

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Desain penelitian bersifat penelitian eksperimental di laboratorium dengan membandingkan efek perlakuan antara kelompok perlakuan serta kelompok kontrol. Prosedur yang digunakan dalam mengekstraksi daun pepaya dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Prosedur yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri, yaitu metode difusi agar *Kirby Bauer* untuk mengetahui kekuatan hambatan daun pepaya terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

B. Lokasi dan Waktu Kegiatan

Lokasi dan waktu penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi Farmasi, Fakultas Kesehatan, Universitas Jenderal Achmad Yani Yogyakarta pada bulan April 2021 sampai Juni 2021.

C. Populasi dan Sampel

1. Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah daun pepaya.
2. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun pepaya yang segar, utuh, tidak rusak, ukuran besar atau lebar, dan warna hijau tua yang telah dibersihkan dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan bantuan sinar matahari selama 6 hari. Simplisia kering dibuat serbuk menggunakan *miller*.

D. Variabel

1. Variabel bebas
Konsentrasi fraksi n-heksana 20%; 40%; 60%; 80: dan 100%.
2. Variabel tergantung
Diameter zona hambat bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
3. Variabel terkontrol
Waktu inkubasi media uji.

E. Definisi Operasional

1. Konsentrasi fraksi n-heksana 20%; 40%; 60%; 80: dan 100% diperoleh dari proses fraksinasi ekstrak etanol daun pepaya menggunakan tingkat kepolaran yang berbeda, yaitu n-heksana dan air (1:1 v/v).
2. Pengukuran diameter zona hambat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) secara horizontal, vertikal, dan diagonal.
3. Waktu inkubasi media uji selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.

F. Alat dan Bahan

1. Alat
 - a. Alat yang digunakan untuk penelitian ini adalah toples besar, gelas ukur, gelas bejana KLT, pipa kapiler, wajan, spatula kayu, kompor listrik, tabung reaksi, pipet tetes, pipet ukur, propipet, neraca analitik, *beaker glass*, *miller*, corong pisah, statif dan klem, labu erlenmeyer, lampu UV 254 nm dan 366 nm, cawan porselin, kaca arloji.
 - b. Alat yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah plat tetes, batang L, jarum ose, pembakar bunsen, cawan petri, jangka sorong, lemari pendingin, oven, inkubator, BSC (*Biological Safety Cabinet*), pinset, autoklaf, mikropipet 100-1.000 μL , *beaker glass*, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, tabung reaksi, labu erlenmeyer, *colony counter*.
2. Bahan

Daun pepaya, kain mori, kultur bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, kapas, *aluminium foil*, plastik *wrapping* 30 cm, *blue tip*, kertas payung, etanol 70%, asam klorida 2 N, pereaksi reagen: Wagner, Dragendroff, dan Mayer, kloroform (p.a), metanol (p.a), akuades, Kuersetin standar (p.a), plat silika GF254 (p.a), n-heksana (p.a), n-butanol (p.a), asam asetat glasial (p.a), media *Nutrient Agar* (p.a), media *Muller Hinton Agar* (p.a), asam klorida (p.a), serbuk magnesium (p.a), air panas, besi (III) klorida 10%, barium klorida 1%,

asam sulfur 1%, NaCl 0,9%, kertas cakram kosong (*Merck Oxoid*), kertas cakram antibiotik Ampisilin 10 µg (*Merck Oxoid*).

G. Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dilaksanakan dari pembuatan proposal penelitian, revisi proposal penelitian, pengurusan surat izin penelitian, penelitian di laboratorium, pengolahan data serta penyusunan laporan skripsi, ujian hasil skripsi, dan revisi laporan skripsi. Pelaksanaan tersebut dimulai dari bulan Desember 2020 sampai Agustus 2021.

Tabel 4. Pelaksanaan penelitian

No.	Jenis Kegiatan	Minggu ke-			
		I	II	III	IV
Desember 2020					
	Pembuatan proposal penelitian				v
Januari 2021					
	Penyusunan dan revisi proposal penelitian	v	v	v	v
Februari 2021					
1.	Ujian proposal penelitian		v		
2.	Revisi proposal penelitian			v	v
Maret 2021					
1.	Pengurusan surat izin penelitian	v	v		
2.	Determinasi tanaman	v			
3.	Penyiapan sampel		v	v	
April 2021					
1.	Penyiapan sampel		v		
2.	Fraksinasi		v		
3.	Kontrol kualitas ekstrak etanol dan fraksi n-heksana kental daun pepaya		v	v	
4.	Uji aktivitas antibakteri				v
Mei 2021					
1.	Kontrol kualitas (identifikasi golongan senyawa dengan metode KLT) fraksi n-heksana kental daun pepaya	v			
2.	Kontrol kualitas (identifikasi golongan senyawa dengan metode				v

No.	Jenis Kegiatan	Minggu ke-			
		I	II	III	IV
	KLT) fraksi n-heksana kental daun pepaya				
3.	Uji aktivitas antibakteri				v
Juni 2021					
1.	Kontrol kualitas (identifikasi golongan senyawa dengan metode KLT) fraksi n-heksana kental daun pepaya	v			
2.	Fraksinasi		v		
3.	Uji aktivitas antibakteri		v	v	
Juli 2021					
1.	Pengolahan data	v			
2.	Penyusunan laporan skripsi	v	v	v	
3.	Revisi laporan skripsi				v
Agustus 2021					
1.	Ujian hasil skripsi		v		
2.	Revisi laporan skripsi		v	v	

H. Metode Pengolahan dan Analisis Data

1. Metode pengolahan

a. Determinasi tanaman pepaya (*Carica papaya* L.)

Determinasi tanaman dilakukan dengan tujuan agar tidak terjadi kesalahan dalam pengumpulan bahan tanaman dan memastikan kebenaran tanaman yang digunakan dalam penelitian ini benar spesies *Carica papaya* Linn. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Sistematika Tumbuhan, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

b. Penyiapan sampel

1) Pengambilan sampel

Daun pepaya yang diambil adalah utuh, tidak rusak, ukuran besar atau lebar, dan warna hijau tua yang segar yang berasal dari Desa Tajeman, Palbapang, Bantul.

2) Pengolahan sampel

Daun pepaya diambil sebanyak ± 500 gram lalu dibersihkan dengan air mengalir dan diletakkan di atas koran sebagai alasnya untuk dikeringkan. Pengeringan daun pepaya dilakukan di bawah sinar matahari selama 6 hari dan ditutup dengan kain berwarna hitam. Tujuan dikeringkan di bawah sinar matahari dan ditutup dengan kain berwarna hitam adalah agar mendapatkan simplisia kering. Simplisia kering ditandai dengan mudah diremas akan hancur kemudian diserbuk menggunakan *miller*.

3) Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya

Serbuk daun pepaya yang sudah ditimbang diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% selama 6 hari. Wadah untuk maserasi menggunakan toples kaca besar lalu ditutup rapat dan simpan dalam ruangan tertutup terhindar dari cahaya matahari. Setiap hari sesekali dilakukan pengadukkan. Pada hari keempat, disaring dengan kain mori dan diperoleh filtrat 1 dan residu 1. Filtrat 1 ditampung dalam toples kaca dan residu 1 dilakukan remaserasi selama 2 hari. Kemudian, setelah 2 hari disaring kembali dan diperoleh filtrat 2 dan residu 2. Filtrat 1 dan 2 dicampurkan dalam toples kaca. Kemudian, dipekatkan filtrat dalam wajan dengan bantuan kompor listrik untuk memperoleh ekstrak kental dan dihitung nilai rendemen dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{\text{Berat ekstrak (gram)}}{\text{Berat simplisia (gram)}} \times 100\%$$

c. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan dengan metode corong pisah. Ekstrak etanol daun pepaya yang diperoleh diencerkan dengan air hangat lalu dimasukkan dalam corong pisah. Kemudian, ditambahkan pelarut n-heksana dengan perbandingan (1:1 v/v) dan dikocok secara perlahan sampai homogen lalu

didiamkan hingga memisah menjadi 2 lapisan, yaitu lapisan atas berupa fase n-heksana dan lapisan bawah berupa fase air. Diambil lapisan atas berupa fraksi n-heksana dan dikumpulkan dalam *beaker glass*. Lalu fase air ditambahkan dengan pelaut n-heksana dan dilakukan sama seperti sebelumnya. Fraksinasi dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Setelah fraksi n-heksana terkumpul lalu dipekatkan dalam wajan dengan bantuan kompor listik untuk menjadi fraksi n-heksana kental dan dihitung nilai rendemen dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\% b/b)} = \frac{\text{Berat fraksi kental (gram)}}{\text{Berat pengambilan ekstrak (gram)}} \times 100\%$$

- d. Kontrol kualitas ekstrak etanol daun pepaya dan fraksi n-heksana kental daun pepaya
- 1) Penetapan organoleptik: pengenalan secara fisik menggunakan alat indera dalam mendeskripsikan bentuk, bau, warna, dan rasa.
 - 2) Penapisan fitokimia
 - a) Identifikasi alkaloid
 Ekstrak dan fraksi sebanyak ± 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, ditetesi dengan HCL 2 N kemudian dibagi dalam sebagian tabung reaksi. Masing-masing tabung ditambahkan tiap-tiap pereaksi. Tabung pertama ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Dragendorff, serta tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi Wagner. Menunjukkan hasil positif adanya alkaloid apabila pada tabung pertama terbentuk endapan putih, tabung kedua terbentuk endapan jingga, serta tabung ketiga endapan merah kecoklatan (A'yun & Laily, 2015).
 - b) Identifikasi flavonoid
 Ekstrak dan fraksi sebanyak ± 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan etanol 70% lalu ditambahkan sedikit

serbuk magnesium dan asam klorida pekat. Menunjukkan hasil positif adanya flavonoid apabila terbentuk warna merah tua atau hitam kemerahan (A'yun & Laily, 2015).

c) Identifikasi saponin

Ekstrak dan fraksi sebanyak ± 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 mL air panas, lalu dinginkan. Setelah dingin dikocok tabung reaksi dengan kuat selama 10 detik. Menunjukkan hasil positif adanya saponin apabila terbentuk busa stabil setinggi 1-10 dan pada ditambahkan 1 tetes HCl 2N busa tidak hilang (A'yun & Laily, 2015).

d) Identifikasi tanin

Ekstrak dan fraksi sebanyak ± 2 gram dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air panas dan dikocok sampai homogen. Selanjutnya, ditambahkan besi (III) klorida 10%, menunjukkan hasil positif adanya tanin apabila terbentuk warna biru tua atau hitam (A'yun & Laily, 2015).

3) Identifikasi golongan senyawa dengan metode KLT

Identifikasi senyawa yang dilakukan adalah senyawa flavonoid sebagai antibakteri dengan metode KLT, yaitu:

a) Fase diam menggunakan plat silika GF254 dengan ukuran plat 10 cm \times 4 cm dan diberi garis tepi pada batas atas dan bawah masing-masing 1 cm. Fase gerak yang digunakan eluen n-butanol: asam asetat: air (4: 1: 5). Standar senyawa yang digunakan sebagai pembanding adalah Kuersetin 0,1%.

b) Penjenuhan chamber

Dilakukan pembuatan fase gerak dengan mengambil n-butanol: asam asetat: air (4: 1: 5) dan dimasukkan dalam gelas bejana KLT.

Kertas saring yang telah dipotong memanjang dimasukkan dalam gelas bejana hingga menjulur keluar dan gelas bejana ditutup rapat. Gelas bejana dikatakan jenuh apabila cairan pengelusi telah mencapai ujung dari kertas saring.

c) Penotolan ekstrak pada plat KLT

Plat silika GF254 dipanaskan terlebih dahulu dalam oven selama 30 menit pada suhu 110°C untuk mengurangi kadar air dalam plat tersebut. Kemudian plat KLT diberi garis batas atas dan batas bawah masing-masing 1 cm dengan pipa kapiler pada batas bawah lempeng. Penotolan dilakukan secara tegak lurus lalu dimasukkan ke dalam gelas bejana yang telah dijenuhkan. Kemudian gelas bejana ditutup rapat dan dibiarkan cairan pengelusi mencapai batas atas lempeng.

d) Identifikasi noda dengan lampu sinar UV 254 nm dan 366 nm

Lempeng dikeluarkan dari gelas bejana dan dibiarkan hingga kering. Kemudian lempeng diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 366 nm. Noda yang tampak pada lempeng ditandai untuk ditentukan nilai Rf.

$$R_f = \frac{\text{Jarak elusi sampel (cm)}}{\text{Jarak perambatan fase gerak dari titik penotolan (cm)}}$$

e. Persiapan uji aktivitas antibakteri

1) Sterilisasi alat dan bahan

Sterilisasi dilakukan agar menghindari terjadinya kontaminasi. Apabila tidak melakukan sterilisasi maka dapat menyebabkan alat dan bahan yang digunakan terkontaminasi sehingga pengamatan menjadi terganggu. Alat-alat gelas yang harus disterilkan antara lain cawan petri, tabung reaksi, *beaker glass*, dan batang L. Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi panas kering menggunakan oven pada suhu 171°C

selama 1 jam. Sebelum dilakukan sterilisasi, alat-alat gelas dicuci dengan air mengalir sampai bersih lalu dikeringkan dengan tisu dan disemprotkan dengan alkohol 70%. Setelah disemprotkan dengan alkohol 70% kemudian dikeringkan dengan tisu dan dibungkus dengan kertas payung. Setiap lubang pada tabung reaksi disumbat dengan kapas untuk mencegah kontaminasi setelah dikeluarkan dari oven.

Bahan-bahan yang harus disterilkan antara lain *blue tip*, NaCl 0,9%, media peremajaan bakteri dan media uji, serta akuades. Sterilisasi dilakukan dengan metode sterilisasi panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media diperlukan sterilisasi agar bakteri yang akan diinokulasikan ke media bebas dari mikroorganisme lain.

2) Pembuatan media

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri, yaitu *Nutrient Agar* (NA). Media NA sebanyak 0,6 gram dilarutkan dengan 30 mL akuades menggunakan labu erlenmeyer, setelah itu diaduk dengan bantuan *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga larut homogen. Kemudian ditutup lubang labu erlenmeyer dengan kapas dan *aluminium foil* lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Pemilihan media NA dipilih karena media tersebut secara umum digunakan untuk menumbuhkan dan mengisolasi berbagai jenis mikroorganisme. Menurut Dehydrated Culture Media (2021), komposisi dari Media NA (*Merck Oxoid*) adalah *Lab-Lemco powder* 1 gram, *yeast extract* 2 gram, *peptone* 5 gram, NaCl 5 gram, agar 15 gram, *water* 1 liter, dan *final pH* $7,4 \pm 0,2 @ 25^{\circ}\text{C}$.

Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri, yaitu *Muller Hinton Agar* (MHA). Media MHA sebanyak 8,5 gram dilarutkan dengan 250 mL akuades menggunakan labu erlenmeyer, setelah itu diaduk dengan bantuan *hot plate* dan *magnetic stirrer* hingga larut homogen. Kemudian ditutup lubang labu erlenmeyer dengan kapas dan *aluminium*

foil lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada temperatur 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah media *Muller Hinton Agar* (MHA). Pemilihan media MHA sebagai uji aktivitas antibakteri karena secara umum sangat baik digunakan sebagai uji sensitivitas antimikroba. Menurut Dehydrated Culture Media (2021), komposisi media MHA (*Merck Oxoid*) adalah *beef extract* 2 gram, *acid hydrolysate of casein* 17,5 gram, *starch* 1,5 gram, agar 17 gram, *distilled water* 1 liter, dan *final pH* $7,3 \pm 0,2 @ 25^{\circ}\text{C}$.

3) Pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5

Larutan standar *McFarland* merupakan standarisasi perkiraan jumlah bakteri dalam larutan suspensi dengan cara membandingkan kekeruhan larutan suspensi uji dengan standar *McFarland*. Larutan standar *McFarland* dibuat dengan mencampurkan 9,95 mL asam sulfur (H_2SO_4) 1% dan 0,05 mL barium klorida (BaCl_2) 1% (Nor dkk, 2018). Standar *McFarland* yang digunakan dalam penelitian ini adalah standar *McFarland* 0,5 yang artinya perkiraan jumlah suspensi bakteri adalah $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Tujuan digunakan standar *McFarland* 0,5 karena standar tersebut umum digunakan dalam penelitian uji kepekaan terhadap antibiotik dan kinerja media kultur.

Pada pembuatan larutan standar *McFarland* 0,5 dilakukan pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm. Pengukuran nilai absorbansi larutan standar *McFarland* 0,5 bertujuan untuk memastikan larutan standar *McFarland* 0,5 yang dibuat memiliki nilai absorbansi 0,08 sampai 0,1 (Dalynn Biologicals, 2014). Apabila hasil yang diperoleh tidak memenuhi syarat 0,08 sampai 0,1 maka dilakukan pengenceran menggunakan akuades sebagai pelarutnya. Kemudian, setelah dilakukan pengenceran diukur kembali menggunakan spektrofotometer UV-Vis.

4) Peremajaan bakteri

Bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kultur isolat bakteri diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bakteri uji diremajakan dan diinokulasi ke dalam media NA miring lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Peremajaan bakteri dengan cara media NA miring dalam tabung reaksi untuk mempermudah pengamatan penanaman bakteri. Peremajaan bakteri uji bertujuan untuk mengaktifkan isolat bakteri dan mengoptimalkan pertumbuhan bakteri.

5) Pembuatan suspensi bakteri

Diambil biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebanyak 1 ose dan disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,9% steril sampai didapatkan kekeruhan yang sesuai dengan standar *McFarland* 0,5 atau sebanding dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^8$ (CFU)/mL. Jumlah bakteri telah memenuhi syarat untuk uji kepekaan, yaitu 10^5 – 10^8 CFU/mL (Nor dkk, 2018).

6) Pembuatan larutan uji fraksi n-heksana

Larutan uji fraksi n-heksana dibuat variasi konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%. Pembuatan variasi konsentrasi tersebut dilakukan dengan 3 gram fraksi n-heksana kental dilarutkan dengan 3 mL akuades steril sebagai larutan stok 100%. Larutan stok 100% yang telah dibuat dilakukan pengenceran konsentrasi menjadi 20%; 40%; 60%; dan 80%. Perhitungan pembuatan larutan uji fraksi n-heksana dapat dilihat pada Lampiran 7.

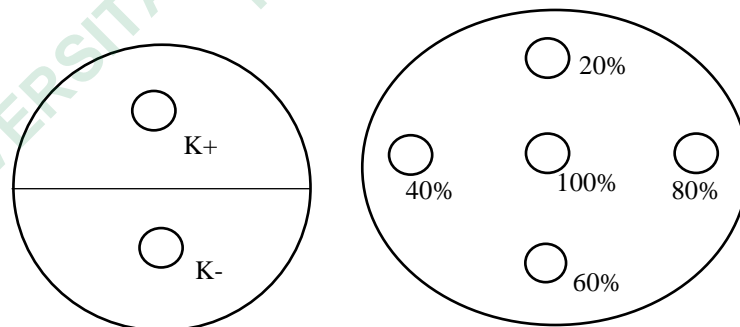
f. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan di dalam BSC (*Biological Safety Cabinet*) yang merupakan area kerja laboratorium dengan ventilasi udara

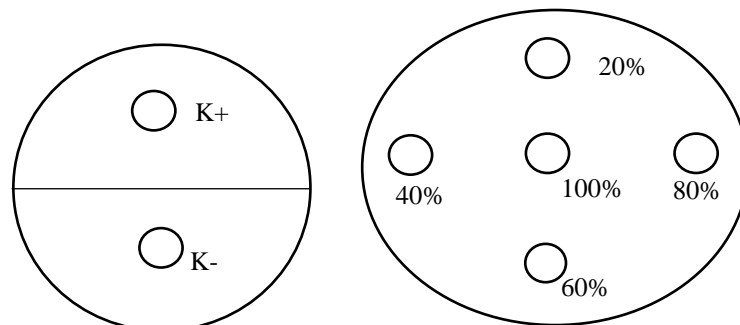
yang telah direkayasa untuk mengamankan pekerja yang bekerja dengan sampel dari kemungkinan timbulnya kontaminasi serta mengupayakan perlakuan tetap pada lingkungan steril (Biosafety Cabinet, 2021). Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar *Kirby Bauer*. Bakteri uji sebanyak 0,1 mL atau 100 μ L diinokulasikan ke atas media MHA *plate* dan diratakan dengan batang L. Kertas cakram kosong direndam ke dalam larutan uji fraksi n-heksana selama 5 menit kemudian diletakan di atas media uji. Media uji diinkubasi secara terbalik dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada suhu 37°C merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan bakteri. Setelah itu, diameter zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (mm) secara horizontal, vertikal, dan diagonal. Uji aktivitas antibakteri dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

Uji aktivitas antibakteri dikelompokkan menjadi 2, yaitu:

- 1) Kelompok kontrol: kontrol positif menggunakan antibiotik Ampisilin 10 μ g dan kontrol negatif menggunakan akuades.
- 2) Kelompok perlakuan: larutan uji fraksi n-heksana konsentrasi 20%; 40%; 60%; 80%; dan 100%.



Gambar 9. Desain uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*



Gambar 10. Desain uji aktivitas antibakteri *S. aureus*

2. Analisis data

- a. Hasil yang diperoleh dari kontrol kualitas ekstrak etanol dan fraksi n-heksana daun pepaya adalah penetapan organoleptik, penapisan fitokimia, dan pemisahan senyawa menggunakan KLT dianalisis secara deskriptif.
- b. Hasil uji aktivitas antibakteri berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk terhadap *E. coli* dan *S. aureus* yang dianalisis secara deskriptif dan statistik.
- c. Pengolahan data diameter zona hambat pada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way* ANOVA. Sebelum dianalisis secara statistik menggunakan uji *One-Way* ANOVA, dilakukan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas yang dilakukan secara bersamaan dengan *One-Way* ANOVA menggunakan perangkat lunak SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versi 20.