

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah biji buah pepaya (*Carica Papaya L*) yang di ambil dari Dusun Gondang Legi, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta

2. Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah biji pepaya (*Carica Papaya L*) yang di ambil yaitu biji pepaya yang berwarna hitam dari Dusun Gondang Legi, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian adalah ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan air yang diperoleh dari biji buah pepaya (*Carica Papaya L*).

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan air dari ekstrak etanol biji buah pepaya (*Carica Papaya L*) terhadap bakteri *Escherchia coli* ATCC 25992.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terdahulu dapat diklasifikasikan kedalam berbagai macam variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini ialah variabel yang dapat diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel dalam penelitian ini konsentrasi ekstrak dan fraksi biji buah pepaya yang digunakan sebagai uji antibakteri *Escherchia coli* ATCC 25992.

Variabel terkontrol yang digunakan berupa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25992, kondisi laboratorium (meliputi kondisi alat dan bahan harus steril) serta media yang digunakan dalam penelitian.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25992 setelah diberi perlakuan fraksi etil asetat ekstrak etanol biji pepaya (*Carica Papaya* L).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, biji buah pepaya adalah simplisia dari tanaman pepaya (*Carica Papaya* L) diambil dari Dusun Gondang Legi, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta.

Kedua, serbuk biji buah pepaya adalah yang diambil dari buah pepaya yaitu biji yang sudah hitam. Kemudian dicuci untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel dan dikeringkan dengan oven lalu dibuat serbuk, diayak pada ayakan no.40.

Ketiga, ekstrak etanol 70% biji buah pepaya adalah hasil yang diperoleh dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 70% kemudian dipekatkan dengan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak biji buah pepaya.

Keempat, residu *n*-heksan adalah hasil fraksi dari etanol 70% biji buah pepaya yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan sebagai pelarut non polar sehingga dapatlah fraksi *n*-heksan dan residu *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah fraksi yang didapat dari residu fraksi *n*-heksan dengan menggunakan etil asetat sebagai pelarut semi polar sehingga dapatlah fraksi etil asetat.

Keenam, bakteri yang dipakai adalah *Escherichia coli* ATCC 25992 didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, metode difusi adalah pengujian aktivitas antibakteri untuk menentukan luas zona diameter hambat terhadap bakteri uji Konsentrasi fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan air ekstrak etanol biji buah pepaya adalah 10%, 5%, 1%. Kontrol positif yang digunakan adalah kotrimoksazol dan kontrol negatif adalah DMSO 1%.

Kedelapan, metode dilusi adalah pengujian aktivitas antibakteri untuk menentukan Konsentrasi Hambat minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh

Minimum (KBM) dengan mengukur diameter zona hambatnya. Seri pengenceran metode dilusi dalam berbagai konsentrasi sebagai berikut 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,62%; 0,31%; 0,15%; 0,07%; 0,03%; 0,01%; kontrol negatif adalah ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan kotrimoksazol.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat untuk pembuatan ekstrak biji pepaya oven dengan suhu rendah dan konstan, blender untuk membuat serbuk, alat maserasi berupa botol mulut lebar warna coklat, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, corong kaca, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass, cawan penguap, corong pisah, penangas uap, kertas saring, *Moisture Balance*, evaporator, autoklaf, inkubator, kotak septis (enkas), jarum ose, lampu spiritus, korek api, pipet ukur, cawan petri, dan spuit.

2. Bahan

Bahan uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah biji buah pepaya diambil dari Dusun Gondang Legi, Ngemplak, Sleman, Yogyakarta

Bahan kimia yang digunakan untuk penelitian ini adalah etanol 70%, aquadest, *n*-heksan, etil asetat, DMSO, kotrimoksazol, spiritus, CH₃COOH, H₂SO₄.

Media yang digunakan untuk penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Sulfide Indol Motilitas* (SIM), *Kligen Iron Agar* (KIA), *Lysin Iron Agar* (LIA), Citrat, *Natrium Agar* (NA), *Endo Agar* (EA) *Mc Farland* kemudian diekstrak dengan cara maserasi. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah aquadest, media *kliger Iron Agar* (KIA), dan larutan spritus.

Bakteri uji yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Escherchia coli* ATCC 25992 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman bertujuan untuk menetapkan kebenaran sampel berdasarkan ciri-ciri morfologi tanaman dari biji buah pepaya. Determinasi tanaman buah pepaya dilakukan di Laboratorium Fitokimia, Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengumpulan, pengeringan dan Pembuatan serbuk

Penelitian ini, sampel yang diteliti adalah biji pepaya yang diperoleh dari Mojosongo, Jawa Tengah. Sampel yang telah dikumpulkan disortasi basah lalu dicuci. Kemudian, sampel dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50⁰C. Kemudian dilakukan disortasi kering dan diserbukkan menggunakan mesin serbuk lalu diayak menggunakan pengayak no 40 hingga didapat serbuk biji pepaya yang diinginkan (Handayani & Srivyna 2016).

3. Penetapan susut pengeringan

Penetapan susut pengeringan serbuk biji pepaya dengan cara menimbang serbuk biji pepaya sebanyak 2 gram. Susut pengeringan diukur menggunakan alat *Moisture Balance* yang dilakukan sebanyak 3 kali. Suhu diatur 105^o dan mulai mengukur susut pengeringan, ditunggu sampai alat berbunyi yang menandakan analisis telah selesai.

4. Pembuatan ekstrak etanol

Ekstraksi serbuk biji pepaya dilakukan dengan metode maserasi dengan perbandingan (1 :7,5). Serbuk biji pepaya sebanyak 700 gram dimasukkan kedalam bejana maserasi kemudian ditambahkan etanol 70% sebanyak 5.250 ml ditutup dan direndam selama 5 hari dengan pengocokan berulang. Hasil disaring dengan kain flanel lalu dipekatkan dengan evaporator pada suhu 40^oC sehingga menjadi ekstrak etanol biji pepaya (Rohidi 2013).

5. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan esterifikasi yaitu ekstrak ditambah CH₃COOH dan H₂SO₄ kemudian dipanaskan. Uji positif bebas etanol jika tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol.

6. Fraksinasi

Pembuatan fraksinasi yaitu dengan menimbang ekstrak etanol biji pepaya 10 gr lalu dilarutkan dengan pelarut air 75 ml, difraksinasi sebanyak 3 kali dengan pelarut *n*-heksan masing-masing 75 ml menggunakan corong pisah. Fraksi *n*-heksan terletak diatas dan fase air terletak dibawah. Fraksi *n*-heksan yang didapat dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C.

Residu yang didapat dari fraksi *n*-heksan difraksinasi kembali 3 kali dengan pelarut etil asetat 75 ml menggunakan corong pisah. Fraksi etil asetat terletak diatas dan fase air terletak dibawah. Hasil fraksi etil asetat yang didapat dipekatkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C. Residu yang didapat dari fraksi etil asetat adalah fraksi air kemudian dipekatkan menggunakan evaporator 40°C (Fernandes 2014).

7. Identifikasi kandungan kimia

Identifikasi dengan kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia terkandung di dalam biji pepaya. Identifikasi senyawa meliputi senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, triterpenoid (Sukadana *et al.* 2008).

7.1 Identifikasi triterpenoid. Sebanyak 2 mg ekstrak kering dilarutkan dalam asetat anhidrida, dipanaskan sampai mendidih, didinginkan dan kemudian 1 ml asam sulfat pekat diteteskan melalui dinding tabung reaksi. Pembentukan warna merah muda menunjukkan adanya triterpenoid (Saha *et al.* 2011).

7.2 Identifikasi alkaloid. 0,5 gr serbuk ditambah dengan sedikit larutan HCL 2 N, panaskan kemudian ditambahkan larutan mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan Dragendrof terbentuk endapan berwarna coklat-hitam, maka kemungkinan terdapat alkaloid (Depkes RI 1977)

7.3 Identifikasi flavonoid. 0,5 gr ekstrak ditambahkan 5 ml aquadest dan dipanaskan selama 1 menit setelah itu disaring dan diambil filtranya. 5 mg filtrate masukan dalam tabung reaksi dan ditambah 0,1 gram larutan Mg, 2 ml larutan alkohol : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudiam dibiarkan memisah. Reaksi positif ditandai dengan adanya warna merah atau kuning ataupun jingga pada lapisan amil alkohol. (Depkes 1979)

7.4 Identifikasi saponin. Ekstrak etanol biji pepaya 0,5 gr ditambahkan air panas 10 ml dalam tabung reaksi kemudian didinginkan lalu dikocok dan diamkan selama 10 detik. Bila terbentuk buih tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm maka hasil positif walaupun ada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tetap tidak hilang (Depkes 1977).

8. Pembuatan konsentrasi fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan air ekstrak etanol biji pepaya

Berdasarkan penelitian yang sudah dilakukan konsentrasi 1% ekstrak etanol biji pepaya efektif menghambat aktivitas *Escherchia coli* ATCC 25992. Pembuatan ekstrak etanol biji pepaya dilakukan dengan pengenceran dari konsentrasi 10%, 5%, dan 1%. Hasil fraksi ditimbang kurang lebih 1 gr ditambah DMSO 1% sampai volume 10 ml untuk konsentrasi 10%. Hasil fraksi ditimbang 0,5 gr ditambah DMSO 1% sampai volume 10 ml untuk konsentrasi 5%. Hasil fraksi ditimbang 0,1 gr ditambah DMSO 1% sampai volume 10 ml untuk konsentrasi 1%.

9. Sterilisasi

Media yang digunakan dalam penelitian ini disterilisasi terlebih dahulu yaitu dengan autoclaf pada suhu 121°C selama 15-30 menit. Alat-alat dari gelas seperti gelas ukur dan beaker glass juga disterilkan dengan oven pada suhu 170°C-180°C selama 30-60 menit. Alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung dan inkas disterilkan dengan menggunakan formalin (suriawiria 2005).

10. Identifikasi makroskopis *Escherchia coli* ATCC 25992

Pembuatan suspensi bakteri uji *Escherchia coli* ATCC 25992 dengan cara diinokulasi pada media diferensial *Endo Agar* (EA) dan di inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil dinyatakan positif apabila terjadi penampakan koloni merah dengan logam kilo yang permanen dan warnah medium merah violet (Volk & Wheller 1988).

11. Identifikasi mikroskopis *Escherchia coli* ATCC 25992 dengan pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk meyakinkan bahwa bakteri *Escherchia coli* ATCC 25992 merupakan gram negatif ditandai dengan dengan sel bakteri yang berwarna merah dan berbentuk bacilli. Pewarnaan ini dilakukan dengan membuat preparat ulas (smear) yang dipanaskan sedikit diatas lampu spiritus lalu tetesi kristal violet (gram A) sebagai pewarna utama pada kedua preparat sampai semua ulasan terwarnai, diamkan selama kurang lebih 1 menit. Cuci dengan air mengalir kemudian tetesi dengan mordant (gram B) diamkan kurang lebih selama 1 menit kemudian cuci dengan air mengalir lalu dikering anginkan setelah itu preparat dilunturkan dengan gram C (alkohol) dan diamkan kurang lebih 45 detik, lalu dicuci dengan aquadest mengalir kemudian ditetesi dengan gram D dan diamkan selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir kemudian preparat dikering anginkan diudara (Volk & Wheller 1988).

12. Identifikasi *Escherchia coli* ATCC 25992 dengan uji biokimia

Pertama uji biokimia SIM (sulfide Indol Motility). Biakan bakteri ditanamkan pada media SIM dengan ditusuk kemudian diinkubasi selama 24 jam suhu 37°C. Uji sulfida positif bila medium berwarna hitam, uji indol positif bila berbentuk warna merah setelah pertumbuhan reagen erlich, uji motilitas positif bila terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh media.

Kedua uji KIA (Kliger Iron Agar). Pengujian media KIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, ada tidaknya gas, dan terbentuk warna hitam. Biakan bakteri diinokulasi secara tusuk goreskemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil yang diamati adanya warna kuning pada bagian media yang miring dan pada bagian dasar, perubahan adanya media yang pecah atau terangkat keatas menunjukkan adanya gas, warna media yang tidak berubah, warna hitam menunjukan uji sulfida yang negatif.

Ketiga, uji LIA (Lysin Iron Agar). Pengujian media LIA dilakukan pengamatan pada bagian lereng, dasar, dan adanya sulfida. Biakan bakteri ditanamkan pada bagian media LIA yang akan diamati dengan cara inokulasi tusuk dan gores , kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Diamati

adanya perubahan warna merah coklat ungu, atau kuning pada bagian lereng dan dasar media LIA. Perubahan warna hitam pada media LIA menunjukkan uji sulfida positif.

Keempat, uji Citrat. Biakan bakteri diinokulasi pada media dengan cara inokulasi goresan kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Identifikasi ini bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri menggunakan citrat sebagai karbon tunggal. Uji positif bila media berwarna biru (Volk & Wheller 1988).

13. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Biakan murni *Escherchia coli* ATCC 25992 diambil dengan jarum ose steril. Kemudian dimasukkan secara aseptis kedalam tabung reaksi steril yang telah berisi media BHI (Brain Heart Infusion). Kemudian dihomogenkan dan setarakan kekeruhan dengan Mc Farland.

14. Pengujian aktivitas antibakteri *Escherchia coli*

14.1 Metode difusi. Ekstrak etanol hasil maserasi dari biji pepaya di uji secara mikrobiologi dengan bakteri *Escherchia coli* ATCC 25992. Pengujian aktivitas antibakteri biji pepaya di laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi. Metode yang digunakan adalah metode difusi. Metode difusi digunakan untuk menentukan diameter zona hambat terhadap bakteri uji. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang telah dibuat, kemudian diinokulasi kedalam medium NA dengan metode perataan dan medium didiamkan selama 10 menit pada suhu kamar agar suspensi biakan terdifusi ke dalam media. Pada media tersebut diisi kertas cakram ukuran 6 mm menggunakan pinset. Masing-masing kertas cakram yang sudah diberi agen antimikroba sesuai konsentrasi yang berisi ekstrak etanol biji pepaya 10%, 5%, 1%. Kotrimoksazol sebagai kontrol positif dan pelarut DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Media yang telah berisi kertas cakram dimasukkan kedalam inkubator dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati hasilnya, setelah itu diukur diameter zona hambat sekitar kertas cakram yang dinyatakan dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa

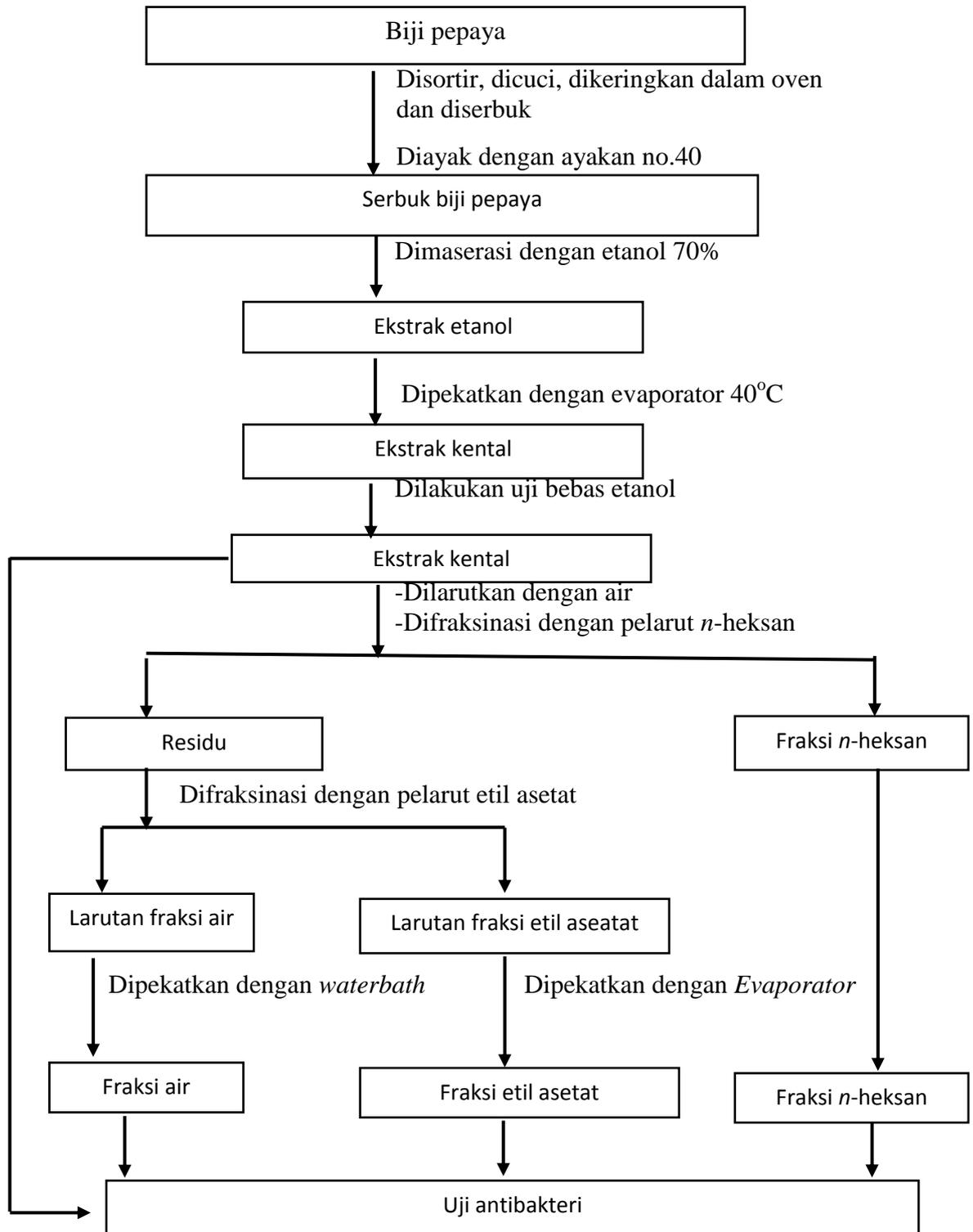
kandungan kimia biji pepaya memiliki daya hambat terhadap *Escherchia Coli* ATCC 25992. Pengujian dilakukan sebanyak 3 kali replikasi.

14.2 Metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum). Metode tersebut menggunakan 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yang dibuat yaitu 10% lalu diencerkan dengan pelarut DMSO 1%. Larutan stok tersebut dibuat dengan konsentrasi yaitu kontrol (-); 10%; 5%; 2,5%, 1,25%; 0,62%; 0,31%; 0,15%; 0,07%; 0,03%; 0,01%; kontrol (+). Media BHI (*Brain Heart Infusien*) yang digunakan dimasukkan 0,5 mL pada tiap tabung kecuali tabung 1 (kontrol negatif). Masukkan 1 mL larutan stok yang akan diuji, kemudian dari tabung 2 masukan 0,5 mL larutan stok, kemudian dari tabung 2 dipipet 0,5 mL dan masukan kedalam tabung 3 begitu seterusnya sampai dengan tabung 11 kemudian dibuang. Tambahkan biakan jamur dari tabung 2 sampai ke tabung 12 (kontrol positif). Inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. (Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari 12 tabung yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan menginokulasi jumlah tabung yang hasilnya jernih pada medium *Endo Agar* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati ada tidaknya pertumbuhan jamur dengan melihat koloni bakteri yang tumbuh.

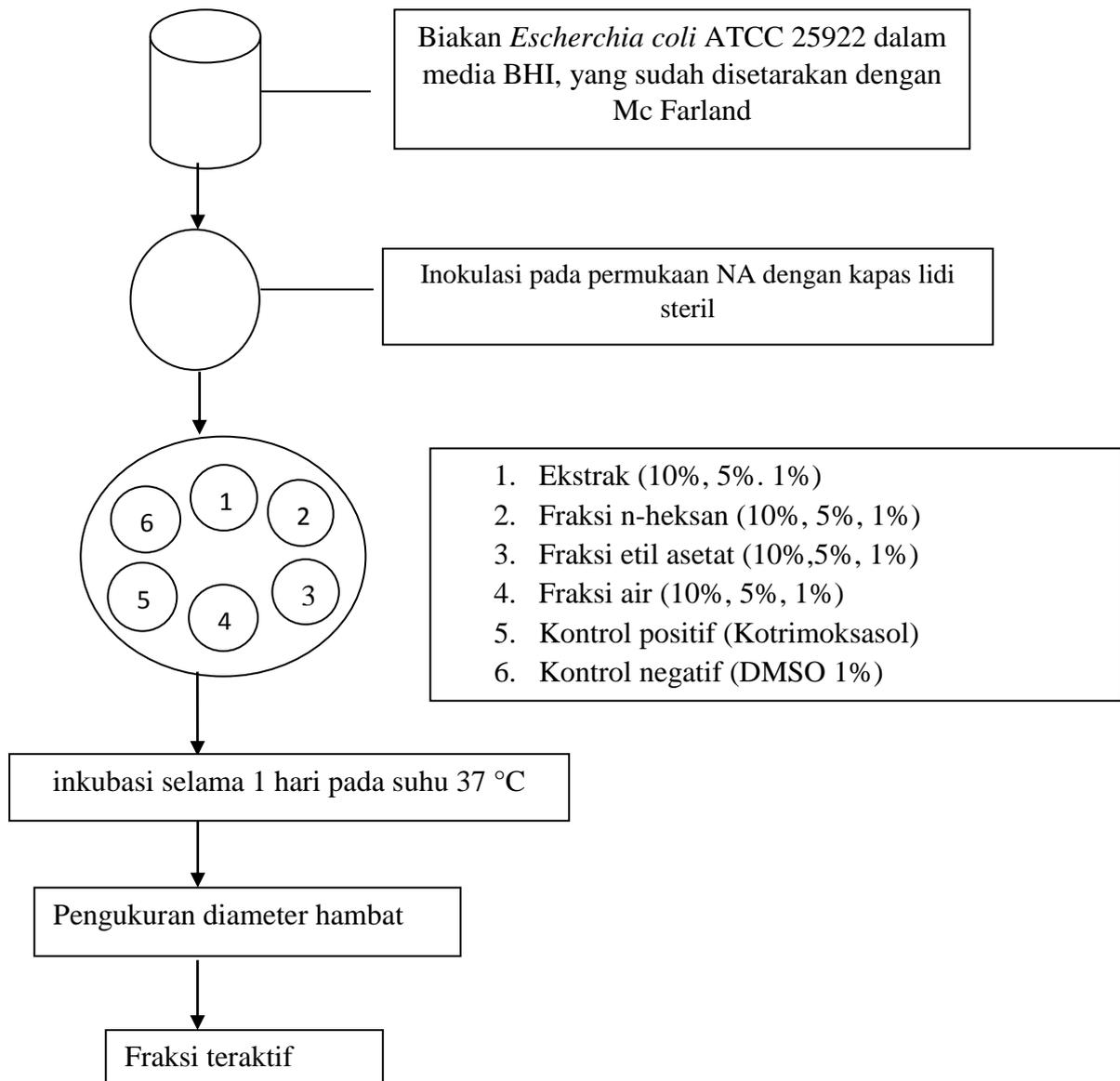
E. Analisis Akhir

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, feaksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol biji buah pepaya (*Carica Papaya* L) terhadap bakteri *Escherchia coli* ATCC 25992 menggunakan metode difusi cakram disk yang dinyatakan dengan diameter zona hambat (zona bening) yang terbentuk disekeliling cakram di analisis secara statistik menggunakan uji *kolmogorov-smirnov* untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Data dinyatakan terdistribusi normal bila nilai $p > 0,05$ dan apabila $p < 0,05$ maka distribusi tidak normal.

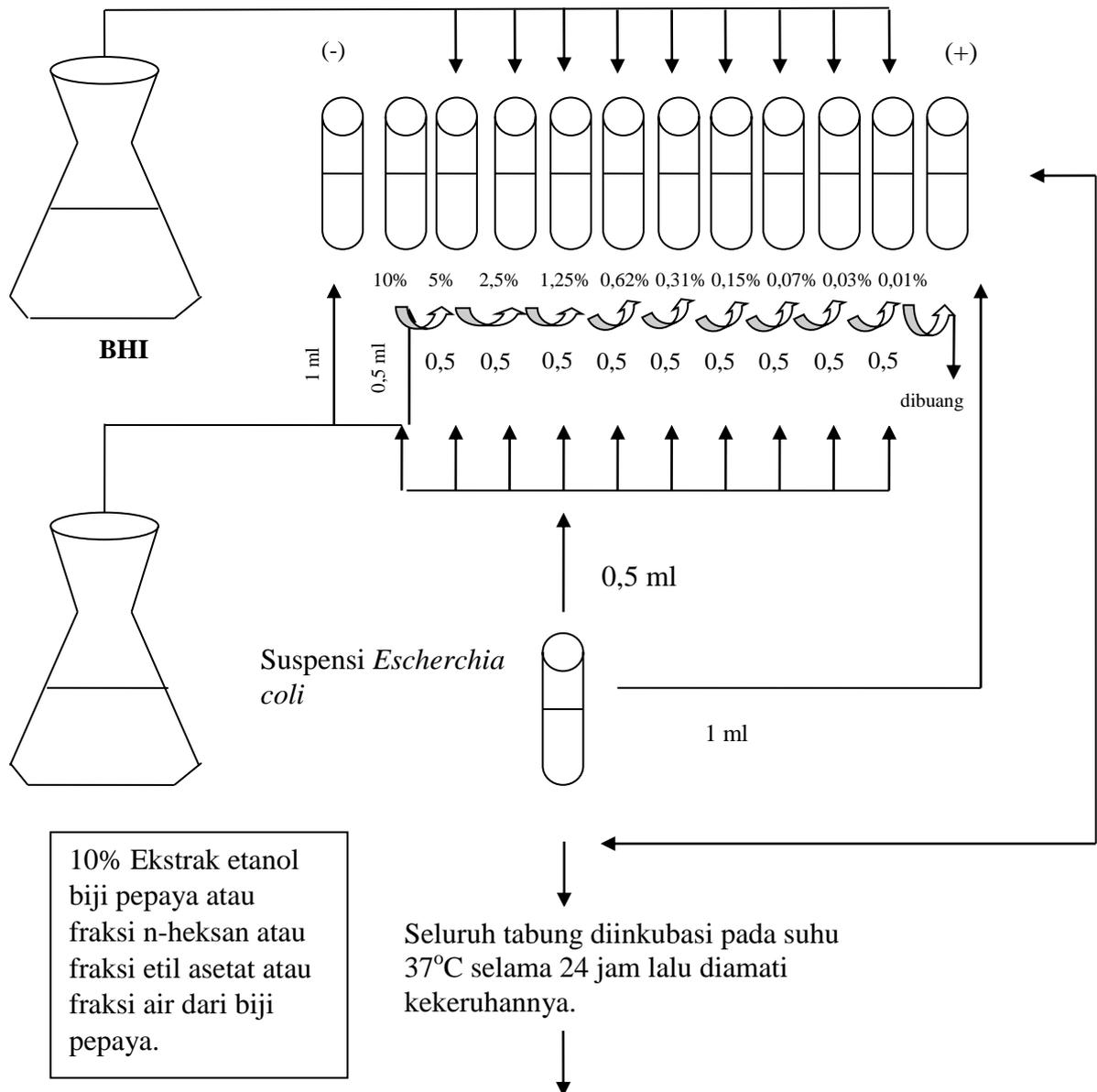
G. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 3. Skema pembuatan ekstrak etanol biji pepaya



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas terhadap antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25992 menggunakan metode difusi



Gambar 5. Skema pengujian aktivitas antibakteri *Escherichia coli* ATCC 25992 menggunakan metode dilusi