

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan berupa penelitian eksperimen dengan tujuan untuk mengetahui dampak yang timbul akibat suatu intervensi/perlakuan tertentu (Ernawati, 2014). Rancangan eksperimen yang digunakan yaitu *Quasi Experiment* dengan desain penelitian ialah *Post-test Only Controlled Group Design*. Bentuk rancangan penelitian yang digunakan dapat digambarkan dengan skema berikut ini:

Tabel 2		
Desain penelitian <i>Posttest only controlled group design</i>		
Kelompok	Perlakuan	Posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan:

R1 (*Random 1*) : Kelompok penelitian/eksperimen, yaitu berbagai perlakuan diantaranya ekstrak tunggal dan estrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji dengan variasi perbandingan 1:1; 1:2; 2:1.

R2 (*Random 2*) : Kelompok kontrol, ialah etanol 96% untuk kontrol reagen dan antibiotik *Cloramphenicol* 30 µg untuk kontrol kerja

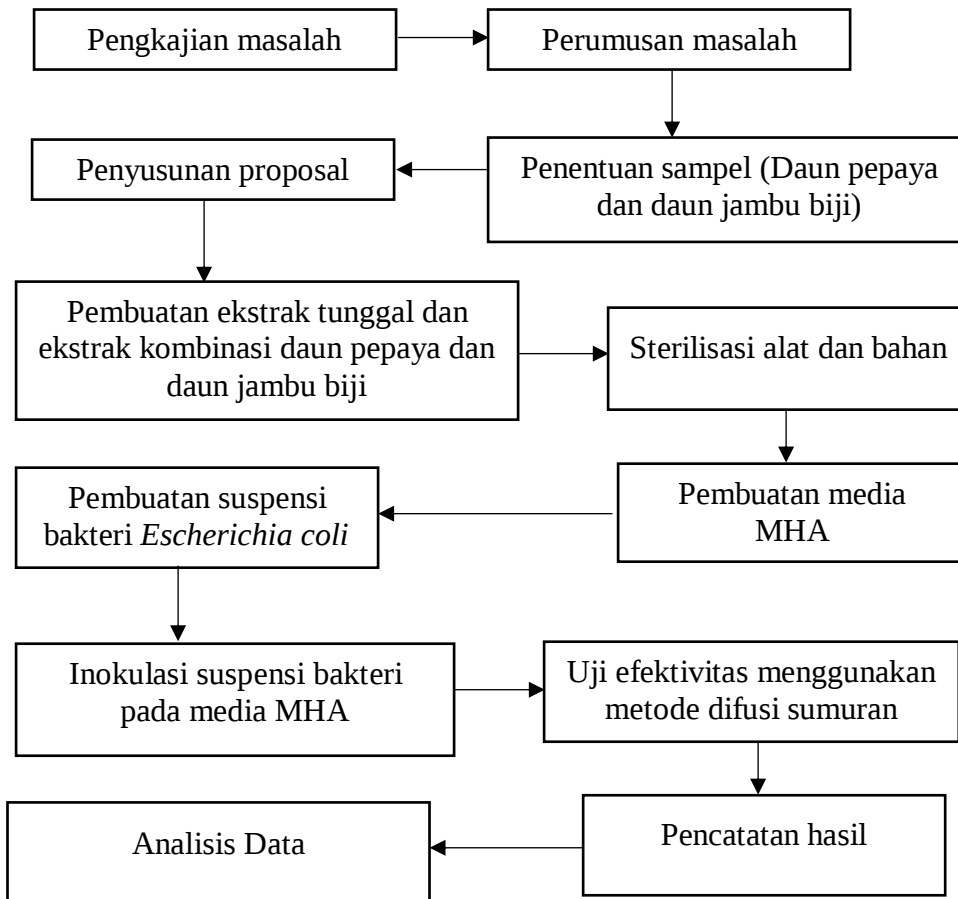
X (*Exposure*) : Intervensi (Perlakuan)

Observasi (O1) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

Observasi (O2) : Diameter zona hambat oleh kontrol kerja dan kontrol negatif

B. Alur Penelitian

Berikut merupakan alur penelitian pada penelitian ini:



Gambar 6. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Warmadewa.

2. Waktu penelitian

Penelitian telah dilaksanakan pada bulan September 2023 hingga Mei 2024. Penelitian dimulai dari penyusunan proposal hingga penyusunan laporan KTI.

D. Sampel Penelitian

1. Sampel penelitian

Sampel penelitian yang digunakan yaitu ekstrak kombinasi daun pepaya (*Carica papaya L.*) dan daun jambu biji (*Psidium guajava L.*). Daun pepaya didapatkan dari daerah Renon sedangkan daun jambu biji diperoleh dari daerah Sidakarya, Denpasar Selatan. Jenis daun pepaya yang digunakan adalah pepaya california. Daun pepaya dan daun jambu biji dipilih berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh peneliti. Berikut kriteria daun jambu biji dan daun pepaya yang digunakan:

- a. Daun segar berwarna hijau
- b. Tidak layu
- c. Tidak berlubang

Daun pepaya dan daun jambu biji diolah menjadi ekstrak menggunakan etanol 96% sebagai pelarut, lalu evaporasi dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak pekat.

2. Besar dan jumlah sampel

Jumlah daun pepaya dan daun jambu biji yang digunakan untuk sampel segar masing-masing sebanyak 3 kg, kemudian dibersihkan dan disortasi basah, dikeringkan lalu diblender sehingga diperoleh serbuk simplisia. Sampel yang diuji yaitu ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, serta ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji yang dibuat dengan cara mengkombinasikan serbuk simplisia daun pepaya dan daun jambu biji dengan perbandingan 1:1 (60 gram simplisia daun pepaya : 60 gram simplisia daun jambu biji); 1:2 (40 gram simplisia daun pepaya : 80 gram simplisia daun jambu biji); 2:1

(80 gram simplisia daun pepaya dan 40 gram simplisia daun jambu biji); kemudian dilarutkan dengan volume pelarut yang sama menggunakan etanol 96%, lalu dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat. Total perlakuan pada penelitian ini yaitu sebanyak lima perlakuan diantaranya ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, kombinasi ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji dengan perbandingan (1:1); (1:2); (2:1).

Untuk pengulangan sampel dihitung dengan rumus federer yang ditemukan oleh Walter Theodore Federer pada tahun 1915 (Indratama & Yenita, 2020).

Rumus Federer :

$(t - 1)(r - 1) \geq 15$

Keterangan :

r = Jumlah ulangan

t = Jumlah perlakuan

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r = 5$$

Berdasarkan perhitungan diatas, maka pada penelitian ini pengulangan yang dilakukan pada masing-masing perlakuan adalah sebanyak 5 kali pengulangan.

3. Unit analisis

Unit analisis pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang terbentuk akibat pemberian perlakuan berbagai varian ekstrak diantaranya ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, serta kombinasi ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji pada perbandingan yaitu 1:1; 1:2; 2:1 terhadap *Escherichia coli*.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Data yang dikumpulkan berupa data kuantitatif yaitu data primer yang diperoleh dengan uji laboratorium. Data primer berupa hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* oleh ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji.

2. Teknik pengumpulan data

Data dikumpulkan dengan melakukan eksperimen laboratorium berupa pengukuran diameter zona hambat terhadap *Escherichia coli* yang ditimbulkan oleh ekstrak tunggal maupun ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji menggunakan jangka sorong dimana hasil pengukurannya dinyatakan dalam satuan mm (milimeter).

3. Instrumen pengumpulan data

Alat pengumpulan data pada penelitian ini berupa:

1. Jangka sorong untuk mengukur diameter zona hambat
2. Alat tulis, untuk pencatatan hasil pengukuran diameter zona hambat
3. Kamera untuk dokumentasi kegiatan saat penelitian

F. Alat, Bahan, dan Prosedur Kerja

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian antara lain, wadah tempat maserasi (tabung vial) (5 buah), *rotary evaporator*, batang pengaduk, spatula, erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur 500 ml (Pyrex), tabung reaksi (pyrex), mikropipet 20-200 µl dan 100 µl, corong, pisau, blender, ose bulat, pinset, *Cork borer* (pelubang media), oven, autoklaf, api bunsen, gelas kimia, cawan petri, rak tabung reaksi, jangka sorong, *Mc Farland* Densitometer, neraca analitik, refrigerator, inkubator, *Hotplate*, *magnetic stirrer*, *Biosafety Cabinet* (Biobase).

2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini diantaranya ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji, antibiotik kloramfenikol, etanol 96%, media MHA (*Mueller Hinton Agar*), bakteri *Escherichia coli*, larutan NaCl fisiologis 0,9%, Alkohol 70%, standar 0,5 *Mc Farland*, *cotton swab*, *yellow tip*, *blue tip*, aluminium foil, kertas saring, dan tissue.

3. Prosedur kerja

a. Tahap pre analitik

a) Pembuatan ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji

Proses ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi berdasarkan prosedur kerja yang dilakukan oleh (Emelda dkk., 2021) kemudian dimodifikasi oleh peneliti dengan prosedur kerja sebagai berikut:

- 1) Memetik daun pepaya dan daun jambu biji sesuai kebutuhan penelitian yaitu masing-masing sebanyak 3 kg. Bersihkan kotoran yang menempel lalu dicuci

menggunakan air mengalir. Selanjutnya melakukan sortasi basah untuk memilih bahan sampel yang sesuai dengan kriteria yang telah ditetapkan

- 2) Meniriskan daun yang telah dicuci agar menghilangkan sisa-sisa air
- 3) Melakukan penimbangan awal untuk mengetahui massa awal bahan sampel
- 4) Daun diiris tipis untuk mempermudah pengeringan
- 5) Melakukan pengeringan terhadap bahan sampel pada suhu 50°C selama 18 jam menggunakan oven
- 6) Melakukan penyerbukan menggunakan blender dan diayak untuk menghasilkan serbuk halus dan seragam.
- 7) Simplisia yang telah diperoleh diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:1; 1:2; 2:1. Adapun variasi perbandingan massa simplisia sebagai berikut.

Tabel 3

Variasi Perbandingan Massa Simplisia Kombinasi

Variasi perbandingan	Massa Simplisia Daun pepaya (gram)	Massa Simplisia Daun Jambu Biji (gram)
Tunggal	120	0
Tunggal	0	120
1:1	60	60
1:2	40	80
2:1	80	40

- 8) Simplisia masing-masing ditimbang sesuai dengan massa pada tabel diatas lalu dimasukkan ke dalam wadah terpisah (wadah maserasi).
- 9) Pelarut etanol 96% ditambahkan pada masing-masing simplisia dengan perbandingan 1:7 hingga serbuk simplisia terendam sempurna oleh pelarut.

10) Proses perendaman dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.

11) Menyaring sampel menggunakan kertas saring, kemudian filtrat yang didapat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C untuk memperoleh ekstrak pekat.

12) Setelah didapatkan ekstrak pekat, kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik.

b) Pembuatan media *Muller Hinton Agar* (MHA) (Zeniusa dkk., 2019)

1) Menimbang serbuk media MHA sebanyak 8,4 gram menggunakan neraca analitik.

2) Melarutkan dengan 400 ml aquades pada erlenmeyer, diaduk hingga larut.

3) Melakukan pemanasan menggunakan hotplate sambil dilakukan pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* agar larutan homogen dengan sempurna.

4) Setelah homogen, sterilkan media selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C.

5) Media MHA yang sudah steril didiamkan hingga suhunya sekitar 40-50°C, kemudian dituang secara aseptik sebanyak 20 ml pada masing-masing cawan petri steril dan biarkan sampai memadat.

6) Setelah media memadat, cawan petrinya dibalik dan media disimpan pada refrigerator jika tidak langsung digunakan.

c) Pembuatan Kontrol Positif Kloramfenikol (Primadiamanti dkk., 2020)

Kontrol positif adalah larutan yang memiliki efektivitas terhadap bakteri *Escherichia coli* yang memiliki zona hambat yang luas, serta berfungsi sebagai pembanding efektivitas antara larutan antibiotik dengan ekstrak uji, dalam hal ini

ekstrak tunggal daun pepaya dan daun jambu biji, serta ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji. Adapun cara pembuatan kontrol positif kloramfenikol sebagai berikut:

- 1) Buka cangkang kapsul obat Kloramfenikol 250 mg.
 - 2) Timbang serbuk Kloramfenikol sebanyak 0,05 gram
 - 3) Kemudian serbuk dilarutkan dalam 10 ml aquades, kemudian di *vortex* selama 60 detik.
 - 4) Diperoleh larutan stok kloramfenikol 250µg/50µl.
- d) Pembuatan suspensi bakteri *Escherichia coli* (Nor dkk., 2018)
- 1) Mengambil 1-2 koloni bakteri yang sebelumnya telah dibiakkan pada media NA (*Nutrient Agar*), lalu suspensikan ke dalam 10 ml larutan NaCl steril 0,9% hingga mencapai kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 *McFarland* atau sebanding dengan jumlah bakteri $1,5 \times 10^5$ (CFU)/ml.
 - 2) Mengukur kekeruhan menggunakan alat *Mc Farland* Densitometer.

b. Tahap analitik

- a) Tahap Uji Efektivitas Antibakteri (Daud dkk., 2023)

Uji efektivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi sumuran pada media MHA steril. Tahap pengujian dilakukan dengan cara berikut:

- 1) Mempersiapkan alat dan bahan yang diperlukan.
- 2) Sterilisasi area atau meja kerja menggunakan alkohol 70%.
- 3) Kapas lidi steril dicelupkan ke dalam tabung suspensi bakteri *Escherichia coli* kepadatan 0,5 *Mc Farland*
- 4) Kapas lidi steril diputar dan ditekan pada dinding tabung di atas batas cairan untuk menghindari kelebihan inokulum.

- 5) Menggoreskan inokulum pada keseluruhan permukaan media agar sebanyak tiga kali dan setiap pengolesan cawan diputar sebesar 60°.
- 6) Cawan petri dibiarkan sedikit terbuka pada suhu kamar sekitar 3-5 menit agar koloni bakteri menyerap sempurna dalam media.
- 7) Selanjutnya pada plate dibagi menjadi 7 bagian, lalu disetiap zona diberi satu sumuran yang akan diisi bahan uji.
- 8) Sumuran dibuat dengan menggunakan alat pelubang media yaitu Cork borer dengan diameter 6 mm.
- 9) Diangkat Cork Borer secara aseptis dari media agar, sehingga terbentuk sumuran yang akan digunakan.
- 10) Dimasukkan sebanyak 20 µl ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, kombinasi ekstrak daun pepaya dan daun jambu biji dengan perbandingan (1:1), (2:1), (1:2), kontrol positif kloramfenikol, dan etanol 96% sebagai kontrol negatif pada masing-masing sumuran.
- 11) Kemudian, inkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 12) Mengamati zona hambat yang terbentuk disekitar sumuran, lalu diameter zona hambat diukur secara ventrikal maupun horizontal menggunakan jangka sorong.

c. Tahap pasca analitik

e) Pelaporan hasil

- 1) Mengamati zona hambat yang terbentuk setelah diinkubasi 1x24 jam yang ditandai dengan daerah bening disekitar sumuran.

2) Mengukur diameter total zona hambat yang terbentuk diekitar sumuran menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm), kemudian dikategorikan kekuatan daya antibakterinya.

3) Penentuan Efektivitas Antibakteri

Efektivitas antibakteri ekstrak tunggal daun pepaya, ekstrak tunggal daun jambu biji, serta ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji diperoleh dengan membandingkan diameter zona hambat ekstrak uji tersebut dengan diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol (Harlita dkk., 2019).

Efektivitas antibakteri dari masing-masing perlakuan dihitung berdasarkan rumus sebagai berikut:

$$E = \frac{D}{Da} \times 100\%$$

Keterangan:

E : Efektivitas antibakteri (%)

D : Diameter zona hambat ekstrak (mm)

Da : Diameter zona hambat antibiotik kontrol positif (mm)

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data didapatkan dengan melakukan eksperimen laboratorium yaitu pengujian efektivitas antibakteri ekstrak kombinasi daun pepaya dan daun jambu biji terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan mengukur diameter zona hambat yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm), kemudian diolah dengan teknik tabulating data dan dilampirkan dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis Data

Data dianalisa menggunakan uji statistik dengan bantuan software komputer. Untuk uji normalitas data dilakukan uji KS (Kolmogorof-smirnov). Apabila data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Deference*) untuk melihat perbedaan zona hambat antara tiap perlakuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.