonoid.

III.4 Besar Sampel

Jumlah ulangan dari setiap kelompok perlakuan akan dihitung menggunakan rumus Federer. Kelompok perlakuan berjumlah lima variasi konsentrasi ekstrak (20%, 40%, 60%, 80% dan 100%), satu kelompok kontrol negatif (akuades) dan satu kelompok kontrol positif (antibiotik siprofloksasin).

Rumus Federer : $(n-1)(t-1) \geq 15$

Dengan : $t = \text{jumlah kelompok} = 7$ dan $n = \text{jumlah ulangan}$

$$(n-1)(7-1) \geq 15 \rightarrow 6n - 6 \geq 15 \rightarrow 6n \geq 21 \rightarrow n \geq 3,5$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 4 sediaan *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang telah dibiakkan bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 untuk setiap kelompok percobaan (Nazir 2004, hlm.45).

Pertimbangan pemilihan pelarut akuades dipilih sebagai kontrol negatif karena tidak memberikan daya hambat akuades terhadap bakteri uji, sifatnya stabil, tidak toksik, tidak mudah menguap serta mudah didapatkan (Prasetyo dkk. 2012, hlm.23). Dan siprofloksasin dipilih sebagai kontrol positif karena siprofloksasin merupakan antibiotik yang sensitif terhadap *P.aeruginosa* dan *E.coli* sehingga dapat menimbulkan daya hambat terhadap bakteri uji (Putri dkk. 2014, hlm.331; Kepel dkk. 2015, hlm.45). Menurut CLSI (2015), zona hambat yang dihasilkan antibiotik siprofloksasin terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Escherichia coli* terbagi menjadi tiga kategori. Siprofloksasin akan termasuk ke kategori sensitif atau *susceptible* (S) jika zona hambatnya lebih dari sama dengan 21 mm, kategori sedang atau *intermediate* (I) jika zona hambatnya 16-20 mm, dan kategori lemah atau *resistant* (R) jika zona hambatnya kurang dari sama dengan 15 mm.

III.5 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang diperlukan sebagai berikut:

- a. Ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)
- b. Suspensi *P.aeruginosa* ATCC 27853 yang dibiakkan di MHA

- c. Suspensi *E.coli* ATCC 25922 yang dibiakkan di MHA
- d. NaCl steril 0,9 % 10 ml
- e. BaCl₂ 1,175%
- f. H₂SO₄ 1%
- g. Akuades
- h. 0,5 McFarland
- i. Antibiotik siprofloksasin

III.6 Alat Penelitian

Dalam penelitian ini alat-alat yang diperlukan sebagai berikut:

- a. *Beaker glass* 10 ml
- b. Mikro pipet
- c. Sduit 3 cc
- d. Pinset
- e. *Tissue*
- f. *Handsoen*
- g. Tabung dan rak tabung reaksi
- h. Jangka sorong digital
- i. Kertas cakram
- j. Alat penyebar bakteri
- k. Alat pengaduk
- l. Cawan petri
- m. Bunsen
- n. *Autoclave*
- o. *Incubator*

III.7 Variabel Penelitian

III.7.1 Variabel Bebas

Pemberian ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dengan skala rasio, yaitu skala numerik yang bersifat kuantitatif, dapat diukur dan mempunyai nilai nol alami. Pertimbangan pemilihan konsentrasi ekstrak 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%

sebagai variabel bebas adalah karena pada konsentrasi tersebut menghasilkan daya antibakteri mengacu pada penelitian sebelumnya yang pernah dilakukan oleh Puspita (2011) yang berjudul 'Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tembakau Temanggung Varietas Genjah Kemloko' serta penelitian lainnya yang dilakukan oleh Putri dkk. (2014) yang berjudul 'Daya Hambat Ekstrak Daun Tembakau terhadap Pertumbuhan Mikroba Rongga Mulut'.

III.7.2 Variabel Tergantung

Pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 pada media MHA diukur dengan berbagai diameter zona hambat yang terbentuk dalam satuan milimeter. Skala ukurannya merupakan rasio.

III.7.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol terdiri dari suhu inkubasi 37°C dan waktu inkubasi 24 jam. Suhu inkubasi dikendalikan tetap 37°C dengan cara mengatur kontrol suhu pada inkubator hingga 37°C dan menutup pintu inkubator dengan rapat agar tidak menyebabkan perubahan suhu dalam ruang inkubator. Dan waktu inkubasi dikendalikan dengan cara meletakkan pertumbuhan bakteri uji yang telah diberikan perlakuan ke dalam inkubator yang disesuaikan dari permulaan waktu dimasukkannya ke dalam inkubator hingga keesokan harinya selama 18 sampai 24 jam.

III.8 Definisi Operasional

Tabel 3 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Pengaruh ekstrak daun tembakau sebagai antibakteri terhadap <i>P.aeruginosa</i>	Pengaruh sebagai antibakteri diukur dari zona hambat yaitu daerah sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri <i>P.aeruginosa</i>	Jangka sorong digital	Diameter zona hambat (milimeter)	Rasio
2	Pengaruh ekstrak daun tembakau sebagai antibakteri terhadap <i>E.coli</i>	Pengaruh sebagai antibakteri diukur dari zona hambat yaitu daerah sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri <i>E.coli</i>	Jangka sorong digital	Diameter zona hambat (milimeter)	Rasio
3	Ekstrak daun <i>Nicotiana tabacum L.</i>	Daun <i>Nicotiana tabacum L.</i> yang telah diekstrak dengan metode refluks	Spuit 5 cc	Konsentrasi ekstrak (%)	Rasio
4	Larutan Kontrol Negatif	Larutan kontrol yang berisi akuades	Spuit 5 cc	Konsentrasi larutan kontrol	Rasio
5	Larutan Kontrol Positif	Larutan kontrol yang berisi antibiotik siprofloksasin	Spuit 5 cc	Konsentrasi larutan kontrol	Rasio

III.9. Tahapan Penelitian

III.9.1. Pengumpulan Bahan Baku Ekstrak Daun *Nicotiana tabacum L.*

Berdasarkan hasil wawancara pada tanggal 25 Januari 2017, R. Ahmad Fauzantoro, ST, M.Si, Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman tembakau *Nicotiana tabacum L.* tipe Virginia yang diperoleh dari Ponorogo, Jawa Timur. Bagian pada tanaman tembakau yang digunakan dalam penelitian yaitu bagian daun tembakau.

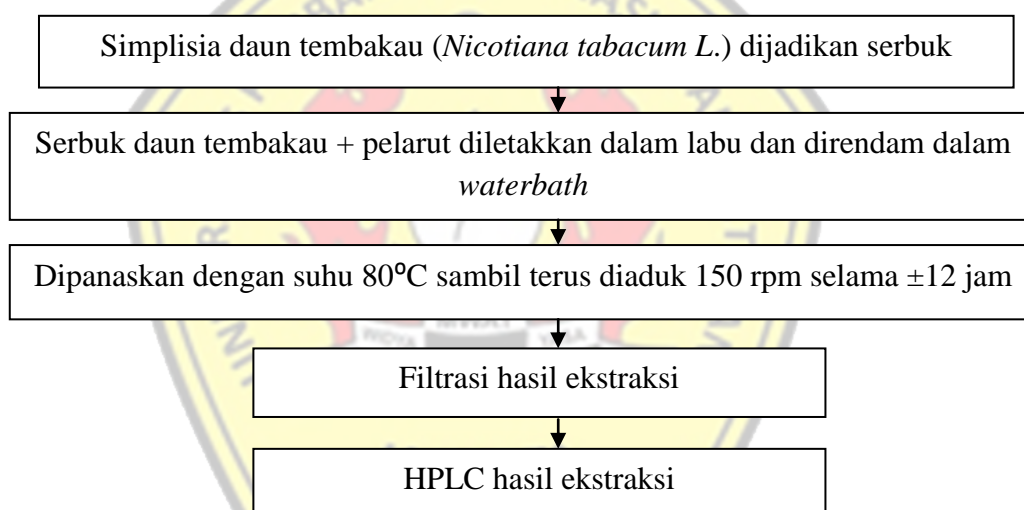
III.9.2 Pembuatan Simplisia

Berdasarkan hasil wawancara pada tanggal 25 Januari 2017, R. Ahmad Fauzantoro, ST, M.Si, Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, bahwa bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah simplisia daun tembakau *Nicotiana tabacum L.* Pada pembuatan simplisia, daun tembakau *Nicotiana tabacum L.* dibersihkan kemudian dicuci dengan air mengalir sampai bersih. Daun *Nicotiana tabacum L.* dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari. Selain dijemur, pengeringan juga dapat dilakukan dengan cara dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 120°C selama 2 jam. Selanjutnya simplisia tersebut dijadikan serbuk. Serbuk daun *Nicotiana tabacum L.* didapatkan dari hasil penggilingan dari simplisia yang kemudian diayak, sehingga diperoleh serbuk halus. Penggilingan simplisia daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) dapat dilakukan dengan menggunakan *grinder* atau *crusher*.

III.9.3 Ekstraksi Daun *Nicotiana tabacum L.*

Proses ekstraksi dilakukan di Universitas Indonesia dengan metode refluks. Pertimbangan pemilihan metode ekstraksi refluks pada penelitian ini karena *yield* atau hasil rendemen ekstrak daun tembakau yang diperoleh dari metode refluks ini adalah yang paling efektif dibandingkan dengan metode ekstraksi yang lain. Berdasarkan hasil wawancara pada tanggal 25 Januari 2017, R. Ahmad Fauzantoro, ST, M.Si, Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia, bahwa hasil rendemen ekstrak daun tembakau dapat mencapai 30%. Langkah ekstraksi bermula dari serbuk daun tembakau halus dilarutkan dengan 250 mL pelarut etanol 96%. Larutan ini ditempatkan di dalam labu yang dihubungkan dengan

kondensor *Allihn* dan dilakukan pemanasan sampai suhu 80°C. Larutan terus diaduk secara otomatis oleh *hotplate stirrer* 150 rpm selama ± 12 jam. Labu yang berisi serbuk daun tembakau dan pelarut direndam dalam *water bath* agar proses pemanasan berlangsung merata. Pada sisi kondensor *Allihn* terdapat selang yang menghubungkan antara kondensor dengan pendingin (*chiller*) bersuhu 4°C, sehingga dapat terjadi proses kondensasi. Uap yang terbentuk akibat pemanasan akan mengalami kondensasi dan kembali ke dalam labu, sedangkan destilat terpisah sebagai bagian yang tidak bercampur bersama uap tersebut dan akan ditampung dalam wadah lain yang terhubung dengan kondensor. Zat-zat yang terkandung dalam uap yang mengalami kondensasi kemudian akan di analisis melalui sistem *High Performance Liquid Chromatography* atau HPLC.



Bagan 3 Pembuatan Ekstrak Daun Tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)

III.10 Cara dan Prosedur Penelitian

III.10.1 Pengukuran Aktivitas Antibakteri

Metode uji antibakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi cakram (tes *Kirby-Bauer*). Pertimbangan pemilihan metode difusi cakram dalam penelitian ini karena mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus sehingga kontaminasi yang ditimbulkan minimal, lebih praktis dan relatif murah (Prayoga, 2013, hlm.9). Kertas cakram saring berisi ekstrak daun tembakau ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi

bakteri uji pada permukaannya. Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram untuk mengukur kekuatan hambatan terhadap organisme uji (Hudzicki 2009, hlm.1-3).

III.10.2 Persiapan Penelitian

III.10.2.1. Sterilisasi Alat

Alat-alat disterilkan dengan menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 15 Psi selama 15–20 menit. Alat-alat yang sudah disterilkan kemudian didinginkan sehingga mencapai suhu kamar dan kering (Hudzicki 2009, hlm.4).

III.10.2.2. Pembuatan Media dan Larutan Pereaksi

Pembuatan media agar dan larutan pereaksi dalam penelitian adalah sebagai berikut:

a. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA dipilih sebagai media uji antibakteri dalam penelitian ini karena merupakan media universal yang baik dalam mendukung pertumbuhan kebanyakan bakteri patogen, serta media ini juga sering digunakan oleh kebanyakan peneliti dalam penelitian untuk uji kepekaan bakteri. Sebanyak 5,7 gram *Mueller Hinton Agar* (MHA) dilarutkan dengan 150 ml akuades, dipanaskan hingga mendidih sambil diaduk. Lalu ditutup dengan kapas dan disterilisasi di dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit (Hudzicki 2009, hlm.4).

b. Suspensi Standar 0,5 McFarland

Sebanyak 0,5 ml BaCl₂ 1,175% dicampurkan dengan 99,5 ml H₂SO₄ 1% didalam tabung reaksi, setelah itu dihomogenkan (Hudzicki 2009, hlm.5).

III.10.2.3. Pembuatan Suspensi Bakteri *P.aeruginosa* dan *E.coli*

Disediakan 10 ml NaCl 0,9% steril masing-masing didalam tabung reaksi. Lalu disuspensikan bakteri *P.aeruginosa* dan *E.coli* dengan menggunakan jarum ose dari biakan MHA kedalam NaCl 0,9% steril sampai kekeruhannya sama

dengan suspensi standar yaitu 0,5 McFarland, maka konsentrasi bakteri adalah 10^8 koloni/ml (Hudzicki 2009, hlm.6).

III.10.2.4. Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol yang digunakan dalam eksperimen ini adalah larutan akuades sebagai kontrol negatif dan antibiotik siprofloksasin sebagai kontrol positif. Alasan dipilihnya larutan akuades sebagai kontrol negatif adalah karena tidak memberikan daya hambat akuades terhadap bakteri uji, sifatnya stabil, tidak toksik, tidak mudah menguap serta mudah didapatkan. Sedangkan siprofloksasin dipilih sebagai kontrol positif karena siprofloksasin merupakan antibiotik yang sensitif terhadap *P.aeruginosa* dan *E.coli* sehingga dapat menimbulkan daya hambat terhadap bakteri uji (Putri dkk. 2014, hlm.331; Kepel dkk. 2015, hlm.45).

III.10.2.5. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun *Nicotiana tabacum* L. dengan Akuades

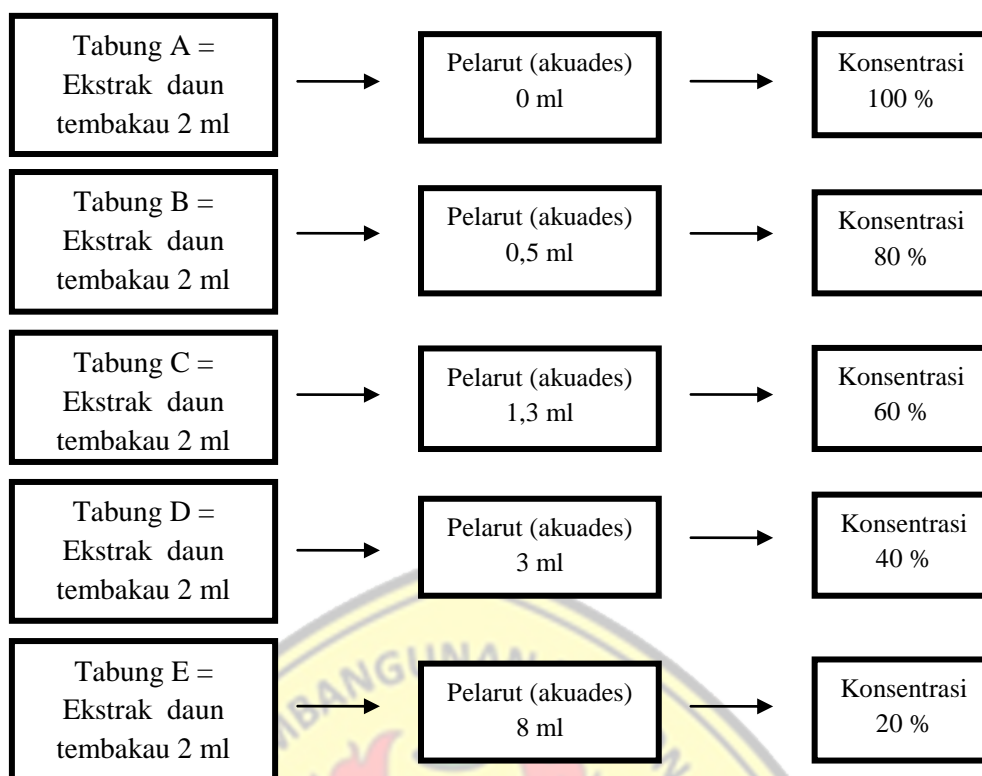
Disiapkan lima buah *beaker glass* yang akan digunakan untuk menampung konsentrasi ekstrak yang akan diuji dan diberi label konsentrasi ekstrak daun tembakau 20%, 40%, 60%, 60%, 80% dan 100%. Akuades steril disiapkan sebagai pelarut dan sebagai kontrol negatif. Ditetapkan kebutuhan ekstrak untuk masing-masing konsentrasi adalah 2 ml, selanjutnya ditambahkan akuades yang jumlahnya disesuaikan dengan konsentrasi-konsentrasi ekstrak yang diperlukan sesuai dengan penghitungan rumus pengenceran $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$. Dengan keterangan sebagai berikut (Rusman & Mukhlis 2010, hlm.34).

V_1 = volume larutan standar yang diencerkan

V_2 = volume larutan pengenceran

N_1 = konsentrasi larutan yang diencerkan

N_2 = konsentrasi larutan pengenceran



Sumber: Rusman & Mukhlis 2010, hlm.34

Bagan 4 Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau

III.10.2.6. Uji Antibakteri Ekstrak Daun *Nicotiana tabacum* L. Terhadap *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 Secara *In Vitro* Dengan Metode Difusi

Identifikasi dan pembuatan suspensi bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UPN "Veteran" Jakarta. Adapun prosedurnya sebagai berikut:

- Persiapan alat yang telah disterilisasi serta persiapan bahan yang telah disesuaikan konsentrasinya.
- Pembuatan konsentrasi ekstrak daun tembakau yang akan digunakan dan larutan kontrol sebagai pembanding, yakni larutan yang dipakai sebagai kontrol negatif adalah akuades dan kontrol positif adalah antibiotik siprofloksasin. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah disterilisasi dimasukkan kedalam larutan kontrol negatif (akuades), larutan kontrol positif (antibiotik siprofloksasin) dan ekstrak daun

- tembakau dengan menggunakan pinset steril, lalu direndam selama 30 menit hingga larutan tersebut terhisap sempurna oleh kertas cakram.
- c. Pembuatan suspensi bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 dengan larutan NaCl 0,9% hingga terbentuk kekeruhan yang mencapai standar 0,5 McFarland.
 - d. Menyebarkan bakteri di permukaan medium MHA dengan menggunakan alat penyebar bakteri dan kemudian diratakan.
 - e. Kertas cakram dalam larutan kontrol negatif (akuades), larutan kontrol positif (antibiotik siprofloksasin) dan larutan ekstrak daun tembakau diambil dengan menggunakan pinset steril kemudian disusun pada medium MHA yang sebelumnya telah ditanami bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan *E.coli* ATCC 25922 di cawan petri.
 - f. Kemudian semua medium MHA yang telah disusun kertas cakram dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 - g. Medium MHA yang telah diinkubasi diamati apakah terbentuk zona hambat di sekeliling kertas cakram.
 - h. Diameter zona hambat yang terbentuk akan diukur dengan menggunakan jangka sorong digital. Zona hambat diukur dari tepi ke tepi melewati kertas cakram. Lalu dilakukan percobaan sebanyak $\geq 3,5$ kali (4 kali).

III.11 Pengolahan dan Analisis Data

Metode yang dipakai dalam pengolahan data penelitian ini adalah metode analitik karena mencari pengaruh antara variabel independen dengan variabel dependen. Penelitian ini menggunakan dua variabel dependen yakni zona hambat pertumbuhan *P.aeruginosa* ATCC 27853 dan zona hambat pertumbuhan *E.coli* ATCC 25922 sehingga masuk ke dalam kategori analitik bivariat. Uji yang digunakan adalah uji *One-Way ANOVA* (uji parametrik) karena pada penelitian ini ingin mengetahui pengaruh ekstrak tembakau terhadap bakteri uji yang masuk ke dalam hipotesis komparatif, jenis data numerik, data lebih dari dua kelompok dan tidak berpasangan. Data yang dipakai harus memenuhi syarat untuk uji *One-Way ANOVA* yakni distribusi data harus normal dan varians data harus sama. Untuk

memenuhi persyaratan uji *One-Way ANOVA*, dilakukan uji normalitas data dan uji homogenitas varians. Pengolahan data dilakukan dengan memasukkan 7 kelompok data yaitu data zona hambat oleh ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% serta kontrol negatif (akuades) dan kontrol positif (antibiotik siprofloksasin) pada masing-masing bakteri uji. Pada penelitian ini menggunakan sampel penelitian sebanyak 28 sampel untuk masing-masing bakteri uji, sehingga digunakan uji normalitas data *Saphiro-Wilk*, sedangkan uji homogenitas varians menggunakan *Levene's test*.

Apabila hasil kedua uji tersebut menunjukkan nilai signifikansi lebih dari 0,05 atau $p > 0,05$, maka data tersebut berdistribusi normal dan bervarians data sama sehingga uji *One-Way ANOVA* dapat dilakukan. Kemudian jika uji *One-Way ANOVA* menghasilkan nilai $p < 0,05$ dilakukan uji analisis *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna. Jika uji *One-Way ANOVA* tidak memenuhi syarat, maka diupayakan transformasi data agar distribusi data menjadi normal dan varians data menjadi sama. Namun, apabila distribusi data tetap tidak normal dan varians data tetap tidak homogen maka digunakan uji alternatif *Kruskal-Wallis* (non-parametrik). Kemudian jika uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$ dilakukan uji analisis *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna (Dahlan 2011, hlm.88).