

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah *True Experimental* dengan menggunakan rancangan penelitian *Posttest only control design* untuk mengukur pengaruh perlakuan pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan dengan kelompok kontrol. Penelitian dengan *true experimental design* memiliki tingkat validitas internal yang tinggi, sebab peneliti dapat mengontrol seluruh variabel luar yang dapat mempengaruhi jalannya penelitian (Sugiyono, 2014). Bentuk rancangan penelitian ini dapat dilihat pada gambar :

	Perlakuan	Post test
R	X ₁	O ₁
	X ₂	O ₂
	X ₃	O ₃
	Y ₄	O ₄
	Y ₅	O ₅
	Y ₆	O ₆
	Y ₇	O ₇

Gambar 4. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan :

- R : Randomisasi penempatan objek pada kelompok eksperimen dan kelompok kontrol uji aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan perbedaan jenis pelarut ekstrak biji buah pepaya (*Carica papaya L.*)
- X1 : Perlakuan kepada kelompok eksperimen. Simplisia biji buah pepaya dimaserasi dengan etanol 96%
- X2 : Perlakuan kepada kelompok eksperimen. Simplisia biji buah pepaya dimaserasi dengan etil asetat
- X3 : Perlakuan kepada kelompok eksperimen. Simplisia biji buah pepaya dimaserasi dengan n-heksana
- Y4 : Perlakuan kepada kelompok kontrol positif. Kontrol positif digunakan cakram disk yang mengandung kloramfenikol
- Y5 : Perlakuan kepada kelompok kontrol negatif. Pelarut etanol 96% ditetaskan pada cakram disk
- Y6 : Perlakuan kepada kelompok kontrol negatif. Pelarut etil asetat ditetaskan pada cakram disk
- Y7 : Perlakuan kepada kelompok kontrol negatif. Pelarut n-heksana ditetaskan pada cakram disk
- O1 : Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak etanol 96% biji buah pepaya
- O2 : Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak etil asetat biji buah pepaya

- O3 : Hasil pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak n-heksana biji buah pepaya
- O4 : Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol positif kloramfenikol
- O5 : Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol negatif etanol 96%
- O6 : Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol negatif etil asetat
- O7 : Hasil pengukuran diameter zona hambat kontrol negatif n-heksana

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bakteriologi dan Laboratorium Kimia Dasar Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar dan Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan April 2024

C. Sampel Penelitian dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol 96%, ekstrak etil asetat dan ekstrak n-heksana biji buah pepaya diperoleh dari biji buah pepaya dengan kriteria inklusi buah pepaya *California* masak (8-9 bulan) yang diambil dari petani buah pepaya di Desa Babahan, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan. Buah diambil dari beberapa pohon yang terdapat dilahan yang sama. Biji buah pepaya dipisahkan dari daging buah dan selaput lendir yang melapisi biji buah pepaya. Biji pepaya yang digunakan adalah biji yang berwarna coklat-kehitaman, berbentuk bulat-oval dan tidak berjamur. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu biji buah pepaya

dari buah pepaya tua yang layu dan tidak segar yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti.

2. Besar sampel penelitian

Proses ekstraksi menghasilkan ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai persediaan sampel. Masing-masing ekstrak biji buah pepaya duji dengan konsentrasi 20% (b/v) yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel dengan menggunakan etanol 96%, etil asetat dan n-heksana sebagai pengencer. Pada konsentrasi 20% massa ekstrak yang digunakan yaitu 5 gram, sehingga total massa ekstrak yang dibutuhkan untuk seluruh variasi dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5 gram, etil asetat sebanyak 5 gram dan n-heksana sebanyak 5 gram. Sebagai kelompok kontrol positif digunakan kloramfenikol dan kontrol negatif digunakan etanol 96%, etil asetat dan n-heksana.

Penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi yang digunakan dan jumlah kelompok kontrol (Hanafiah, 2016). Dalam penelitian ini digunakan 3 kelompok perlakuan dan 4 kelompok kontrol. Sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 7 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dari persamaan Federer berikut :

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

Keterangan :

r = jumlah pengulangan

t = jumlah perlakuan

$$\begin{aligned}
(t-1)(r-1) &\geq 15 \\
(7-1)(r-1) &\geq 15 \\
7(r-1) &\geq 15 \\
7r-7 &\geq 15 \\
7r &\geq 22 \\
r &\geq 3,142 \\
r &\geq 4 \text{ (dibulatkan)}
\end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan empat kali. Menurut Hanafiah, (2016) jumlah ulangan suatu perlakuan tergantung pada derajat ketelitian yang diinginkan oleh peneliti terhadap kesimpulan hasil percobaan. Semakin banyak jumlah pengulangan yang dilakukan, maka derajat ketelitian juga akan semakin tinggi.

Oleh karena itu, pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah empat kali, sehingga diperoleh jumlah pemeriksaan sebesar 28 sampel pada masing-masing jenis pelarut yang digunakan.

3. Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel pada penelitian ini adalah purposive sampling dikarenakan sampel diambil dengan pertimbangan tertentu yang ditentukan oleh peneliti.

4. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya dengan konsentrasi pada masing-masing pelarut yang digunakan yaitu 20%. Konsentrasi dan jenis pelarut ini dipilih untuk mengetahui jenis pelarut yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus*. Kelompok kontrol yang digunakan adalah kontrol negatif dengan etanol 96%, etil asetat dan n-heksana, sementara kontrol positif dengan cakram antibiotik kloramfenikol.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

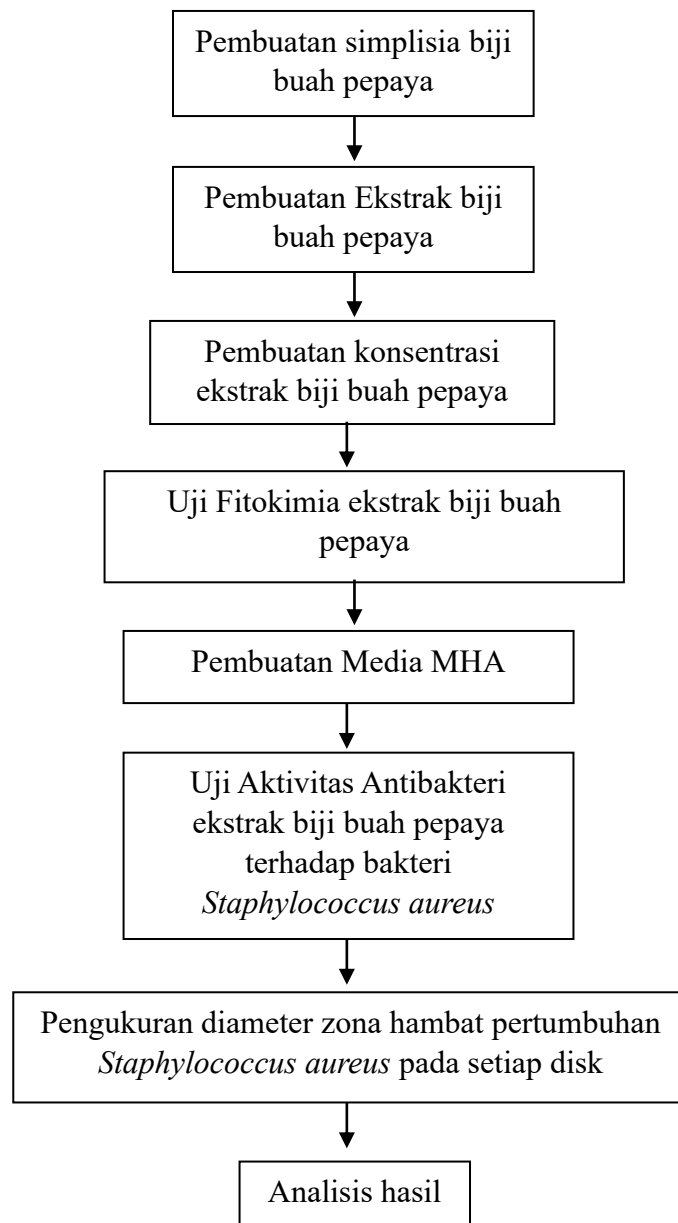
Blender, tabung vial, tempayan, neraca analitik, pipet ukur 1 ml dan 10 ml, mikropipet 20µl – 1000µl, ball pipet, gelas ukur 250ml, labu ukur 50 ml evaporator, beaker glass 500 ml dan 1000 ml, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, ose, hotplate, magnetic stirer, petridish steril, *biosafety cabinet*, densitometer, jangka sorong, inkubator, oven dan autoclave.

2. Bahan

Biji buah papaya 1 kg, Aquadest steril 1000 ml, bakteri *Staphylococcus aureus*, media MHA, standar Mac Farland 0,5%, NaCl fisiologis 0,9%, cakram kosong, cakram antibiotik kloramfenikol, kertas saring, lidi kapas steril, etanol 96% (2000 ml), etil asetat (2000 ml), n-heksana (2000 ml), alumunium foil, dan kapas berlemak.

E. Alur Kerja dan Prosedur Kerja

1. Alur kerja



Gambar 5. Alur Kerja Uji Aktivitas Antibakteri

Keterangan gambar :

Biji buah pepaya yang dipilih sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah di tentukan. Pembuatan simplisia berlangsung dengan mengeringkan biji buah pepaya pada oven kemudian menghaluskan biji buah pepaya kering menggunakan

blender. Pembuatan ekstrak biji buah pepaya dilakukan dengan maserasi dan evaporasi. Simplisia biji buah pepaya maserasi dengan tiga jenis pelarut berbeda yakni etanol 96%, etil asetat dan n-heksana. Ekstrak biji buah pepaya dilakukan pengenceran dan dibuat konsentrasi ekstrak biji buah pepaya 20% dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksana. Penjuhan masing – masing konsentrasi ekstrak biji buah pepaya pada cakram disk kosong. Penjuhan etanol 96%, etil asetat dan n-heksana sebagai kontrol negatif pada cakram disk kosong, dan penyiapan disk kloramfenikol pada cakram disk kosong sebagai kontrol positif. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang telah dibuat suspensi dengan kekeruhan yang sama dengan standar Mc Farland 0,5 (setara dengan $1,5 \times 10^8$ sel bakteri) digoreskan pada media Mueller Hinton Agar secara merata. Cakram disk yang telah dijenuhkan dengan masing-masing konsentrasi ekstrak biji buah pepaya dan kontrol ditempelkan pada media Mueller Hinton Agar dengan jarak minimal tiap disk adalah 15 mm, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diukur diameter zona hambat yang terbentuk pada setiap disk dengan jangka sorong dan dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer.

2. Prosedur kerja

a. Pembuatan simplisia biji pepaya

Buah pepaya yang sudah masak (8-9 bulan) dipanen dari kebun buah pepaya di Desa Babahan, Kecamatan Penebel, Kabupaten Tabanan. Biji buah pepaya dipisahkan dari daging buah dan dibuang selaput lendirnya. Biji buah pepaya yang digunakan dipastikan berwarna coklat-kehitaman, berbentuk bulat-oval dan tidak berjamur.

- a. Sebanyak 1 kg biji buah pepaya yang telah di pilah sesuai kriteria dicuci dan ditiriskan.
- b. Dikeringkan biji buah pepaya menggunakan oven dengan suhu 50°C.
- c. Setelah kering, biji pepaya dihaluskan dengan blender dan diayak untuk memperoleh serbuk halus, serbuk yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk penelitian
- d. Dihitung kadar air pada simplisia biji buah pepaya (syarat baku kadar air simplisia adalah $< 10\%$)

b. Pembuatan ekstrak biji buah pepaya

Pembuatan ekstrak biji buah pepaya (*Carica papaya L.*) dilakukan dengan modifikasi metode evaporasi dengan alat rotary evaporator menurut Torar, Lolo dan Citraningtyas (2017) :

- 1) Simplisia biji buah pepaya ditimbang sebanyak 450 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker masing – masing berisi 150 gram simplisia
- 2) Ditambahkan etanol 96% sebanyak 750 ml pada gelas beaker pertama, etil asetat sebanyak 750 ml pada gelas beaker kedua dan n-heksana sebanyak 750 ml pada gelas beaker ketiga. Gelas beaker ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk setiap 8 jam sekali. Dipastikan wadah terlindung dari sinar matahari. Dilakukan proses remeserasi pada masing-masing pelarut sebanyak 3 kali.
- 3) Filtrat yang diperoleh pada proses meserasi dipekatkan rotary evaporator (suhu 40–60°C) sampai didapatkan ekstrak kental konsentrasi 100%.
- 4) Ekstrak kental ditimbang dengan neraca analitik untuk mengetahui massa total dari ekstrak yang diperoleh.

5) Dilakukan perhitungan nilai rendemen ekstrak untuk mengetahui banyaknya kandungan bioaktif. Nilai rendemen ekstrak dikatakan baik apabila hasilnya lebih dari 10%.

c. Pembuatan konsentrasi ekstrak biji buah pepaya

1) Konsentrasi ekstrak biji buah pepaya yang digunakan adalah 20%. Dalam penelitian (Torar, Lolo dan Citraningtyas, 2017) pada konsentrasi 20% ekstrak biji buah pepaya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

2) Pengenceran dilakukan dalam labu ukur dengan volume total 25 ml. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak biji buah pepaya menggunakan persentase perbandingan %b/v, melalui rumus berikut :

$$\% = \frac{b}{v} \times 100$$

Keterangan :

% : variasi konsentrasi dalam satuan persen

b : massa ekstrak biji buah pepaya (100%)

v : volume pengenceran

3) Berdasarkan perhitungan yang telah dilakukan, diperoleh pada konsentrasi 20% massa ekstrak yang digunakan sebanyak 5 gram dan ditambahkan masing-masing pelarut hingga volume 25 ml

4) Campuran dihomogenkan dan disimpan pada labu ukur.

d. Uji skrining fitokimia ekstrak biji buah pepaya

a. Uji kandungan alkaloid : dipipet 2 ml ekstrak konsentrasi 20%, ditambahkan ammonia dan beberapa tetes H₂SO₄ 2N ml. Larutan ditambahkan 1 ml reagen *Dragendorff's reagents*.

- b. Uji kandungan flavonoid : ditambahkan 1 ml ekstrak yang sudah diencerkan, ditambahkan 2 ml larutan NaOH 2% dan beberapa tetes HCl
 - c. Uji kandungan tanin : ditambahkan 1,6 ml ekstrak yang sudah diencerkan dan ditambahkan 3 tetes larutan FeCl₃. Campuran dihomogenkan
 - d. Uji kandungan terpenoid : ditambahkan 2 ml kloroform dan 5 ml ekstrak yang sudah diencerkan. Campuran diuapkan pada waterbath dan ditambahkan 3 ml konsentrat H₂SO₄ (dipanaskan pada waterbath)
 - e. Uji kandungan saponin : ditambahkan 2 ml ekstrak yang sudah diencerkan, 2 ml larutan dan air suling. Campuran dikocok dengan kencang, amati busa yang terbentuk selama 5 menit. Ditambahkan 1 tetes HCl 2N.
- e. Pembuatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
- a. Untuk membuat 12 cawan media MHA dibutuhkan bubuk media *Mueller Hinton Agar* (MHA) sebanyak 11,2 gram, dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuadest sebanyak 300 mL (etiket media 38,0 g medium disuspensikan ke dalam satu L aquadest)
 - b. Medium dipanaskan selama satu menit pada hotplate sambil diaduk sampai serbuk benar-benar larut dan tercampur dengan sempurna
 - c. Setelah bubuk media larut sempurna dan homogen, diukur pH media dengan menggunakan pH stik (pH optimal $7,3 \pm 0,1$ pada suhu 25°C)
 - d. Erlenmeyer ditutup dengan kapas berlemak dan aluminium foil
 - e. Media disterilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit dihitung dari tercapainya suhu 121 °C
 - f. Media yang telah disterilisasi, didiamkan sampai suhu media turun menjadi $\pm 40 - 50$ °C.

- g. Tuangkan ke dalam cawan petri (Plate) masing-masing plate sebanyak sebanyak 15 ml, kemudian didiamkan hingga memadat
- h. Setelah media memadat, cawan petri dibalik, dan apabila tidak langsung digunakan media yang sudah dituangkan pada cawan petri atau sisa media dalam tabung erlenmeyer dapat dibungkus dengan kertas buram dan disimpan didalam refrigerator.
- f. Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus*
- 1) Diambil koloni bakteri *Staphylococcus aureus* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,9%.
 - 2) Suspensi dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5%.
 - 3) Suspensi diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.
- g. Uji aktivitas antibakteri (Anggraini *et al.*, 2019)
- 1) Menyiapkan sampel ekstrak biji pepaya konsentrasi 20% dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksana
 - 2) Diambil sampel suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dengan kepekatan 0,5 Mc Farland dan streak atau goreskan pada cawan petri secara zigzag vertikal lalu diamkan selama 5 menit
 - 3) Paper disk diameter 6 mm ditetaskan 20µl masing-masing konsentrasi dan diamkan hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk
 - 4) Masing-masing cakram disk yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak biji buah pepaya kemudian ditempelkan pada perbumaan media MHA yang telah digoreskan suspense bakteri dan dipastikan melekat sempurna
 - 5) Kontrol positif dan negatif ditempelkan pada media MHA

- 6) Dilakukan inkubasi pada media selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37 °C dan media dibungkus dengan kertas buram
- 7) Setelah diinkubasi, zona bening yang timbul disekitar kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong

3. Pelaporan hasil

Hasil dilaporkan dengan cara menghitung zona hambat dari ujung satu keujung yang lain melalui tengah-tengah cakram disk yang terjadi pada setiap konsentrasi dan pada kontrol negatif dan kontrol positif dengan menggunakan jangka sorong dan dikonversi ke dalam satuan mm.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan adalah data primer dan data sekunder. Dimana menurut (Sugiyono, 2014), data primer merupakan data yang diperoleh melalui pengamatan langsung oleh peneliti. Dalam penelitian ini data primer tersebut meliputi data diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya. Data sekunder berasal dari artiker, jurnal, buku atau sumber lain yang mendukung.

2. Teknik pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan observasi. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya. Hasil pengukuran diameter

zona hambat tersebut menunjukkan adanya aktivitas penghambatan yang dinyatakan dalam milimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 20% ekstrak biji buah pepaya yang dinyatakan dalam satuan mm (milimeter) yang diolah menggunakan teknik pengolahan data secara tabulating dan naratif.

2. Analisis data

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis kuantitatif, dilakukan dengan uji statistik menggunakan bantuan perangkat lunak komputer. Analisis data dilakukan dengan beberapa tahap, antara lain :

1) Uji normalitas data

Digunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data tersebut berdistribusi normal atau tidak. Uji ini dipilih sebab jumlah sampel kurang dari 50 sampel.

2) Uji beda

Uji *One way Anova* digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan zona hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol 96%, etil asetat dan n-heksana biji buah pepaya, apabila data diperoleh berdistribusi normal. Apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji Kruskal wallis untuk mengetahui perbedaan zona hambat

pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan variasi pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksana.

3) Uji *post hoc*

Uji *post hoc* dilakukan apabila hasil uji menunjukkan hipotesis nol ditolak dan hipotesis alternatif diterima. Uji *Tukey* digunakan pada data yang berdistribusi normal untuk menentukan perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Apabila data berdistribusi tidak normal digunakan uji *Games-Howell*. Uji *Games-Howell* merupakan uji non-parametrik yang digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antar kelompok perlakuan.