

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang diperoleh dari Desa Kopeng, Jawa Tengah pada bulan September 2018.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) yang diperoleh dari buah pisang raja yang sudah masak, lalu diambil bonggolnya, berwarna coklat, tidak terlalu muda, tidak busuk. Daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan ciri-ciri daun berwarna hijau tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) beserta kombinasinya.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi ekstrak bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel yang telah diklasifikasi dapat dibagi menjadi tiga macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel tergantung.

2.1 Variabel bebas. Merupakan variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu kombinasi ekstrak bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* Linn.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.).

2.2 Variabel terkontrol. Merupakan variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang akan diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti secara tepat. Variabel

terkendali dalam penelitian ini adalah ekstrak bonggol pisang raja, ekstrak daun pepaya, kemurnian bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, media, suhu kondisi laboratorium, sterilisasi, kondisi peneliti, dan metode penelitian.

2.3 Variabel tergantung. Merupakan titik pusat persoalan yang menjadi kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas kombinasi bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang dapat mempengaruhi KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari bakteti *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 pada media uji.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) adalah bonggol yang diperoleh dari buah pisang raja yang sudah matang lalu diambil bonggolnya berwarna coklat, tidak terlalu muda, tidak busuk, diperoleh dari Desa Kopeng, Jawa Tengah.

Kedua, daun pepaya (*Carica papaya* L.) adalah daun berwarna hijau tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda yang bebas dari penyakit diperoleh dari Desa Kopeng, Jawa Tengah.

Ketiga, serbuk bonggol pisang raja yang berwarna coklat, tidak busuk yang telah dicuci bersih menggunakan air mengalir hingga tidak ada kotoran dan debu yang menempel, setelah itu dikeringkan dibawah sinar matahari dan ditutupi menggunakan plastik hitam dan di oven pada suhu 50°C setelah sampel kering dihaluskan sehingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomer 40.

Keempat, serbuk daun pepaya adalah daun pepaya yang berwarna hijau tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua yang bebas dari penyakit yang telah diambil kemudian dicuci bersih menggunakan air mengalir hingga tidak ada kotoran dan debu yang menempel, setelah itu dikeringkan dalam alat oven pada suhu 50°C setelah sampel kering dihaluskan sehingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan nomer 40.

Kelima, ekstrak tunggal bonggol pisang raja adalah hasil maserasi dari 500 gram serbuk bonggol pisang raja dengan pelarut etanol 70%.

Keenam, ekstrak daun pepaya adalah hasil maserasi dari 500 gram serbuk daun pepaya dengan pelarut etanol 70%.

Ketujuh, kombinasi ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya 1 : 1 adalah hasil dari ekstrak etanol bonggol pisang raja sebanyak 1 gram : ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 1 gram dengan pelarut DMSO 1%.

Kedelapan, kombinasi ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya 1 : 3 adalah hasil dari ekstrak etanol bonggol pisang raja sebanyak 0,5 gram : ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 1,5 gram dengan pelarut DMSO 1%.

Kesembilan, kombinasi ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya 3 : 1 adalah hasil dari ekstrak etanol bonggol pisang raja sebanyak 1,5 gram : ekstrak etanol daun pepaya sebanyak 0,5 gram dengan pelarut DMSO 1%..

Kesepuluh, bakteri uji dari penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 yang diambil dari Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Kesebelas, pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dari ekstrak dengan membagi cawan petri kedalam 7 bagian yang berisi kontrol positif (+) ciprofloxasin, kontrol negatif (-) DMSO 1%, ekstrak etanol bonggol pisang raja, ekstrak etanol daun pepaya, kombinasi ekstrak etanol 70% bonggol pisang raja dan daun pepaya (1:1), (1:3) dan (3:1). Kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati zona hambat yang terbentuk dan diukur.

Keduabelas, penentuan aktivitas antibakteri dari ekstrak dengan cara metode dilusi yang pengujian dengan membuat konsentrasi ekstrak tunggal etanol bonggol pisang raja, ekstrak tunggal etanol daun pepaya dan kombinasi ekstrak etanol 70% bonggol pisang raja dan daun pepaya dengan perbandingan kombinasi (1:1); (1:3); (3:1) yang diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati dengan melihat taraf kekeruhan.

Ketigabelas, uji aktivitas antibakteri adalah uji dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi merupakan satu metode menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun. Konsentrasi dimulai dari kadar 50%; 25%; 12,5 % ; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39%; 0,19%; 0,09%.

Keempatbelas, KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) ditentukan dengan mengamati konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

yang ditandai dengan kejernihan. Penentuan nilai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) merupakan konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri dengan mengamati pertumbuhan bakteri pada medium yang kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C yang ditandai dengan ada tidak pertumbuhan bakteri.

Kelimabelas, dosis efektif adalah konsentrasi paling rendah yang dapat membunuh bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alat penggiling, timbangan analisa, oven, ayakan nomor 40, bejana maserasi, inkas, ose, platina, erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, cawan porselin, pipet (volume 1 ml dan 0,5 ml), cawan petri, corong pisah, kain flanel, kaca objek, kapas, corong kaca, tabung reaksi, inkubator, *wather bat*, *autoclaf*, kaca objek, lampu spirtus, alat *Moisture Balance*, *Rotary evaporator*, plat silika G F254, dan mikroskop.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) yang berwarna coklat dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang berwarna hijau dan masih segar. Medium yang digunakan dalam penelitian ini BHI (*Brain Heart Infusion*), VJA (*Vogel Jhonson Agar*), MHA dan plasma sitrat. Bakteri uji yang akan digunakan yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Bahan kimia yang digunakan meliputi etanol 70%, larutan Mayer, larutan Dragendorff, aquadest, kalium tellurite, hidrogen peroksida, pereaksi besi (III) klorida, sitoborat, LB, DMSO 1%, cat kristal violet, larutan lugol iodine dan safranin yang diperoleh dari toko bahan kimia yang beredar di daerah Surakarta dan dari Laboratorium Mikrobiologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan simplisia

Bonggol pisang raja dan daun pepaya diperoleh dari desa Kopeng, Jawa Tengah. Bonggol pisang raja diambil yang berwarna coklat diambil setelah buah pisang raja masak dan daun pepaya diambil yang berwarna hijau segar dan tidak terlalu tua.

2. Determinasi tanaman

Tahap pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah melakukan determinasi bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.). Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran sampel bonggol pisang raja dan daun pepaya berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

3. Penyiapan bahan tanaman

Tanaman pisang raja dan pepaya diambil dari daerah Kopeng, Jawa Tengah. Sampel yang digunakan adalah bonggol pisang raja yang diambil pada saat buah pisang sudah masak, dan daun pepaya yang diambil adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua berwarna hijau. Kemudian dicuci bersih dengan air mengalir dan dikeringkan.

3.1 Pengeringan dan pembuatan serbuk. Bonggol pisang raja dan daun pepaya dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 50°C. Bonggol pisang raja dan daun pepaya yang sudah kering diserbukkan dengan cara digiling kemudian diayak dengan menggunakan ayakan ukuran mesh no 40 lalu ditimbang. Selanjutnya hasil serbukan bonggol pisang raja dan daun pepaya disimpan dalam wadah yang kering dan tertutup rapat agar tidak terkena cemaran. Pembuatan serbuk bertujuan agar luas partikel bahan yang kontak dengan larutan penyari dapat diperluas sampai penyarian berlangsung secara selektif.

4. Pembuatan ekstrak etanol 70%

4.1 Pembuatan larutan ekstrak etanol bonggol pisang raja. Serbuk bonggol pisang raja ditimbang sebanyak 500 gram, dimasukkan dalam botol coklat dengan 3750 ml pelarut etanol 70% perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian

simplisia dimasukkan dalam 75 bagian cairan penyari, kemudian direndam selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh disaring, kemudian dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C (Sumarni 2010).

4.2 Pembuatan larutan ekstrak etanol daun pepaya. Serbuk daun pepaya ditimbang sebanyak 500 gram, dimasukkan dalam botol coklat dengan 3750 ml pelarut etanol 70% perbandingan 10:75 yaitu 10 bagian simplisia dimasukkan dalam 75 bagian cairan penyari, kemudian direndam selama 5 hari. Ekstrak yang diperoleh disaring, kemudian dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator* dengan suhu 65°C (Sumarni 2010).

5. Karakteristik ekstrak dan serbuk

5.1 Penetapan susut pengeringan. Penetapan susut pengeringan dilakukan terhadap ekstrak dan serbuk. Ekstrak dan serbuk ditimbang dengan seksama sebanyak 2 gram pada pan aluminium yang telah disediakan pada alat *moisture balance*. Parameter suhu diatur pada suhu 105°C dan ditunggu sampai alat menunjukkan hasil kemudian catat hasil yang tertera pada alat *moisture balance* (Setyawati 2018).

5.2 Penetapan kadar air. Disiapkan 200 ml toluen kemudian dituangkan dengan 10 ml, lalu dikocok, dibiarkan memisah dan lapisan air dibuang. Kemudian ekstrak dan serbuk bonggol pisang raja dan daun pepaya ditimbang dengan seksama dan dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Toluena jenuh air dimasukkan ke dalam labu alas bulat, rangkaian alat dipasang dan dipanaskan selama 15 menit. Jika semua air sudah tersuling bilas bagian dalam pendingin dengan toluen jenuh air dan dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Dibaca volume air dan toluen memisah sempurna dan dihitung kadar air dalam % v/b (Depkes RI 2013).

5.3 Bobot jenis. Penentuan bobot jenis ekstrak yaitu dengan cara kalibrasi bobot kering piknometer dan bobot air yang dididihkan pada suhu 25°C. Suhu ekstrak diatur $\pm 20^\circ\text{C}$ masukkan ke dalam piknometer, buang kelebihan ekstrak dan timbang. Kemudian hitung bobot jenis ekstrak.

6. Uji bebas etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya

Ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya masing-masing diuji tes bebas etanol dengan cara esterifikasi alkohol, dengan cara ditambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Tanda tidak terdapat alkohol yaitu jika tidak terdapat bau khas ester dalam ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya.

7. Identifikasi kandungan kimia ekstrak bonggol pisang raja dan daun pepaya

Identifikasi yang dilakukan dengan maksud untuk mengetahui kebenaran adanya kandungan kimia pada bonggol pisang raja dan daun pepaya. Identifikasi senyawa-senyawa meliputi senyawa, alkaloid, steroid, flavonoid, tanin, dan saponin yang dilakukan di laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Setia Budi.

7.1 Identifikasi senyawa alkaloid. Larutan cuplikan dibuat dengan cara maserasi. Menimbang 20 mg ekstrak daun pepaya kemudian dilarutkan dalam etanol 70%. Ekstrak digojok kemudian ditotolkan pada plat kromatografi. Plat dimasukkan dalam bejana pengembang yang telah jenuh dengan fase gerak toluen : etil asetat : dietil amin dengan perbandingan 7:2:1. Elusi sampai batas dan angkat kemudian keringkan. Diamati di UV 254 nm, sinar UV 366nm dan disemprot dengan pereaksi Dragendorff (Sari *et al.* 2010). Alkaloid dibawah sinar UV 254 nm akan terjadi pepadaman bercak, sedangkan pada UV 366 nm bercak akan berflouresensi biru, hijau biru atau ungu. Dan bila disemprot dengan pereaksi Dragendorff bercak akan berwarna coklat atau coklat orange (Lestari dan Yusup 2013).

7.2 Identifikasi senyawa flavonoid. Larutan cuplikan dibuat dengan cara maserasi. Menimbang 20 mg ekstrak daun pepaya kemudian dilarutkan dalam etanol 70%. Ekstrak digojok kemudian ditotolkan pada plat kromatografi. Plat dimasukkan dalam bejana pengembang yang telah jenuh dengan fase gerak etil asetat : asam formiat : asam asetat : air dengan perbandingan 100:11:11:27. Elusi sampai batas dan angkat kemudian keringkan. Diamati di UV 254 nm, sinar UV 366 nm dan disemprot dengan pereaksi sitroborat (Harborne 1987). Flavonoid

dibawah sinar UV 254 nm akan terjadi pepadaman bercak, sedangkan pada UV 366 nm bercak akan berflouresensi kuning gelap, hijau atau biru (Wagner 1984).

7.3 Identifikasi senyawa saponin. Sebanyak 20 mg ekstrak dilarutkan dalam etanol 70% kemudian ditotolkan pada KLT. Elusi dilakukan dengan kloroform: metanol: air dengan perbandingan 64:50:1. Plat dikeringkan dan diamati pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian disemprot menggunakan liberman bourchat, dioven pada suhu 110°C selama 10 menit, dan diamati pada cahaya tampak, UV 254 nm dan 366 nm. Positif saponin ditunjukkan dengan adanya noda berwarna merah jambu sampai ungu (Santos *et al.* 1978).

7.4 Identifikasi senyawa tanin. Sebanyak 20 mg ekstrak dilarutkan dalam etanol 70% kemudian ditotolkan pada plat KLT silika gel G 60 F254 dengan menggunakan mikro kapiler kurang lebih 1 cm dari tepi bawah plat KLT, kemudian dibiarkan kering. Plat KLT kemudian dimasukkan pada bejana kromatografi yang berisi eluen yaitu etil asetat: asam formiat: toluene : air dengan perbandingan 6:1,5:3:0,5. Dielusi sampai garis bataa pelat KLT dikeluarkan dari bejaa dan dikeringkan, bercak diamati dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm serta penampakan bercak FeCl₃ 1%.

8. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1,5 kg/cm². Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung.

9. Pembuatan suspensi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil kurang lebih 2 Ose dan dimasukkan pada media BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Suspensi kemudian diambil 100-200 μ l dimasukkan kedalam tabung berisi 1 ml BHI, diinkubasi pada suhu 37°C selama 3-5 jam. Suspensi yang didapat diencerkan dengan larutan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan yang disamakan dengan Mc. Farland 1,5 X 10⁸ CFU/ml (Sari *et al.* 2010). Suspensi diencerkan sebanyak 1 : 1000 untuk pengujian dilusi.

10. Identifikasi bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

10.1 Identifikasi bakteri secara makroskopis. Suspensi bakteri diinokulasi pada media *Vogel Johnson Agar* (VJA) yang sudah ditambahkan kalium tellurit 3% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna medium sekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan warna kuning disekitar koloni disebabkan karena adanya indikator fenol red, sedangkan warna hitam pada koloni disebabkan *Staphylococcus aureus* kalium tellurit menjadi metalik telurit.

10.2 Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* menggunakan Gram A (cat kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodin sebagai mordan), Gram C (etanol : aseton = 1 : 1 sebagai peluntur), Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan Gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan. Preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit, dicuci dengan air mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci menggunakan air mengalir kemudian preparat dikeringkan. Hasil positif dari *Staphylococcus aureus* ditunjukkan dengan warna ungu, berbentuk bulat, dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati dibawah mikroskop (Supartono 2006).

10.3 Identifikasi biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada medium nutrisi cair dengan penambahan 2 tetes hidrogen peroksida 3%. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂O dan O₂ hasil positif bila terlihat gelembung udara disekitar koloni, hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase (Jawetz et al 2007).

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang telah diberi sitrat ditambah 1 ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung diperiksa dengan melihat pembentukan selama 1-4 jam. Hasil positif kuat jika tabung terdapat gumpalan putih (Lay 1994).

10.4 Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Penelitian ini menggunakan cawan petri yang berisi MHA. Bakteri diambil dari media BHI dengan menggunakan kapas lidi steril sebanyak satu kali kemudian dioleskan pada cawan petri yang berisi MHA 50 ml dan tunggu sampai bakteri berdifusi pada media. Setelah suspensi bakteri yang setara dengan Mc Farland 0,5 x 10⁻⁸ dioleskan dengan rata pada cawan petri yang berisi MHA, kemudian cawan petri dibagi kedalam 7 bagian.

Dalam penelitian ini menggunakan kontrol positif ciprofloxasin. Menurut Dini *et al.* (2019) resistensi yang tinggi dari bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik ampicillin sulbactam, sedikit resistensi terhadap kloramfenikol, kotrimoksazol dan ciprofloxasin. Kontrol negatif (-) yang digunakan adalah DMSO 1%, ekstrak etanol bonggol pisang raja dan ekstrak etanol daun pepaya dengan konsentrasi 50%, kombinasi ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya (1:1), (1:3), dan (3:1).

Pembuatan konsentrasi ekstrak tunggal bonggol pisang raja dan daun pepaya konsentrasi 50% yaitu dengan cara masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 2 ml DMSO 1%. Sedangkan untuk pembuatan ekstrak kombinasi bonggol pisang dan daun pepaya perbandingan 1:1 dengan cara menimbang masing-masing 1 gram ekstrak dan dilarutkan masing-masing dalam 2 ml DMSO 1% lalu dihomogenkan. Untuk perbandingan 1:3 yaitu dengan cara menimbang 0,5 gram ekstrak bonggol pisang dalam 1 ml DMSO 1% dan 1,5 gram ekstrak daun pepaya dalam 3 ml DMSO 1%. Untuk perbandingan 3:1 yaitu dengan cara menimbang 1,5 gram ekstrak bonggol pisang dalam 3 ml DMSO 1% dan 0,5 gram ekstrak daun pepaya dalam 1 ml DMSO 1%. Setelah itu masing-masing larutan dipipet sebanyak 50 µg diteteskan pada cakram disk kosong ditunggu selama 3 menit dan ditempelkan pada media MHA yang telah

diolesi bakteri uji dengan menggunakan pinset. Cawan petri diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam dilakukan inkubasi, amati zona bening yang terbentuk dan ukur. Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan penggaris dengan ketelitian 1 mm. Hasil dari pengukuran tersebut dijumlahkan dan dibagi dengan banyaknya pengukuran untuk mendapatkan besarnya zona hambat yang terbentuk.

10.5 Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi. Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode dilusi yang bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada sediaan ekstrak. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah bahan uji yang dapat membunuh bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri dari 12 tabung steril. Tabung terakhir sebagai kontrol positif berisi suspensi bakteri uji. Tabung kedua sampai kesepuluh adalah tabung seri pengenceran dengan konsentrasi masing-masing 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,12%; 1,56%; 0,78%; 0,39; 0,19%; 0,09%.

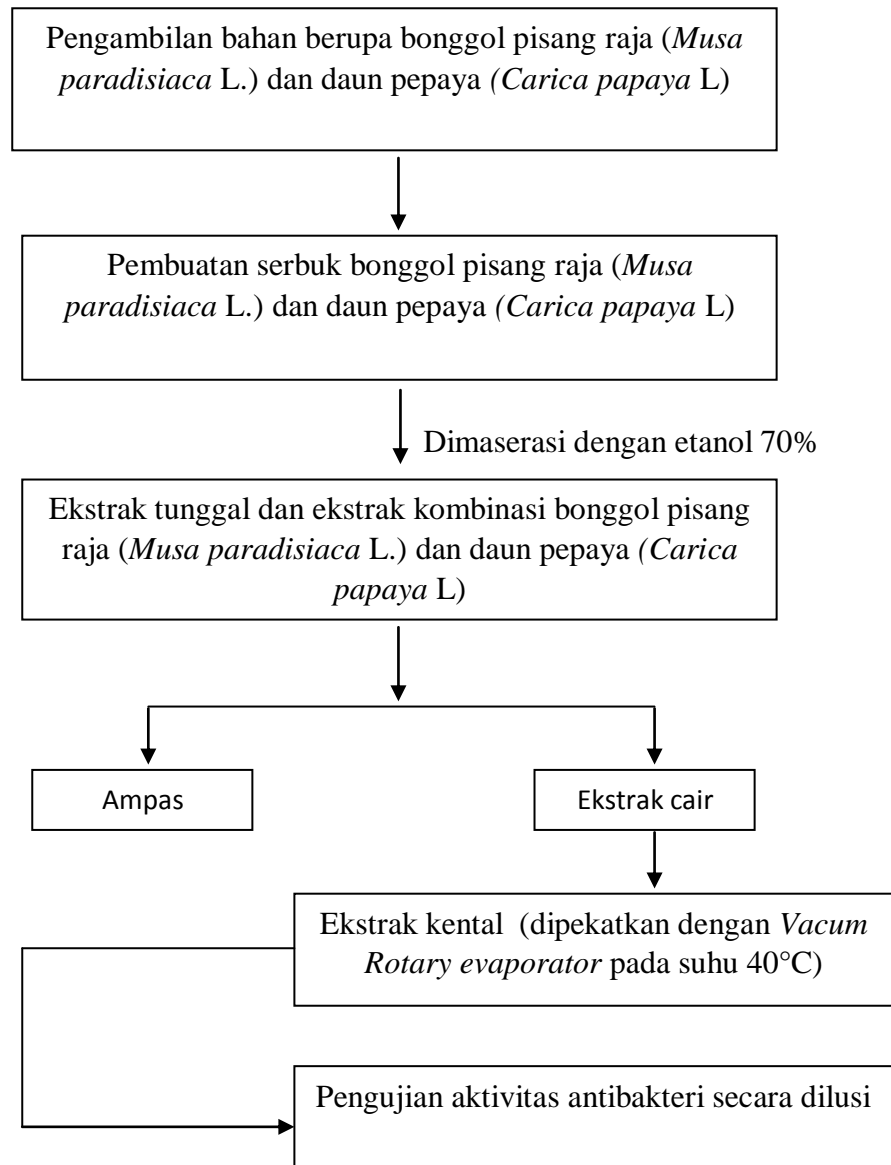
Media BHI dimasukkan ke dalam masing-masing tabung uji secara aseptik sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11 kecuali pada tabung pertama. Selanjutnya tabung pertama diberi larutan ekstrak sebanyak 1 ml dan larutan ekstrak sebanyak 0,5 ml pada tabung ke 2 dan tabung ke 3. Kemudian pipet sebanyak 0,5 ml dari tabung 3 dan dimasukkan dalam tabung 4 dan homogenkan hingga merata begitu seterusnya sampai tabung ke 11 lalu dibuang. Selanjutnya dimasukkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 0,5 ml yaitu sebanyak $1,5 \times 10^8$ koloni pada tabung ke 2 sampai tabung ke 11. Kemudian seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KBM ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif lalu diinkubasi pada suhu kamar 37°C selama 18-24 jam. Inokulasi pada media ini dilakukan untuk mengetahui ada atau tidaknya pertumbuhan dari bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Konsentrasi ekstrak yang dapat membunuh bakteri ditandai dengan adanya daerah yang tidak ditumbuhi koloni bakteri. Konsentrasi ekstrak tersebut dikatakan sebagai KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum).

E. Analisis Hasil

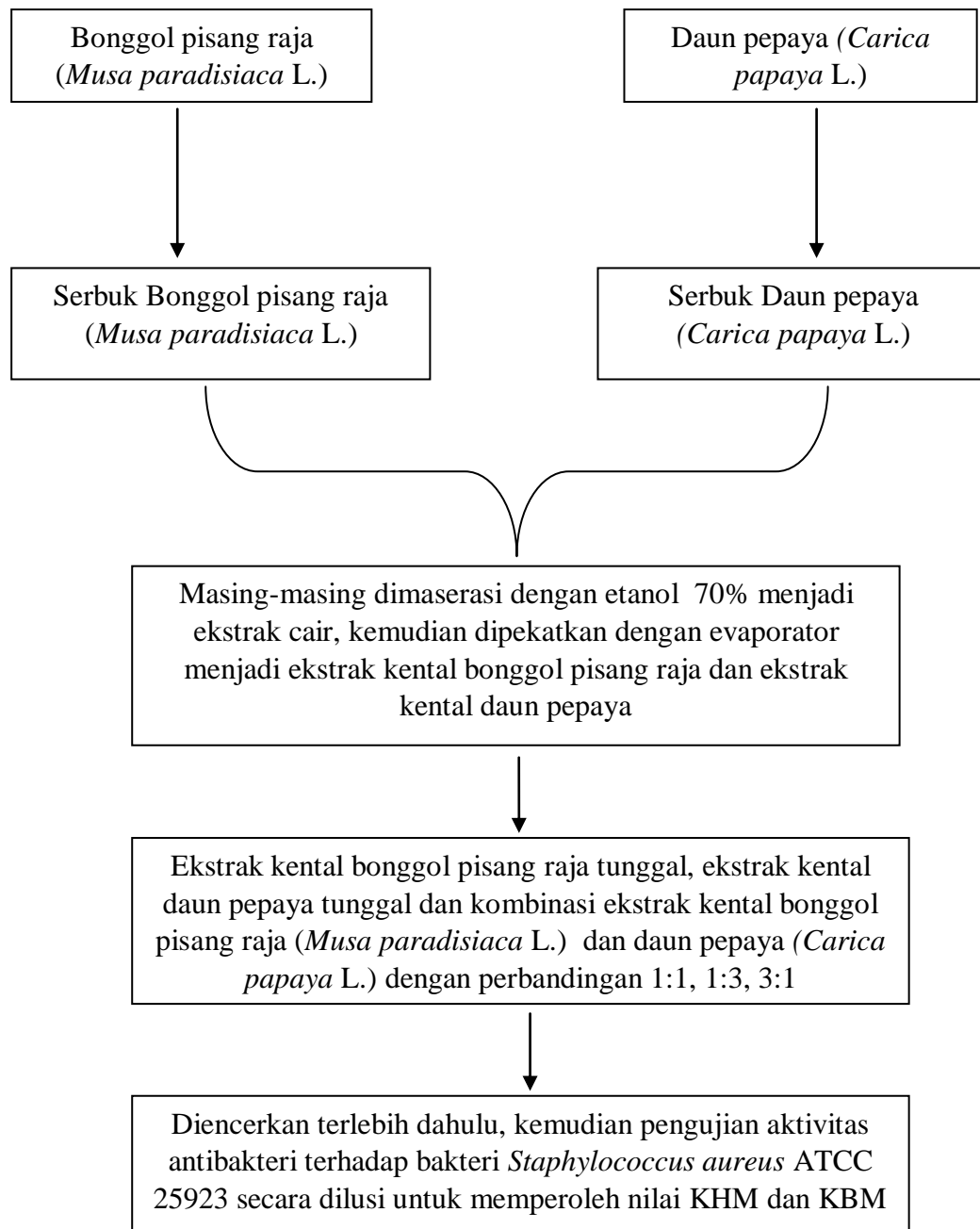
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan membandingkan hasil KHM dan KBM dari ekstrak bonggol pisang raja, ekstrak etanol daun pepaya, kombinasi ekstrak etanol bonggol pisang raja dan daun pepaya dengan perbandingan 1:1 , 1:3 , dan 3:1 terhadap pertumbuhan bakteri uji *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Data yang diperoleh dianalisa dengan uji ANOVA satu jalan.

F. Skema Jalannya Penelitian



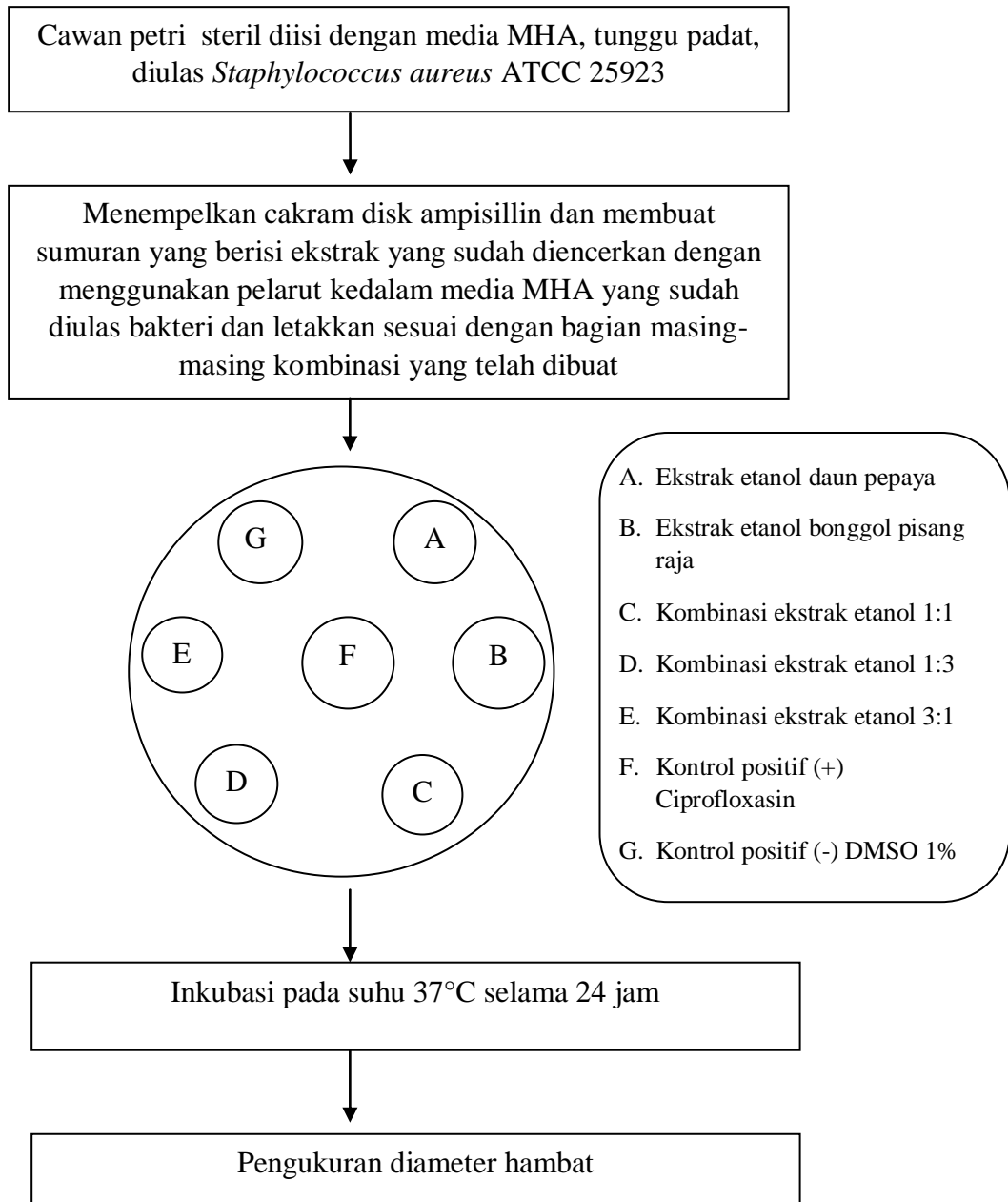
Gambar 3. Skema jalannya penelitian

G. Skema pembuatan kombinasi ekstrak etanol bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) daun pepaya (*Carica papaya* L.)



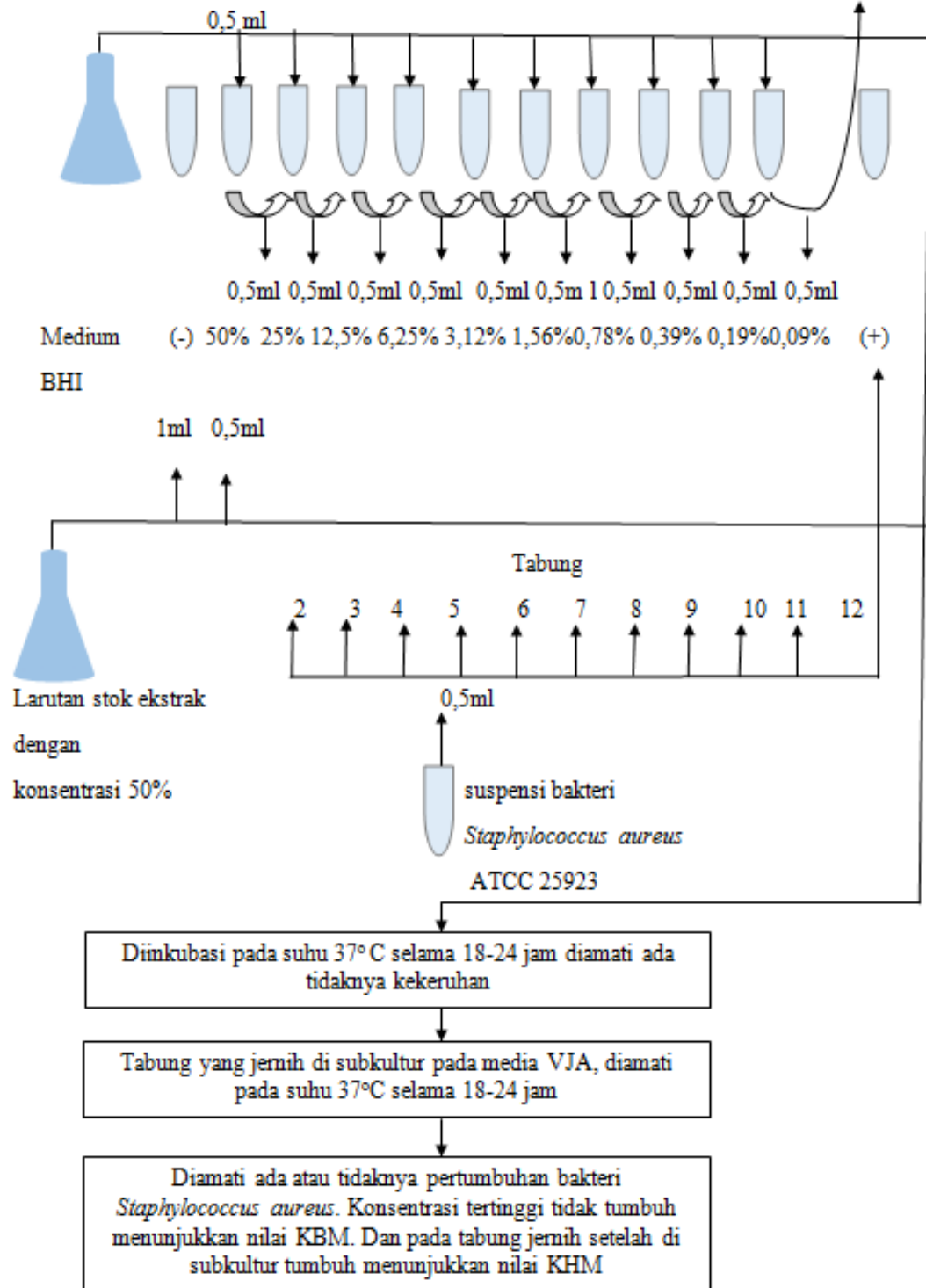
Gambar 4. Skema pembuatan kombinasi ekstrak etanol bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) daun pepaya (*Carica papaya* L.)

H. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Secara Difusi



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

I. Skema Pengujian Aktivitas Antibakteri Secara Dilusi Bonggol Pisang Raja (*Musa paradisiaca* L.) dan Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) (3:1).



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi bonggol pisang raja (*Musa paradisiaca* L.) dan daun pepaya (*Carica papaya* L.) (3:1)