

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah studi eksperimen dengan desain eksperimental laboratorium. Perlakuan dengan uji daya hambat antibakteri ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) pada konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%) terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. faecalis* kepada beberapa kelompok konsentrasi, kemudian hasil dibandingkan dengan kelompok kontrol pembandingnya.

III.2 Waktu dan Tempat

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

III.3 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) yang diperoleh dari Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia. Proses pembuatan ekstrak daun tembakau dengan metode refluks dan menggunakan pelarut etanol 96 %.

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 sefadroksil).

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

Dengan : t = jumlah kelompok = 7 dan n = jumlah ulangan

$$(n-1)(7-1) \geq 15 \rightarrow 6n - 6 \geq 15 \rightarrow 6n \geq 21 \rightarrow n \geq 3.5 \rightarrow n \approx 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel minimal yang diperlukan adalah 4 sediaan Mueller Hinton Agar (MHA) yang telah dibiakkan bakteri *S. aureus* dan *E. faecalis* untuk setiap kelompok percobaan (Nazir 2004, hlm.45).

III.5 Bahan Penelitian

Dalam penelitian ini bahan-bahan yang diperlukan sebagai berikut:

- a. Ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*)
- b. Suspensi *S. aureus* ATCC 25923 yang dibiakkan di MHA
- c. Suspensi *E. faecalis* ATCC 29212 yang dibiakkan di MHA
- d. Agar darah
- e. NaCl steril 0,9 % 10 ml
- f. H₂SO₄ 1%
- g. BaCl₂ 1,175%
- h. Aquades
- i. 0,5 McFarland
- j. Antibiotik sefadroksil

III.6 Alat Penelitian

Dalam penelitian ini alat-alat yang diperlukan sebagai berikut:

- a. *Beaker glass*
- b. *Mikropipet*
- c. Spuit 3 cc
- d. Pinset
- e. *Tissue*
- f. *Handschoen*
- 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.

III.7.2 Variabel Kontrol

Pemberian aquades sebagai kontrol negatif dan antibiotik sefadroksil sebagai kontrol positif.

III.7.3 Variabel Tergantung

Pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. faecalis* pada media MHA diukur dengan berbagai diameter zona hambat yang terbentuk dalam satuan millimeter. Skala ukurannya merupakan rasio.

III.7.4 Variabel Perancu Terkendali

Variabel perancu terkendali terdiri dari suhu inkubasi 37°C, waktu inkubasi, kepekatan bakteri 0,5 Mc Farland.

III.8 Definisi Operasional

Tabel 2 Definisi Operasional

| No. | Variabel | Definisi Operasional | Alat Ukur | Hasil Ukur | Skala Ukur |
|-----|---|--|-----------------------|-----------------------------------|------------|
| 1. | Daya hambat antibakteri terhadap <i>S. aureus</i> | Daya hambat diukur dari zona hambat yaitu daerah sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri <i>S.aureus</i> | Jangka sorong digital | Diameter zona hambat (millimeter) | Rasio |
| 2. | Daya hambat antibakteri terhadap <i>E. faecalis</i> | Daya hambat diukur dari zona hambat yaitu daerah sekeliling kertas cakram yang tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri <i>E. faecalis</i> | Jangka sorong digital | Diameter zona hambat (millimeter) | Rasio |
| 3. | Ekstrak daun tembakau (<i>Nicotiana tabacum L.</i>) | <i>Nicotiana tabacum L.</i> yang telah diekstrak dengan metode refluks | Mikropipet | Konsentrasi ekstrak % | Rasio |

III.9 Cara dan Prosedur Penelitian

III.9.1 Pembuatan Ekstraks Daun Tembakau

Proses ekstraksi dilakukan di Departemen Teknik Kimia Universitas Indonesia. Tanaman yang digunakan dalam penelitian adalah tanaman tembakau *Nicotiana tabacum L.* tipe Virginia yang diperoleh dari Ponorogo, Jawa Timur. Bagian yang digunakan dalam penelitian yaitu bagian daun tembakau. Penelitian ekstrak daun tembakau ini menggunakan metode ekstraksi refluks karena *yield* atau hasil rendemen ekstrak daun tembakau yang dihasilkan paling besar 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-langkah metode ekstraksi refluks diawali dengan menyiapkan daun tembakau yang dicuci terlebih dahulu, kemudian dikeringkan dengan cara dijemur dibawah sinar matahari atau dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 120°C selama 2 jam. Selanjutnya daun tembakau kering tersebut dilakukan penggilingan dengan menggunakan *grinder* atau *crusher*, sehingga diperoleh serbuk halus. Serbuk halus tersebut 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 tersebut diaduk secara otomatis dengan *hotplate stirrer* 150 rpm yang direndam dalam *water bath* agar proses pemanasan merata. 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. Proses kondensasi terjadi karena terdapat selang yang menghubungkan kondensor *Allihn* dengan pendingin (*chiller*) bersuhu 4°C. Hasil rendemen tersebut difiltrasi, kemudian dipekatkan dengan labu rotavapor sehingga terbentuk ekstrak kental daun tembakau. Ekstrak kental daun tembakau yang telah didapatkan dilakukan analisis melalui sistem *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC).

III.9.2 Pengukuran Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini metode yang digunakan adalah metode difusi cakram. Kertas cakram saring berisi ekstrak daun tembakau ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah itu dilakukan inkubasi selama 24 jam, kemudian diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram untuk mengukur kekuatan hambatan terhadap organisme uji (Hudzicki 2009, hlm.1-3).

III.10 Persiapan Penelitian

a. 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).

b. Peremajaan bakteri

Bakteri uji dilakukan kultur ulang terlebih dahulu, sebelum membuat larutan suspensi bakteri. *S.aureus* ditumbuhkan pada medium *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Hudzicki 2009, hlm.4) dan *E.faecalis* pada medium *Agar Darah* (Buxton 2005, hlm.7) dengan cara menggoreskan masing-masing bakteri dari biakan murni menggunakan jarum ose pada masing-masing cawan petri yang telah diisi media kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

c. Pembuatan Media dan Larutan Pereaksi

1) Media Mueller Hinton Agar (MHA)

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).

2) Larutan Kontrol

Larutan kontrol yang digunakan dalam eksperimen ini adalah larutan akuades sebagai kontrol negatif dan antibiotik sefadroksil sebagai kontrol positif. Alasan dipilihnya larutan akuades sebagai kontrol negatif adalah tidak adanya daya hambat terhadap bakteri uji. Sedangkan sefadroksil sebagai kontrol positif oleh karena merupakan antibiotik spektrum luas.

d. Suspensi Standar 0,5 McFarland

Sebanyak 0,5 ml $BaCl_2$ 1,175% dicampurkan dengan 99,5 ml H_2SO_4 1% didalam tabung reaksi, setelah itu dihomogenkan (Hudzicki 2009, hlm.5).

e. Pembuatan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan mempersiapkan larutan 10 ml NaCl 0,9% steril didalam tabung reaksi. Lalu disuspensikan bakteri *S. aureus* dan *E. faecalis* yang telah dikultur ulang dengan menggunakan jarum ose dari biakan agar 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).

f. Pembuatan Variasi Konsentrasi Ekstrak Daun Tembakau

Lima buah *beaker glass* disiapkan untuk menampung konsentrasi ekstrak 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

g. Uji daya hambat antibakteri ekstrak daun tembakau terhadap *S. Aureus* dan *E. faecalis* secara *In Vitro* dengan metode difusi cakram.

a) Persiapan alat yang telah disterilisasi serta persiapan bahan yang telah disesuaikan konsentrasinya.

b) Pembuatan konsentrasi ekstrak daun tembakau yang akan digunakan dan larutan kontrol sebagai pembanding, dimana larutan yang dipakai sebagai kontrol negatif adalah akuades dan kontrol positif adalah antibiotik sefadroksil. Kertas cakram dengan diameter 6 mm yang telah disterilisasi dimasukkan kedalam larutan kontrol negatif (akuades), larutan kontrol positif (antibiotik sefadroksil) 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 *S. aureus* dan *E. faecalis* 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 sefadroksil) dan larutan ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) diambil dengan menggunakan pinset steril kemudian disusun pada medium MHA yang sebelumnya telah ditanami bakteri *S. aureus* dan *E. faecalis* di cawan petri.
- f) Kemudian semua medium MHA yang telah disusun kertas cakram dibungkus dengan aluminium foil, lalu dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- g) Medium MHA yang telah diinkubasi diamati apakah terbentuk zona hambat disekeliling 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 ≥ 4 kali.

III.11 Pengolahan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan uji *Kruskal-Wallis* (uji non parametrik) yaitu untuk mengetahui efektivitas daya hambat ekstrak daun tembakau terhadap bakteri uji yang termasuk dalam hipotesis komparatif, jenis data numerik, data lebih dari dua kelompok dan tidak berpasangan. Uji *Kruskal-Wallis* digunakan apabila data tidak berdistribusi normal atau varians data tidak sama. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah 28 sampel pada masing-masing bakteri uji yang dimasukkan dengan 7 kelompok data untuk mengetahui zona hambat yaitu ekstrak daun tembakau (*Nicotiana tabacum L.*) konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100% serta kontrol negatif (akuades) dan kontrol positif (antibiotik sefadroksil). Uji normalitas data yang digunakan adalah uji *Saphiro-Wilk* karena sampel kurang dari 50, sedangkan uji homogenitas varians menggunakan *Levene's test*.

Jika hasil penelitian yang didapatkan data berdistribusi normal dan varians data sama yang menunjukkan nilai signifikansi lebih dari 0,05 atau $p > 0,05$, maka dapat dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Apabila syarat uji *One-Way*

ANOVA tidak terpenuhi yaitu data tetap tidak berdistribusi normal atau varians data tetap tidak sama setelah dilakukan uji transformasi yang menunjukkan nilai signifikansi kurang dari 0,05 atau $p < 0,05$, maka dapat dilanjutkan dengan Uji *Kruskal-Wallis* (uji non parametrik). Jika uji *Kruskal-Wallis* menghasilkan nilai $p < 0,05$, maka selanjutnya dilakukan uji analisis *Post Hoc* untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna (Dahlan 2011, hlm.88).

