

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. Rancangan eksperimen yang digunakan yaitu Quasi Experiment dengan desain penelitian ialah Post-test Only Controlled Group Design (Sugiyono, 2017). Bentuk rancangan penelitian yang digunakan dapat digambarkan dengan skema berikut ini:

Kelompok	Perlakuan	posttest
R1	X	O1
R2	Kontrol	O2

Keterangan :

R1 (Random 1) : Kelompok penelitian/eksperimen, yaitu berbagai perlakuan diantaranya ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, ialah blank disk untuk kontrol reagen dan antibiotik Cloramphenicol untuk kontrol kerja.

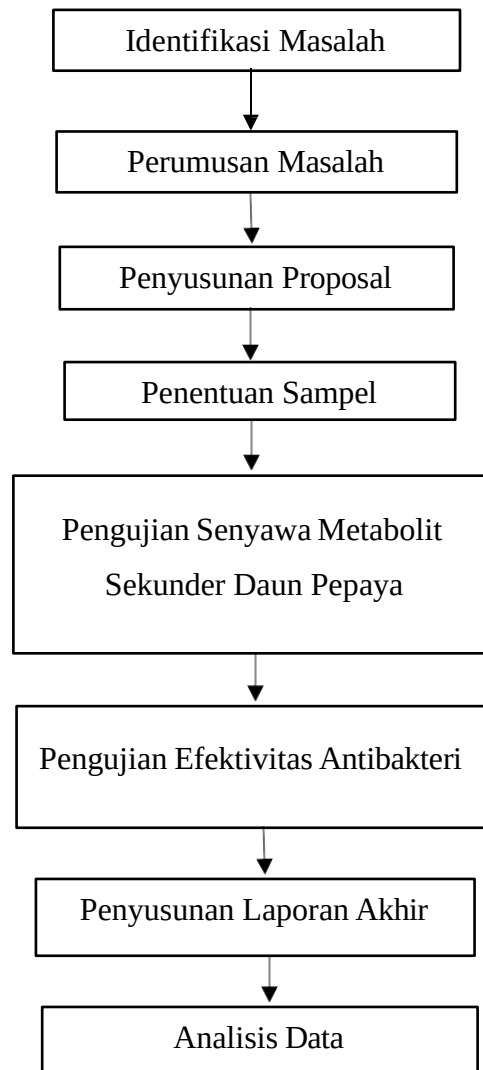
X (Exposure) : Intervensi (Perlakuan)

Observasi (O1) : Diameter daya zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*

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

B. Alur Penelitian

Alur penelitian dapat digambarkan seperti bagan di bawah ini:



Gambar 4. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPTD. Balai Laboratorium Kesehatan Kerthi Bali Sadhajiwa Provinsi Bali dan Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO).

2. Waktu penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan selama 2 bulan yaitu dari Bulan Maret sampai April 2025.

D. Populasi dan Bahan Penelitian

1. Bahan

Dalam penelitian ini, bahan yang digunakan berupa daun pepaya California sebanyak 5 kg yang didapatkan dari Desa Tegalwangi. bahan tersebut merupakan bagian dari populasi yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi yang telah ditetapkan.

a. Kriteria inklusi

Kriteria inklusi merupakan persyaratan atau ciri khusus yang harus dipenuhi oleh subjek atau objek penelitian agar dapat dimasukkan dalam studi. Penetapan kriteria ini bertujuan untuk memastikan bahwa sampel yang digunakan benar-benar mencerminkan populasi yang diteliti serta mendukung tujuan penelitian.

1. Daun harus sehat dan bebas dari kerusakan atau penyakit.
2. Daun tidak layu
3. Daun tidak berlubang.

b. Kriteria eksklusi

Kriteria eksklusi adalah kondisi atau faktor yang menyebabkan individu atau objek penelitian tidak memenuhi syarat untuk berpartisipasi dalam penelitian. Hal ini dilakukan untuk menghindari bias atau gangguan yang dapat mempengaruhi validitas hasil penelitian.

1. Daun berwarna kuning kecoklatan.

2. Daun yang terkontaminasi pestisida.

3. Teknik pengulangan

Sebanyak 5 kg daun pepaya segar digunakan sebagai bahan sampel awal. Daun-daun tersebut terlebih dahulu dibersihkan dan melalui proses sortasi basah, kemudian dikeringkan dan dihaluskan hingga menjadi serbuk simplisia. Serbuk ini kemudian diekstraksi menggunakan etanol, menghasilkan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya Linn*) dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai larutan stok. Ekstrak ini kemudian diencerkan menggunakan etanol 96% untuk memperoleh empat variasi konsentrasi, yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Dalam penelitian ini, antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif, sementara blank disk berfungsi sebagai kontrol negatif.

Jumlah ulangan sampel ditentukan menggunakan rumus Federer, yang diperkenalkan 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

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

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

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

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r = 4$$

Dari hasil perhitungan, penelitian ini dapat dilakukan dengan empat kali pengulangan. Menurut Hanafiah (2016), banyaknya pengulangan dalam suatu perlakuan ditentukan oleh seberapa akurat peneliti ingin mendapatkan kesimpulan dari eksperimen yang dilakukan. Dengan meningkatkan jumlah ulangan, maka keakuratan atau ketelitian hasil penelitian juga akan ikut meningkat.

4. Unit analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah ukuran diameter zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang diamati pada beberapa tingkat konsentrasi ekstrak daun pepaya, yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Variasi konsentrasi ini dipilih untuk mengevaluasi efektivitas masing-masing konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

5. Teknik pengambilan sampel

Menerapkan metode *Non-Probability Sampling* dengan pendekatan *purposive sampling*, yaitu pemilihan sampel dilakukan secara sengaja berdasarkan kriteria inklusi tertentu yang telah ditetapkan sebelumnya serta memenuhi ketentuan yang telah ditentukan.

E. Alat, Bahan, Prosedur Kerja

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi, wadah maserasi, rotary evaporator, batang pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur 500 ml, tabung reaksi, mikropipet, corong, pisau, blender, ose bulat, pinset, oven, autoklaf, bunsen, cawan petri, rak tabung reaksi, jangka sorong, McFarland Densitometer, timbangan

analitik, lemari pendingin, inkubator, Hotplate, magnetic stirrer, Biosafety Cabinet (Biobase).

2. Bahan

Bahan yang digunakan meliputi ekstrak daun pepaya, kloramfenikol, etanol 96%, media pertumbuhan MHA (*Mueller Hinton Agar*), bakteri *Shigella dysenteriae*, NaCl 0,9%, Alkohol 70%, standar kekeruhan 0,5 Mc Farland, cotton swab, yellow tip, blue tip, aluminium foil, kertas saring.

3. Prosedur kerja

a. Pembuatan serbuk simplisia

- 1) Daun pepaya yang sudah di dapatkan ditimbang sebanyak 5 kg, sortasi basah bahan alam yang akan digunakan , pastikan jenis, ukuran dan warna seragam.
- 2) Cuci bersih daun pepaya.
- 3) Tiriskan daun pepaya yang sudah dicuci.
- 4) Iris tipis-tipis daun pepaya agar proses pengeringan dapat dilakukan dengan cepat.
- 5) Keringkan daun pepaya dengan cara oven pada suhu 50°C selama 24 jam.
- 6) Timbang bahan yang telah kering.
- 7) Haluskan daun pepaya yang sudah kering dengan cara diblender.
- 8) Ayak dan pisahkan bagian yang lebih halus.

b. Pembuatan ekstrak daun pepaya

- 1) Sampel daun pepaya yang telah dikeringkan dan dihaluskan sehingga didapat serbuk simplisia.

- 2) Serbuk simplisia daun pepaya di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan Pelarut etanol 96% ditambahkan simplisia dengan perbandingan 1:7 hingga serbuk simplisia terendam sempurna oleh pelarut.
- 3) Proses perendaman dilakukan selama 3 hari dengan pengadukan sebanyak 4 kali dalam sehari.
- 4) Saring sampel menggunakan kertas saring, kemudian filtrat yang didapat dievaporasi menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C untuk memperoleh ekstrak pekat.
- 5) Setelah didapatkan ekstrak pekat, kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik dan rendemennya dihitung dengan rumus :

$$\frac{\text{Bobot ekstrak kental (gr)}}{\text{Bobot simplisia yang di ekstraksi (gr)}} \times 100\%$$

c. Penentuan konsentrasi ekstrak daun pepaya

Pada penelitian ini konsentrasi yang digunakan sebanyak 5 taras yaitu EDP (Ekstrak Daun Pepaya) 0% sebagai control, EDP (Ekstrak Daun Pepaya) 20%, EDP (Ekstrak Daun Pepaya) 40%, EDP (Ekstrak Daun Pepaya) 60%, dan EDP (Ekstrak Daun Pepaya) 80%. Penentuan konsentrasi EDP (Ekstrak Daun Pepaya) dilakukan dengan rumus sebagai berikut

$$K = \left(\frac{B}{V_t} \right) \times 100\%$$

Keterangan :

- K : Konsentrasi ekstrak daun pepaya (%)
- B : Berat ekstrak daun pepaya
- V_t : Volume total larutan

- 1) Pembuatan larutan uji dilakukan dengan ekstrak daun pepaya dengan seri konsentrasi 20%, 40% dan 60%, dan 80%.
- 2) Ekstrak daun pepaya diencerkan menggunakan pelarut etanol 96%.
- 3) Konsentrasi 20% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut.
- 4) Konsentrasi 40% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut.
- 5) Konsentrasi 60% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 3 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut.
- 6) Konsentrasi 80% dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 4 gram dilarutkan dalam 5 ml pelarut.

d. Skrining fitokimia

a) Identifikasi saponin

- 1) 1 ml sampel ekstrak daun pepaya diambil padatannya, dicampurkan 10 ml air panas dan 1 tetes asam klorida 2 N.
- 2) Kocok kuat-kuat campuran selama 10 detik.
- 3) Apabila terbentuk busa setinggi 1-10 cm yang stabil selama tidak kurang dari 10 menit, maka menandakan adanya senyawa saponin.

b) Identifikasi flavonoid

- 1) 1 ml sampel ekstrak daun pepaya diambil padatannya, dicampurkan dengan 0,1 g Mg atau sekitar seujung spatula.
- 2) Kemudian tambahkan dengan 10 tetes HCL pekat.
- 3) Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna jingga.

c) Identifikasi alkaloid

- 1) 1 ml sampel ekstrak daun pepaya dipipet, ditambahkan beberapa tetes asam sulfat 2N atau asam klorida 2N.
 - 2) Bagi larutan sampel menjadi 2 bagian.
 - 3) Tambahkan 1 bagian dengan 2 tetes reagen mayer dan wagner, dan bagian lainnya dengan 1 ml reagen dragendorf.
 - 4) Amati perubahan yang terjadi apabila terbentuk endapan merah/coklat pada reagen dragendorf dan endapan putih/kuning pada reagen mayer dan wagner maka hasil dinyatakan positif.
- d) Identifikasi tanin
- 1) 1 ml sampel ekstrak daun pepaya diambil padatannya, dicampurkan dengan 1-2 tetes reagen FeCl_3 1%.
 - 2) Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam kebiruan.
- e) Identifikasi triterpenoid
- 1) 2 ml sampel ekstrak daun pepaya diambil padatannya, tambahkan 2 ml asam asetat anhidrat kedalam tabung reaksi yang berisi ekstrak. Kocok perlahan agar tercampur merata.
 - 2) Teteskan 2-3 tetes H_2SO_4 pekat di sepanjang dinding tabung reaksi tanpa mengkocok.
 - 3) Uji positif ditunjukkan dengan warna hijau atau biru kehijauan.
- e. Pembuatan suspensi bakteri
- 1) Diambil koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, hingga mencapai kekeruhan yang sesuai dengan standar 0,5 McFarland.
 - 2) Ukur kekeruhan menggunakan alat Mc Farland Densitometer.

f. Pembuatan media agar *Muller Hinton*

- 1) Timbang serbuk media *Muller Hinton Agar* sebanyak 8,4 gram menggunakan neraca analitik.
- 2) Larutkan dengan 400 ml aquades pada erlenmeyer, diaduk hingga larut.
- 3) Lakukan pemanasan menggunakan hotplate sambil dilakukan pengadukan menggunakan magnetic stirer agar larutan homogen dengan sempurna.
- 4) Setelah homogen, sterilkan media selama 15 menit dalam autoklaf pada suhu 121°C.
- 5) Media *Muller Hinton Agar* 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.

g. Tahap pengujian

- 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 *Shigella dysenteriae* kepadatan 0,5 Mc Farland.
- 4) Kapas lidi steril diputar dan ditekan pada dinding tabung di atas batas cairan untuk menghindari kelebihan inokulum.
- 5) Goreskan 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) Cakram disk kosong disiapkan dan cakram disk ini ditetaskan 20 μ masing-masing konsentrasi ekstrak daun pepaya yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram disk.
- 8) Cakram antibioktik cloramphenikol yang berfungsi sebagai control positif dan blank disk sebagai control negatif pada media MHA.
- 9) Atur jarak cakram $\pm$ 15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan.
- 10) Kemudian, inkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- 11) Amati zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram, lalu diameter zona hambat diukur secara ventrikal maupun horizontal menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm), kemudian dikategorikan kekuatan daya antibakterinya.

h. Penentuan daya hambat antibakteri

Daya hambat ekstrak daun pepaya 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)

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Dalam penelitian ini bersifat kuantitatif, berupa data primer yang dikumpulkan melalui pengujian di laboratorium. Data primer tersebut merupakan hasil pengukuran diameter zona hambat yang muncul akibat pengaruh ekstrak daun pepaya terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

2. Teknik pengumpulan data

Melalui eksperimen laboratorium dengan mengukur diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun pepaya terhadap *Shigella dysenteriae* menggunakan jangka sorong. Hasil pengukuran tersebut dinyatakan dalam satuan milimeter (mm).

3. Instrument pengumpulan data

Alat pengumpulan data pada penelitian ini berupa:

1. Jangka sorong, digunakan untuk mengukur ukuran diameter area bebas pertumbuhan bakteri.
2. Pulpen, berfungsi mencatat hasil pengukuran area penghambatan.
3. Kamera, digunakan mendokumentasikan proses penelitian.

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diperoleh melalui percobaan di laboratorium dengan menguji kemampuan ekstrak daun pepaya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Pengukuran dilakukan berdasarkan diameter zona hambat yang dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Selanjutnya, data tersebut diolah menggunakan metode tabulasi dalam bentuk tabel naratif.

2. Analisis data

Analisis data secara kuantitatif, yang dilakukan melalui uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer. Proses analisis data melalui tiga tahapan, di antaranya:

- a. Uji statistik *Saphiro Wilk* digunakan untuk mengevaluasi apakah data memiliki sebaran normal atau tidak.
- b. Uji statistik *One Way ANOVA* diterapkan untuk mengevaluasi perbedaan diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang disebabkan oleh pemberian ekstrak daun pepaya pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%, dengan ketentuan data harus berdistribusi normal.
- c. Uji statistik LSD (Least Significant Deference) digunakan untuk menentukan perbedaan signifikan antara zona hambat pada setiap konsentrasi ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*, dengan asumsi bahwa data yang dianalisis mengikuti distribusi normal.

H. Etika Penelitian

Dalam melakukan seluruh rangkaian penelitian, pentingnya menerapkan prinsip-prinsip dalam etika penelitian:

1. Prinsip berbuat baik (beneficence) dan tidak merugikan

Menerapkan prinsip etika berupa beneficence, yang berarti mengambil tindakan yang bermanfaat dan meminimalkan potensi kerugian bagi pihak lain. Selain itu, prinsip non-maleficence juga diterapkan untuk memastikan bahwa subjek tidak mengalami kerugian dan mendapatkan perlindungan.

2. Prinsip keadilan (justice)

Prinsip ini menegaskan setiap partisipan berhak mendapat perlakuan yang setara, baik pada tahap sebelum, selama, maupun setelah pelaksanaan penelitian.

3. Prinsip penghormatan terhadap martabat manusia (respect for persons)

Prinsip ini menunjukkan penghormatan terhadap martabat setiap makhluk yang memiliki kebebasan dalam mengambil keputusan serta bertanggung jawab atas pilihannya sendiri.