

BAB IV METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *True Experimental* dengan menggunakan rancangan penelitian yaitu *Posttest Only Control Group Design* yang bertujuan untuk mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok tersebut dengan kelompok kontrol (Noor, 2012). Bentuk rancangan pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar:

Perlakuan		<i>Posstest</i>
R1(Kelompok eksperimen)	X	02
R2(Kelompok Kontrol)	-	02

Gambar 5. Desain Penelitian *Posttest Only Control Group Design*

Keterangan:

R1 (Random 1) : Kelompok eksperimen, dalam penelitian ini yaitu berbagai konsentrasi dari ekstrak etanol biji buah pepaya konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

R2 (Random 2) : Kelompok kontrol, dalam penelitian ini adalah etanol 96%.

X (Exposure) : Perlakuan (Intervensi)

02(Observasi) : Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

B. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi, Laboratorium Kimia Dasar dan Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Denpasar.

2. Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai bulan Mei 2019.

C. Sampel Penelitian dan Unit Analisis

1. Sampel penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji buah pepaya diperoleh dari biji buah pepaya dengan kriteria inklusi biji pepaya California muda berwarna putih, berbentuk bulat, berukuran 0.4 – 0.7 cm, tidak berjamur dan sampel ini diambil di Desa Riang Gede, Tabanan. Sedangkan kriteria eksklusi yaitu biji buah pepaya dari buah pepaya muda yang layu dan tidak segar, berwarna hitam, dan berjamur yang tidak sesuai dengan kriteria yang ditentukan peneliti.

2. Besar sampel penelitian

Dari proses ekstraksi didapatkan ekstrak etanol biji buah pepaya dengan konsentrasi 100% yang digunakan sebagai stok sampel. Ekstrak biji buah pepaya diuji dengan 4 perlakuan yaitu menjadi variasi konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80% (b/v) yang dibuat dengan mengencerkan stok sampel menggunakan pelarut etanol 96%. Dimana untuk konsentrasi 20% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,2 gram, konsentrasi 40% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,4 gram, konsentrasi 60% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,6 gram, dan konsentrasi 80% massa ekstrak yang diperlukan yaitu 0,8 gram sehingga massa total ekstrak

yang diperlukan untuk semua variasi dalam konsentrasi yaitu 2.0 gram ekstrak biji buah pepaya pekat. Sebagai kelompok kontrol digunakan etanol 96%.

Menurut Hanafiah, (2016) dalam penentuan pengulangan dapat dihitung berdasarkan jumlah konsentrasi yang digunakan dan jumlah kelompok kontrol. Dalam penelitian ini digunakan 4 perlakuan konsentrasi dan 1 perlakuan kontrol. Sehingga total perlakuan dalam penelitian ini adalah 5 perlakuan. Dalam penelitian ini masing-masing perlakuan diulang dengan jumlah yang dapat ditentukan dari persamaan berikut:

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

Keterangan:

r = jumlah ulangan

t = jumlah perlakuan

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

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

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

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75$$

$$r \geq 5 \text{ (dibulatkan)}$$

Berdasarkan perhitungan tersebut, pengulangan yang dapat dilakukan dalam penelitian ini adalah lebih dari atau sama dengan lima 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, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah lima kali, sehingga diperoleh jumlah pemeriksaan sebesar 25 sampel. Syarat minimal jumlah pengulangan yang bisa dilakukan untuk percobaan laboratorium adalah cukup tiga kali pengulangan, maka pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini sudah memenuhi syarat

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 *Klebsiella pneumoniae* pada variasi konsentrasi ekstrak etanol biji buah pepaya dengan lima jenis perlakuan konsentrasi yaitu 20%, 40%, 60%, dan 80%. Konsentrasi ini dipilih untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Kelompok kontrol yang digunakan adalah etanol 96%.

D. Alat dan Bahan

1. Alat

Blender (miyako) (1 buah), tabung vial (1 buah), tempayan (1 buah), neraca analitik (Radwag) (1 buah), pipet ukur (Iwaki- Pyrex®) 1 ml dan 10 ml (masing- masing 1 buah), mikropipet 20µl – 1000µl (secorex) (masing--masing 1 buah) , ball pipet (b&n ballpipet) (1 buah), gelas ukur (Iwaki-Pyrex®) 250ml (1 buah), evaporator (Buchi I-300) (1buah), beaker glass (Iwaki-Pyrex®) 500

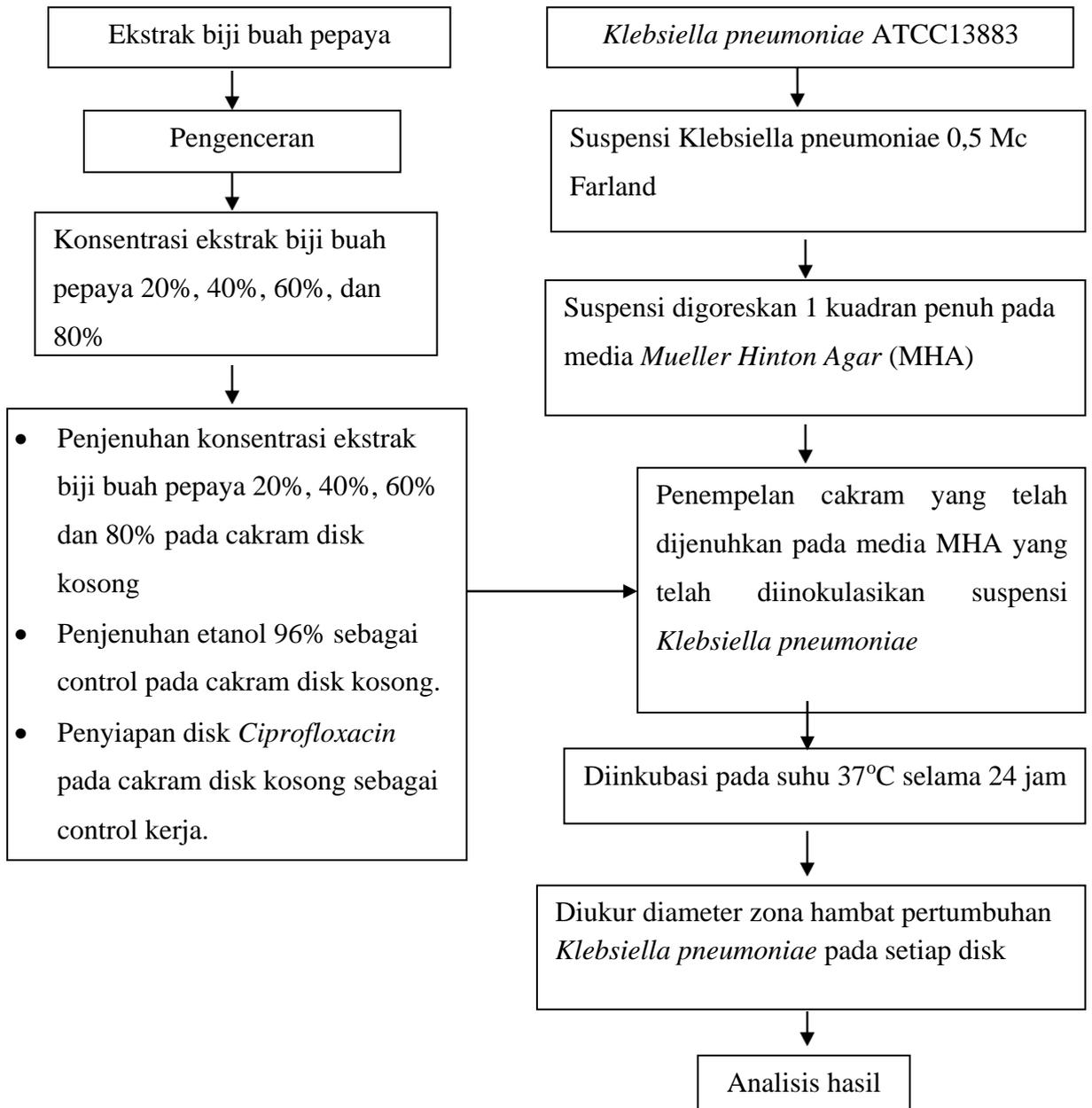
ml dan 1000 ml (masing-masing 1 buah), Erlenmeyer (Iwaki-Pyrex®) 250 mL dan 500 mL (masing-masing 1 buah), tabung reaksi (Iwaki-Pyrex®) (12 buah), rak tabung reaksi (1 buah), ose (1 buah), hotplate (1 buah), magnetic stirrer (1 buah), lampu spritus (1 buah), petridish steril (18 buah), biosafety cabinet (Biobase), Mc Farland densitometer (Biosan) (1 buah), jangka sorong (1 buah), inkubator (merk *Esco Isotherm* dengan spesifikasi: volume 110 L (3.9 cu. ft), *range* suhu +7.5°C - 300°C, beban maksimal 30 kg, berat 75 kg, dimensi eksternal 710 x 587 x 785 mm, dimensi internal 560 x 400 x 490 mm) (1 buah), oven (Wagtech) dan autoclave (merk Tomy ES-215 dengan spesifikasi: *range* suhu sterilisasi 105 – 123°C, *range* tekanan 0 - 127 kPa/max 147 kPa, sumber panas 1.5 kW, kapasitas *chamber* 248 x 543mm/25 ℓ, berat 50 kg, dimensi unit utama 400/460/920 mm), refrigerator (1 buah).

2. Bahan

Biji buah papaya 1 kg, Aquadest steril (Brataco) 1000 ml, Bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, media MHA (oxoid), standar Mac Farland 0,5%, NaCl (Merk) fisiologis 0,9%, cakram kosong (32 buah), cakram antibiotik ciprofloxacin (10 buah), kertas saring, lidi kapas steril (1 buah), etanol 96% (2000 ml), aluminium foil, kapas, dan tabung eppendorf.

E. Kerangka Kerja Dan Prosedur Kerja

1. Kerangka Kerja



Gambar 6. Kerangka kerja uji aktivitas antibakteri

Keterangan gambar :

Ekstrak biji buah pepaya dilakukan pengenceran dan dibuat konsentrasi ekstrak biji buah pepaya 20%, 40%, 60%, dan 80%. Penjujukan masing – masing konsentrasi ekstrak biji buah pepaya pada cakram disk kosong. Penjujukan etanol 96% sebagai control pada cakram disk kosong, dan penjujukan disk *Ciprofloxacin* pada cakram disk kosong sebagai control kerja. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 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 dan dianalisis menggunakan uji statistik dengan bantuan perangkat lunak komputer.

2. Prosedur kerja

a. Persiapan sampel

1) Pembuatan ekstrak biji buah pepaya dengan modifikasi metode maserasi menurut (Kabbashi *et al.*, 2015)

- a) Diambil biji buah pepaya sebanyak 1 Kg yang sesuai dengan kriteria sampel yang sudah ditentukan peneliti
- b) Biji buah pepaya dibersihkan dengan cara dicuci dengan air bersih dan ditempatkan di tempayan untuk meniriskan air
- c) Dikeringkan biji buah pepaya dengan menggunakan oven dengan suhu 105°C selama 4 jam

- d) Setelah kering, kemudian dihaluskan dengan blender dan disaring, serbuk yang diperoleh selanjutnya digunakan untuk penelitian
 - e) Dihitung kadar air pada simplisia biji buah pepaya (syarat baku kadar air simplisia adalah < 10%)
 - f) Serbuk biji buah pepaya ditimbang sebanyak 150 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas beaker
 - g) Ditambahkan dengan etanol 96% sebanyak 900 mL , hingga serbuk biji buah pepaya terendam sempurna, kemudian didiamkan selama 7 hari terlindung dari sinar matahari sambil diaduk dengan stirer magnetik kira-kira 8 jam perhari.
 - h) Sesudah 7 hari, hasil maserasi disaring, filtrat ditampung kedalam wadah (botol kaca). Residu dari penyaringan dimaserasi kembali dengan menambahkan etanol sampai simplisia terendam (± 500 mL). Ditutup rapat dan dibiarkan selama 7 hari terlindungi dari cahaya matahari sambil dibantu pengadukan menggunakan *magnetic stirrer* selama 8 jam setiap harinya.
 - i) Sesudah 7 hari, hasil maserasi kembali disaring dan filtratnya ditampung kedalam wadah (botol kaca).
 - j) Semua filtrate digabung dan diuapkan menggunakan evaporator (suhu 40 – 60°C) sampai didapatkan ekstrakkental konsentrasi 100%.
 - k) Ekstrak kental ditimbang dengan neraca analitik untuk mengetahui massa total dari ekstrak yang diperoleh.
- 2) Pembuatan konsentrasi ekstrak biji buah pepaya**
- a) Konsentrasi ekstrak biji buah pepaya yang digunakan adalah 20%, 40%,

60% dan 80%. Masing - masing konsentrasi tersebut dibuat dengan cara penimbangan dan pengenceran ekstrak biji buah pepaya pekat (konsentrasi 100%) dengan pelarut etanol 96%. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak dilakukan dalam tabung eppendorf dengan volume total 1ml.

- b) Pengenceran dilakukan dengan pembuatan variasi konsentrasi ekstrak biji buah pepaya menggunakan presentase perbandingan konsentrasi %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

- c) Perbandingan masing-masing konsentrasi dari ekstrak pekat (gram) dengan pelarut etanol 96% (ml) adalah sebagai berikut : Adapun jumlah ekstrak biji buah pepaya konsentrasi 100% yang diperlukan untuk masing-masing konsentrasi adalah:
1. Konsentrasi 80% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,8 gram ekstrak biji buah pepaya konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol 96% hingga volume 1 ml.
 2. Konsentrasi 60% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,6 gram ekstrak biji buah pepaya konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol 96% hingga volume 1 ml.
 3. Konsentrasi 40% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,4 gram ekstrak biji buah pepaya konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol 96% hingga

volume 1 ml.

4. Konsentrasi 20% disiapkan dengan cara mencampurkan 0,2 gram ekstrak biji buah pepaya konsentrasi 100% dan ditambahkan etanol 96% hingga volume 1 ml.
- d) Campuran pada masing-masing konsentrasi dihomogenkan dan disimpan pada tabung eppendorf.

3) Pembuatan suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

- a) Diambil koloni bakteri *Klebsiella pneumoniae* dari biakan murni dan disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 ml larutan NaCl fisiologis 0,85%.
- b) Suspensi dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5%.
- c) Suspensi diukur dengan menggunakan Mc Farland densitometer.

4) Pembuatan media *Mueller Hinton Agar (MHA)*

- a) Bubuk media *Mueller Hinton Agar (MHA)* ditimbang sebanyak 9,5 gram menggunakan neraca analitik dan setelah proses penimbangan bubuk media dipindahkan kedalam Erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuadest sebanyak 250 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.

b. Tahap pemeriksaan (Vandeppite dkk., 2011).

- 1) Suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* dengan kepekatan Mc Farland 0,5% disiapkan.
- 2) Swab kapas steril disiapkan dan dicelupkan ke dalam suspensi bakteri. Setelah suspensi bakteri meresap, swab kapas steril diangkat dan diperas dengan cara menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil diputar-putar
- 3) Swab kapas yang telah dicelupkan tadi disebar dengan cara digores-goreskan pada permukaan media MHA sampai seluruh permukaan tertutup rapat dengan goresan-goresan. Goresan dilakukan dengan merata hingga menutup seluruh permukaan media.
- 4) Media MHA didiamkan 5-15 menit agar suspensi bakteri meresap ke dalam.
- 5) Cakram *disk* kosong disiapkan dan cakram *disk* ini diteteskan 20 μ l masing-masing konsentrasi ekstrak biji buah pepaya yaitu konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% hingga seluruh cairan meresap ke dalam cakram *disk*
- 6) Masing-masing cakram yang telah jenuh dengan konsentrasi ekstrak biji buah pepaya kemudian ditempelkan pada permukaan media MHA yang telah

digoreskan suspensi bakteri dan sedikit ditekan dengan pinset sampai melekat sempurna

- 7) Cakram antibiotik *Ciprofloxacin* yang berfungsi sebagai control positif dan cakram disk yang telah dijenuhkan dengan etanol 96% sebagai control negatif ditempelkan pada media MHA.
- 8) Atur jarak cakram ± 15 mm antara cakram yang lainnya dan cakram yang sudah ditempelkan pada permukaan media tidak boleh dipindahkan ataupun digeser.
- 9) Media yang telah ditanami cakram diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan posisi terbalik pada suhu 37°C
- 10) Setelah diinkubasi diukur zona bening yang terbentuk dengan mistar dan dikonversi ke satuan mm (milimeter).

c. 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 mistar dan dikonversi ke dalam satuan mm.

F. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis data

Jenis data yang digunakan adalah data primer. 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 *Klebsiella pneumoniae* pada berbagai variasi konsentrasi ekstrak etanol biji buah pepaya.

2. Teknik pengumpulan data

Cara pengumpulan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan melakukan observasi. Pengukuran dilakukan pada diameter zona hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol biji buah pepaya. Hasil pengukuran diameter zona hambat tersebut menunjukkan adanya aktivitas penghambatan yang dinyatakan dalam milimeter (mm).

G. Pengolahan dan Analisis Data

1. Teknik pengolahan data

Data diameter zona hambat yang diperoleh melalui eksperimen perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak etanol biji buah pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada berbagai konsentrasi 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:

- a. Untuk menguji data berdistribusi normal atau tidak digunakan uji kolmogorov smirnov.
- b. Apabila data berdistribusi normal digunakan uji one way anova, untuk mengetahui perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumonia* dengan menggunakan ekstrak etanol biji buah pepaya antara konsentrasi 20%, 40%, 60%, dan 80%.

- c. Apabila data berdistribusi normal digunakan uji LSD (*Least Significant Deference*), untuk mengetahui perbedaan zona hambat antara masing-masing konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.