

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental laboratorium. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) dimaserasi dengan etanol 70%. Hasil ekstraksi difraksinasi menggunakan pelarut etanol-air. Fraksi etanol-air yang didapat selanjutnya dipekatkan dan hasilnya digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode difusi untuk mengetahui daya hambat fraksi etanol-air daun pepaya. Kloramfenikol 30 µg digunakan sebagai kontrol positif.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kesehatan Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta.

2. Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan April-Juni 2021.

C. Populasi dan Sampel Penelitian

1. Populasi

Populasi penelitian ini adalah daun pepaya (*Carica papaya* L.) warna hijau tua yang masih segar, bagus dan utuh yang diambil dari desa Tajeman, Palbapang, Bantul. Daun pepaya dipanen pada bulan Maret 2021.

2. Sampel

Sampel yang digunakan adalah fraksi etanol-air dari ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 3 gram.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas: seri konsentrasi fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya.
2. Variabel terikat: diameter zona hambat.
3. Variabel terkontrol: pelarut ekstraksi.

E. Definisi Operasional

1. Fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya dibuat seri konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 30% dari larutan stok 100%.
2. Dilakukan uji aktivitas antibakteri pada kontrol positif, kontrol negatif, konsentrasi 10%, konsentrasi 15%, konsentrasi 20%, konsentrasi 25%, konsentrasi 30% dan konsentrasi 100% fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya kemudian diukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong.
3. Pemilihan pelarut berdasarkan prinsip *like dissolves like*. Senyawa akan larut pada pelarut yang memiliki tingkat kepolaran yang sama pula. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol, dipilih karena merupakan pelarut universal yang dapat melarutkan senyawa baik non polar maupun polar.

F. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan meliputi neraca analitik (Ohaus), *autoclave* (Gea LS-B 50L), inkubator (Mettler IN30), oven (Mettler UN160), *waterbath* (Mettler), *BSC* (Daihan Labtech), *Binocular Microscope* (Olympus CX23), *UV Viewing Cabinet* 254 nm dan 366 nm (UvOC-02), *hotplate magnetic stirrer* (IKA HS-7), kompor listrik (Maspion), wajan, pengaduk kayu, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, pinset, batang L, pipet ukur, propipet, mikropipet 100-1000 μ L, *beaker glass*, gelas ukur, erlenmeyer, labu takar 5 mL, bunsen, *magnetic stirrer*, corong pisah, bejana KLT.

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi daun pepaya, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Biologi UGM, etanol 70% teknis, etanol p.a (Merck KGaA), akuades steril, N-heksana p.a (Merck KGaA), kloroform p.a (Merck KGaA), methanol p.a (Merck KGaA), media Nutrient agar (Merck KGaA), media Mueller-Hinton agar (Merck KGaA), *blank paper disk* (Oxoid), *disk* kloramfenikol 30 mcg (Oxoid), standard kuersetin (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), NaCl fisiologis, HCl p.a (Mallinckrodt), FeCl₃ (Merck KGaA), AlCl₃ (Merck KGaA), reagen Dragendorf (Mediss), reagen Mayer (Mediss), reagen Wagner (Mediss), Cat gram (Mediss), *object glass*, *cover glass*, plat silika gel 60 (Merck KGaA).

G. Pelaksanaan Penelitian

1. Determinasi Tanaman

Daun pepaya dideterminasi di Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, dengan tujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan sesuai dengan yang diinginkan yakni daun pepaya (*Carica papaya* L.).

2. Persiapan Sampel

a. Pembuatan Simplisia

Daun pepaya sebanyak 1,5 kg dicuci bersih dengan air mengalir dan dipotong kecil-kecil. Daun tersebut dipindahkan pada wadah yang sudah diberi alas kertas lalu dijemur di bawah sinar matahari dengan ditutup menggunakan kain hitam hingga kering. Daun pepaya yang sudah kering selanjutnya dihaluskan hingga berbentuk serbuk dan ditimbang sebanyak 300 gram. Daun pepaya siap untuk diekstraksi.

b. Pembuatan Ekstrak dan Fraksinasi

Simplisia daun pepaya direndam dengan pelarut etanol 70% sebanyak 3 L dalam bejana selama 3 hari sambil diaduk setiap 6 jam. Bejana disimpan di tempat yang terlindung dari sinar matahari. Hasil maserasi yang terbentuk disaring, untuk memisahkan antara residu dan filtrat. Residu diremaserasi satu kali dengan pelarut etanol 70% 3 L selama 2 hari. Filtrat dari hasil maserasi dan remaserasi digabung untuk dipekatkan hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang didapat kemudian dihitung rendemennya dan dinyatakan dalam persen (%) (Karisma, 2019).

Fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut etanol dan air perbandingan 4:1. Ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 5 gram dilarutkan dalam air yang telah dipanaskan pada suhu 80°C sebanyak 10 mL, ditambahkan etanol sebanyak 40 mL dan dimasukkan dalam corong pisah. Ditambahkan 50 mL n-heksan lalu dikocok secara perlahan. Campuran dalam corong pisah didiamkan hingga terbentuk dua lapisan yakni fraksi air dan fraksi n-heksan. Fase etanol-air yang berada di lapisan bawah dipisahkan dari fase n-heksan. Fase etanol-air dimasukkan lagi dalam corong pisah dan ditambahkan dengan n-heksan yang baru sebanyak 50 mL. Prosedur ini dilakukan sebanyak tiga kali. Fraksi etanol-air yang telah diperoleh dipekatkan diatas *waterbath* suhu 50°C.

3. Kontrol Kualitas

a. Uji Organoleptik

Uji organoleptik dilakukan dengan mengamati ekstrak etanol dan fraksi etanol-air dari daun pepaya terhadap bentuk, warna, bau dan rasa.

b. Skrining Fitokimia

Uji kandungan saponin dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak etanol dan 1 mL fraksi etanol-air daun pepaya ditambahkan 5 mL air panas kemudian dikocok selama 1 menit. Apabila timbul buih dapat ditambahkan HCl 1% dan ditunggu selama 10 menit, apabila buih tetap ada maka positif mengandung saponin (Latifah, 2008).

Uji kandungan flavonoid dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak etanol dan 1 mL fraksi etanol-air daun pepaya ditambahkan 1-2 mL air panas, ditambahkan sedikit serbuk magnesium, lalu dikocok sampai tercampur homogen. Menambahkan 4-5 tetes HCl 37% dan 4-5 tetes etanol lalu dikocok homogen. Apabila timbul warna merah, kuning atau jingga maka positif mengandung flavonoid (Latifah, 2008).

Uji kandungan tanin dilakukan dengan cara 0,5 gram ekstrak etanol dan 1 mL fraksi etanol-air daun pepaya ditambahkan 1-2 mL air panas, dan 2 tetes FeCl 1%. Apabila menghasilkan warna biru tua, biru kehitaman atau hijau kehitaman maka positif mengandung tanin (Latifah, 2008).

Uji kandungan alkaloid dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 gram ekstrak etanol dan 1 mL fraksi etanol-air daun pepaya masing-masing dalam 2 mL HCl 2% dan dibagi menjadi tiga bagian dalam tabung reaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes reagen Dragendorf. Tabung kedua ditambahkan 3 tetes reagen Mayer. Tabung ketiga ditambahkan 3 tetes reagen Wagner. Adanya endapan coklat jingga pada tabung pertama, endapan putih pada tabung kedua dan endapan merah kecoklatan menandakan positif mengandung alkaloid.

c. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak etanol dan fraksi etanol-air dari daun pepaya dianalisis dengan metode KLT menggunakan fase diam plat

silika gel 60 dan dielusi dengan fase gerak kloroform:metanol (9:1). Plat KLT disemprot dengan pereaksi AlCl_3 untuk deteksi flavonoid. Plat KLT diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm (Raaman, 2015).

4. Uji Aktivitas Antibakteri

a. Sterilisasi Alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih dan dikeringkan, sebelum dibungkus menggunakan kertas payung alat disemprot dengan alkohol 70%. Alat tersebut disterilkan dengan oven selama 1 jam pada suhu 171°C . Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan pada api bunsen.

b. Pembuatan Media

1) Nutrient Agar untuk Peremajaan Bakteri

Nutrient agar sebanyak 20 gram dilarutkan dalam 1000 mL akuades dalam tabung erlenmeyer kemudian dipanaskan sambil diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer*. Media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit tekanan 1 atm. Media dituang ke dalam tabung reaksi steril dalam BSC, selanjutnya mulut tabung disumbat dengan kapas dan media dibiarkan hingga memadat.

2) Mueller-Hinton Agar untuk Uji Aktivitas Antibakteri

Sebanyak 34 gram Mueller-Hinton agar dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades steril sebanyak 1000 mL. Mueller-Hinton agar dipanaskan sambil diaduk dengan bantuan *magnetic stirrer* sampai bahan larut sempurna. Kemudian media disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Media dituang dalam cawan petri yang sudah disterilkan dalam BSC dan dibiarkan hingga media memadat.

c. Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diremajakan kembali pada media Nutrient Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Biakan bakteri diambil sebanyak 1-2 ose dan disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% sebanyak 9 mL sampai diperoleh kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 Mc Farland atau sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

d. Pembuatan Larutan *Mc Farland*

H₂SO₄ 1% sebanyak 9,95 mL dicampurkan dengan 0,05 mL barium klorida 1%. Perbandingan dengan larutan standar bertujuan untuk memperkirakan kepadatan sel dan menggantikan perhitungan bakteri satu per satu. Larutan baku 0,5 *Mc Farland* sebanding dengan suspensi sel bakteri dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Anonim, 2014).

e. Pewarnaan Gram Bakteri

Preparat yang berisi bakteri diberi larutan kristal violet dan dibiarkan selama 20 detik. Preparat selanjutnya dibilas menggunakan akuades dan dibilas lagi menggunakan larutan iodin, dibiarkan selama 30 detik. Dilakukan dekolorisasi menggunakan alkohol 95% selama 10-20 detik dan dibilas menggunakan akuades. Preparat diberi larutan safranin selama 20 detik dan dibilas menggunakan akuades. *Object glass* dibiarkan mengering lalu dilakukan pengamatan di bawah mikroskop (Benson, 2001).

f. Pembuatan Seri Konsentrasi Fraksi Uji

Fraksi etanol-air ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 3 gram dilarutkan dengan akuades sebanyak 3 mL untuk mendapatkan konsentrasi 100%. Selanjutnya dibuat seri konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25% dan 30% dalam 2 mL akuades

menggunakan rumus pengenceran $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ (Nor et al., 2018).

g. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Bakteri uji sebanyak 0,1 mL diinokulasikan ke atas media Mueller-Hinton agar plate dan diratakan dengan batang L. Kemudian *paper disk* dicelupkan secara aseptik pada larutan sampel hingga seluruh permukaan cakram basah. *Blank paper disk* yang sudah dicelupkan ke larutan sampel, *disk* yang dicelupkan akuades sebagai kontrol negatif dan *disk* kloramfenikol sebagai kontrol positif diletakkan di atas media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong.

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

Data zona hambat antar kelompok pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dianalisis secara deskriptif dan diolah menggunakan program SPSS. Data awal diuji statistik *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data. *Shapiro-Wilk* digunakan untuk data yang jumlahnya kurang dari 50. Apabila nilai signifikansi $>0,05$ maka data yang dianalisis terdistribusi normal. Selanjutnya, dilakukan analisis homogenitas untuk menguji homogenitas varian data semua kelompok. Data dikatakan homogen apabila nilai signifikansi lebih dari 0,05.

Setelah syarat normalitas dan homogenitas terpenuhi maka dapat dilanjutkan dengan uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA). Apabila nilai signifikansi $<0,05$ maka H_0 ditolak atau terdapat perbedaan yang nyata antar kelompok perlakuan. Selanjutnya dilakukan analisis post-hoc menggunakan uji LSD (*Least Significant Different*) untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan bermakna.