

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi target penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya (*C. papaya* L.) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel adalah bagian dari populasi yang digunakan dalam penelitian. Sampel yang digunakan adalah daun pepaya (*C. papaya* L.) varietas Thailand yang diambil dari populasi secara random dengan kondisi daun masih segar, berwarna hijau, serta terbebas dari hama dan penyakit yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan Juli 2019.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah daun pepaya (*C. papaya* L.) yang diekstraksi secara maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan, etil asetat, dan air.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji penghambatan pembentukan biofilm ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya (*C. papaya* L.) terhadap bakteri uji *S. mutans* ATCC 25175.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi diklasifikasikan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel kendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah kemurnian bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan kriteria penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah nilai IC₅₀ dari penghambatan biofilm oleh ekstrak dan fraksi daun pepaya (*C. papaya* L.) terhadap bakteri *S. mutans* ATCC 25175.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pepaya adalah daun dari tanaman pepaya varietas Thailand dengan kondisi segar, berwarna hijau, serta terbebas dari hama dan penyakit yang diambil dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak daun pepaya adalah hasil maserasi serbuk daun pepaya dengan pelarut etanol 96%.

Ketiga, fraksi air daun pepaya adalah hasil dari ekstrak daun pepaya yang difraksinasi dengan pelarut air.

Keempat, fraksi etil asetat daun pepaya adalah hasil dari ekstrak daun pepaya yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat.

Kelima, fraksi *n*-heksan daun pepaya adalah hasil dari ekstrak daun pepaya yang difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan.

Keenam, *S. mutans* ATCC 25175 adalah bakteri uji yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

Ketujuh, biofilm adalah lapisan yang terbentuk dari kumpulan bakteri yang melekat pada *well* setelah 100 µl suspensi bakteri uji dan 100 µl sampel diinkubasi selama 4 hari.

Kedelapan, uji aktivitas antibiofilm adalah uji penghambatan biofilm dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* menggunakan *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells* dengan konsentrasi 30 mg/ml, 60 mg/ml, dan 90 mg/ml pengukuran penghambatan biofilm dengan melihat nilai IC₅₀ yang terbaca dari *iMark Bio-Rad microplate reader* pada panjang gelombang maksimum.

Kesembilan, IC₅₀ adalah konsentrasi ekstrak, fraksi air, etil asetat, dan *n*-heksan daun pepaya yang dapat memberikan hambatan pembentukan biofilm sebesar 50% yang dihitung dari data OD (*optical density*) berdasarkan persamaan $(1 - (xOD_t - xOD_{mc} / xOD_{vc})) \times 100$.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan adalah daun pepaya segar, dikeringkan, dan dibuat serbuk yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

1.2 Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. mutans* ATCC 25175 yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi.

1.3 Bahan lain. Media BAP (*Blood Agar Plate*), BHI (*Brain Heart Infusion*), kristal violet 1%, etanol 96%, Mc Farland 0,5, HCl 2N, serbuk Mg, amil alkohol, FeCl₃, DMSO 5%, pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorf, asam asetat pekat, asam sulfat pekat, eter, lugol, safranin, metanol, serbuk natrium anhidrat, minyak emersi, plasma sitrat, asam asetat anhidrat, air suling.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah KLT, chamber, ayakan No 40, jarum ose, tabung reaksi steril, rak tabung reaksi, cawan petri steril, kapas lidi steril, *obyek glass*, inkubator, mikropipet, autovortex mixer, gelas ukur, bejana maserasi, erlenmeyer, *waterbath*, *rotary evaporator*, *moisture balance*, pipet volume, botol vial, autoklaf, oven, pinset, neraca analitik, *microtiterplate flat-bottom polystyrene*, *iMark Bio-Rad microplate reader*, spidol dan penggaris.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman pada penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman berdasarkan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman pepaya sesuai dengan pustaka dan dibuktikan di bagian Biologi Farmasi, Fakultas MIPA, Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan bahan dan persiapan bahan

Daun pepaya dipetik, dicuci dengan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 40°C hingga kering, diserbuk, dan diayak dengan ayakan No 40. Serbuk daun pepaya yang diperoleh dilakukan perhitungan konsentrasi bobot kering terhadap bobot basah daun pepaya (Ekajayanti *et al.*, 2016)

3. Identifikasi serbuk daun pepaya

Identifikasi organoleptis terhadap serbuk daun pepaya meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa dari serbuk daun pepaya (Ekajayanti *et al.*, 2016)

4. Penetapan susut pengeringan serbuk

Penetapan susut pengeringan dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram serbuk daun pepaya dalam wadah yang sudah ditara. Wadah tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *Moisture Balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C. Pengoperasian alat selesai setelah diperoleh bobot konstan yang ditandai dengan bunyi tertentu. Replikasi dilakukan sebanyak tiga kali. Kadar susut pengeringan dinyatakan dalam bentuk persen (%) (Depkes RI 2000).

5. Ekstraksi

Serbuk daun pepaya ditimbang 800 gram lalu dimasukkan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 8000 ml (1:10). Serbuk direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian diamkan selama 18 jam. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Pengulangan penyarian dilakukan sekurang-kurangnya satu kali dengan pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama selama 18 jam. Filtrat kemudian dipisahkan dengan *vacum rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan diuapkan dengan *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun pepaya (Kemenkes RI 2013).

6. Uji bebas etanol

Uji bebas alkohol dilakukan dengan cara ekstrak daun pepaya ditambah asam asetat pekat (CH_3COOH) dan asam sulfat pekat (H_2SO_4) kemudian dipanaskan, jika tidak terdapat bau khas ester berarti sudah tidak terdapat alkohol dalam ekstrak daun pepaya (Praeparandi 2006).

7. Penetapan kadar air ekstrak

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara ditimbang 20 gram ekstrak daun pepaya dimasukkan dalam labu destilasi kemudian ditambah pelarut toluen jenuh air 200 ml sampai serbuk terendam. Alat *Sterling-Bidwell* dipanaskan. Pemanasan dihentikan jika tidak ada penambahan tetesan air pada alat *Sterling-Bidwell* lalu dibaca skalanya. Kadar air dihitung dalam %^{v/b} (Depkes RI 2000).

8. Fraksinasi

Ekstrak kental daun pepaya sebanyak 10 gram dilarutkan dalam 10 ml etanol kemudian 65 ml pelarut air, diekstraksi cair-cair dengan *n*-heksan sebanyak 3 kali 75 ml sehingga didapatkan dua fraksi yaitu fraksi air dan *n*-heksan. Fraksi air diekstraksi cair-cair dengan etil asetat sebanyak 3 kali 75 ml, dikocok dan dibiarkan memisah sehingga didapatkan fraksi air dan fraksi etil asetat. Ketiga fraksi tersebut yaitu fraksi air, fraksi etil asetat, dan fraksi *n*-heksan diuapkan hingga diperoleh fraksi kemudian diuji aktivitas antibiofilm terhadap *S. mutans* ATCC 25175 (Harborne 2006). Diagram pembuatan ekstrak dan fraksi dapat dilihat pada gambar 3.

9. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak dengan pereaksi warna

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun pepaya. Identifikasi dilakukan terhadap senyawa golongan flavonoid, alkaloid, tanin, dan steroid.

8.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak 500 mg dilarutkan dengan air suling, kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Filtrat ditambahkan serbuk Mg, larutan alkohol : HCl 2N (1:1), dan amil alkohol. Campuran larutan ini dikocok kuat-kuat sampai memisah. Hasil positif ditandai dengan adanya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Yunita *et al.*, 2009).

8.2 Identifikasi alkaloid. Ekstrak ditambah larutan HCl 2 N dipanaskan kemudian ditambah pereaksi Mayer. Hasil positif ditandai bila terbentuk endapan berwarna putih atau kuning, jika ditambah pereaksi Dragendrof hasil positif bila terbentuk endapan berwarna merah sampai jingga (Yunita *et al.*, 2009).

8.3 Identifikasi tanin. Ekstrak dilarutkan dengan air suling kemudian ditambahkan tiga tetes FeCl₃, warna akan berubah menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Vermerris *et al.*, 2006).

8.4 Identifikasi steroid/triterpenoid. Ekstrak dilarutkan dengan 5 ml eter kemudian diuapkan di dalam cawan penguap. Residu ditambahkan dengan 2 tetes asam asetat anhidrat, 1 tetes H₂SO₄ pekat. Hasil positif ditandai bila terbentuk warna merah hijau, hijau biru atau violet-biru (Tiwari *et al.*, 2011).

8.2. Saponin. Ekstrak ditambahkan air panas sama banyak, didinginkan, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm pada penambahan 1 tetes HCl 2N buih tidak hilang (Novitasari dan Putri 2016).

10. Identifikasi kandungan senyawa kimia dengan kromatografi lapis tipis

Penyiapan fase diam Silika Gel GF₂₅₄ dengan panjang 8 cm dan lebar 3 cm. Sebanyak 10 mg ekstrak dan fraksi teraktif dilarutkan dalam 1 ml etanol kemudian ditotolkan pada fase diam.

9.1 Identifikasi flavonoid. Fase gerak asam asetat glasial : butanol : air (1:4:5) dengan penampak noda uap ammonia atau sitroborat. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna kuning coklat setelah diuapi ammonia atau disemprot dengan sitroborat pada pengamatan dengan sinar tampak dan berwarna kuning pada UV 366 nm (Marliana 2005).

9.2 Identifikasi alkaloid. Fase gerak yang digunakan adalah etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5) dengan penampak noda pereaksi Dragendorf. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya bercak coklat jingga berlatar belakang kuning (Harborne 1996).

9.3 Identifikasi tanin. Fase gerak metanol-air (6:4) dengan penampak noda Pereaksi FeCl₃ 5%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya noda berwarna hitam (Banu dan Nagarajan 2014).

9.4 Identifikasi steroid/triterpenoid. Fase gerak yang digunakan adalah kloroform - metanol (9:1), dengan penampak noda pereaksi Liberman-Buchard disertai pemanasan pada suhu 105°C selama 1 menit. Reaksi positif steroid ditunjukkan dengan adanya noda berwarna ungu (Kristanti *et al.*, 2008).

11. Sterilisasi alat

Seluruh media agar yang akan digunakan kecuali media BAP disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, karena uap panasnya efektif untuk sterilisasi medium. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 170°-180°C selama 2 jam. Jarum ose disterilkan dengan pemanasan api langsung. Sterilisasi inkas menggunakan formalin (Suriawiria 1986).

12. Pembuatan media BAP dan BHI

Media pertama yang dibuat adalah Media BAP. Media BAP dibuat dengan cara ditimbang agar nutrisi kemudian dilarutkan dengan *aquadest* dan dipanaskan di atas *hot plate stirrer* sambil diaduk. Media didinginkan dalam inkubator sampai suhu 40°C lalu dimasukkan darah secara aseptis. Media kedua yang dibuat adalah media BHI. Media BHI ditimbang dengan neraca analitik dimasukkan ke dalam erlenmeyer dilarutkan dengan *aquadest* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Media yang sudah jadi dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

13. Inokulasi *S. mutans* ATCC 25175 pada media BAP

Inokulasi dilakukan dengan tujuan untuk memindahkan dan meremajakan bakteri. Teknik yang digunakan adalah *streak plate*. Jarum ose dipanaskan pada bagian ujung sampai berpijar lalu didinginkan, mulut cawan petri yang berisi kultur bakteri *S. mutans* ATCC 25175 dibuka dan diambil dengan menggoreskan ose ke inokulum, tutup mulut cawan petri kemudian dipanaskan kembali. Ose digoreskan pada media BAP padat dengan metode gores kontinyu, kemudian tutup mulut cawan petri kemudian dipanaskan kembali di api bunsen. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya bakteri berwarna hijau dalam agar darah (hemolisis alfa).

14. Identifikasi *Streptococcus mutans* ATCC 25175

13.1 Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. Suspensi bakteri *S. mutans* ATCC 25175 diambil dari media biakan menggunakan jarum ose yang telah dipijarkan, lalu diratakan di atas *object glass*. Larutan zat warna kristal violet diteteskan sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 1 menit. Preparat diberikan akuades mengalir dan dikeringkan. Larutan lugol diteteskan dan dibiarkan selama 1 menit, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan alkohol diberikan 30 detik, lalu dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Larutan safranin diberikan selama 20 detik. Preparat dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Kaca preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10x100 kali. Minyak imersi diberikan di atas kaca preparat bakteri.

13.2 Identifikasi secara biokimia. Identifikasi secara biokimia ada dua yaitu uji katalase dan koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri uji yang ditanam pada larutan dapar fosfat ditambah H_2O_2 3%. Penambahan H_2O_2 akan terurai menjadi H_2O dan O_2 . Hal ini ditandai dengan timbulnya gelembung udara. Hasil positif ditandai dengan adanya gelembung udara. *S. mutans* ATCC 25175 bersifat katalase negatif sehingga hasil yang terbentuk tidak terdapat gelembung udara (Jawetz *et al.*, 2013).

Uji koagulase dilakukan dengan cara 200 μ l plasma sitrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril. Sebanyak 3-4 koloni biakan *S. mutans* ATCC 25175 ditambahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dicampur. Selanjutnya, tabung reaksi dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu $37^\circ C$. Pengamatan dilakukan pada 4 jam pertama dan sesudah 24 jam. Reaksi positif ditandai apabila terbentuk *jelly* dan ketika tabung dimiringkan *jelly* tetap berada di dasar tabung (Lay 1994).

15. Pembuatan larutan standar MC Farland 0,5

Pembuatan larutan standar MC Farland 0,5 dengan cara 9,5 ml larutan H_2SO_4 1% dicampur dengan 0,5% ml larutan $BaCl_2$ 1% sehingga volume menjadi 10 ml, lalu dikocok sampai homogen. Larutan harus dikocok setiap akan digunakan untuk membandingkan suspensi bakteri.

16. Pembuatan suspensi bakteri

Bakteri *S. mutans* ATCC 25175 yang telah diremajakan di media BAP padat diambil dengan jarum ose dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi media BHI cair 10 ml lalu divortex selama 1 menit, kemudian diinkubasi pada suhu $37^\circ C$ selama 24 jam. Suspensi bakteri disesuaikan dan bandingkan dengan standar kekeruhan Mc Farland 0,5. Standar kekeruhan Mc Farland 0,5 yaitu sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/ml. Tujuan disesuaikan suspensi bakteri *S. mutans* dengan standar Mc Farland 0,5 agar jumlah bakteri yang sama selama penelitian.

17. Evaluasi pembentukan biofilm *S. mutans*

Media BHI sebanyak 75 μ L dan suspensi bakteri 25 μ L diinkubasi selama 4 hari pada suhu $37^\circ C$. *Microplates* kemudian dibilas dengan air steril dan diwarnai dengan kristal violet 0,1% selama 15 menit, kemudian dibilas, apabila *microplates* tetap berwarna ungu, maka telah terbentuk biofilm (OToole 2011).

18. Penentuan panjang gelombang maksimal (λ_{maks})

Penentuan panjang gelombang maksimal dilakukan dengan mengukur biomasa lapisan biofilm pada range panjang gelombang 450-650 nm dengan menggunakan alat *iMark BioRad microplate reader*.

19. Uji penghambatan biofilm ekstrak dan fraksi daun pepaya secara *in vitro*

Tujuan dilakukan uji penghambatan pembentukan biofilm adalah untuk mendapatkan aktivitas dari daun pepaya dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 secara *in vitro* menggunakan *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengujian penghambatan biofilm dilakukan dengan cara ekstrak dan masing-masing fraksi yaitu *n*-heksan, etil asetat, dan air dimasukkan dalam waktu bersamaan ke dalam tiap *well*. Suspensi bakteri dalam media BHI sebanyak 100 μ l, ekstrak dan fraksi daun pepaya 100 μ l dengan variasi konsentrasi 30, 60, dan 90 mg/ml, kemudian diinkubasi 4 hari pada suhu 37°C selanjutnya *microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali, kemudian ditambahkan 200 μ l larutan kristal violet 0,1% ke tiap *well* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit, langkah selanjutnya *microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali ditambah larutan etanol 96% sebanyak 200 μ l dimasukkan ke tiap *well* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Media BHI dan suspensi bakteri sebagai kontrol negatif, Listerine[®] 45%^{v/v} sebagai kontrol positif, dan DMSO 5%^{v/v} sebagai kontrol pelarut. Selanjutnya dilakukan pembacaan biomasa dari lapisan biofilm menggunakan alat *iMark BioRad microplate reader* dengan panjang gelombang maksimum (O'Toole 2011).

Pengujian penghambatan biofilm dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Persentase penghambatan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dapat diukur dengan rumus sebagai berikut (Pratiwi *et al.*, 2015) :

$$\% \text{ Penghambatan Biofilm} = \left(1 - \left(\frac{xODt - xODmc}{xODvc} \right) \right) \times 100\%$$

Keterangan :

ODt = *Optical Density* sumuran yang diuji

ODmc = *Optical Density* kontrol media

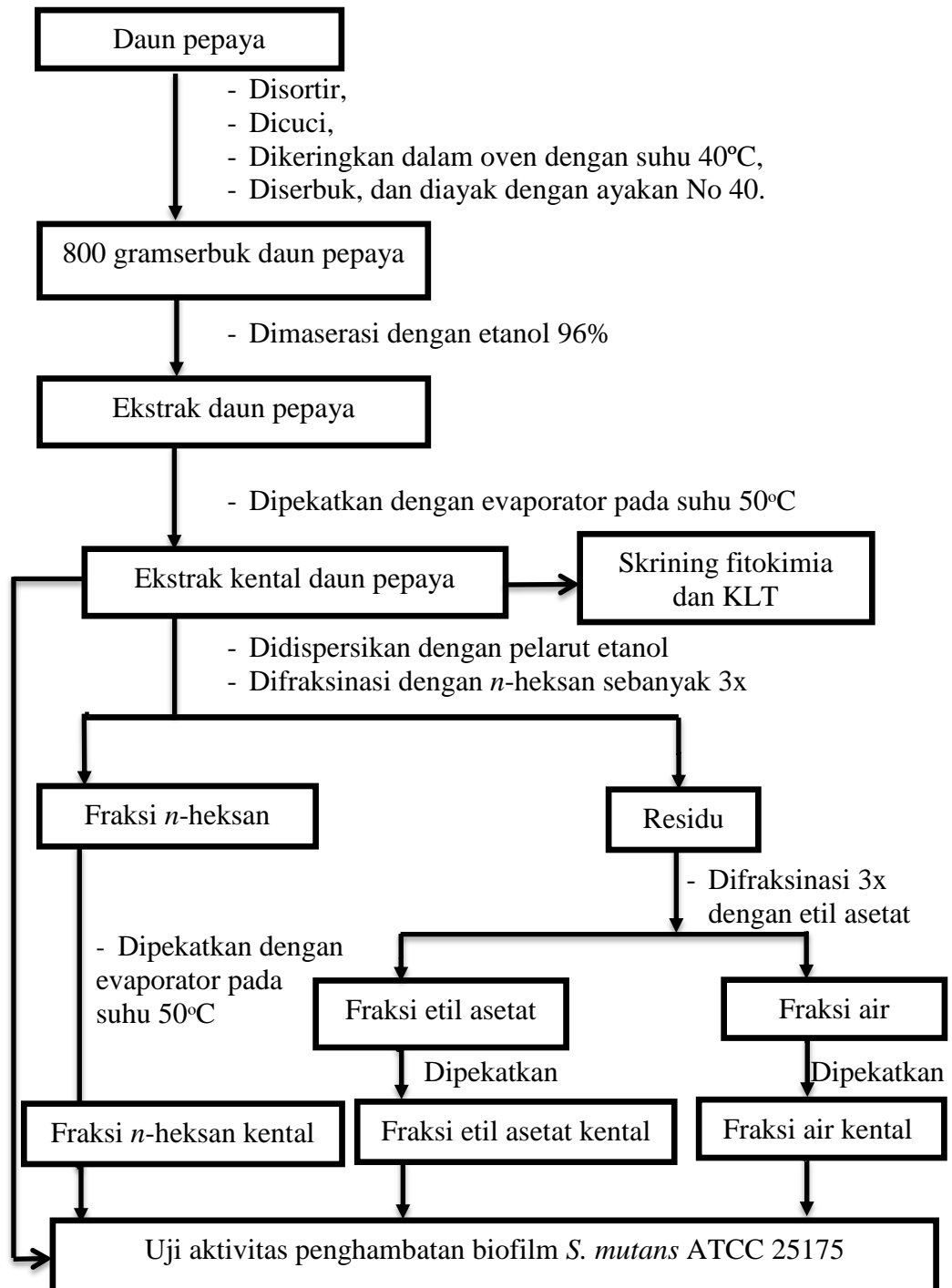
ODvc = *Optical Density* kontrol pelarut

Kemudian uji aktivitas penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 dinyatakan dengan parameter IC_{50} (*Inhibitor Concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghambat biofilm sebesar 50%. Nilai IC_{50} ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghambatan biofilm. Persamaan regresi linier, harga r tabel dengan taraf kepercayaan 0,95. Harga IC_{50} berbanding terbalik dengan aktivitas penghambatan biofilm yaitu semakin besar harga IC_{50} maka aktivitas penghambatan biofilm semakin kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghambat biofilm sebesar 50% semakin besar.

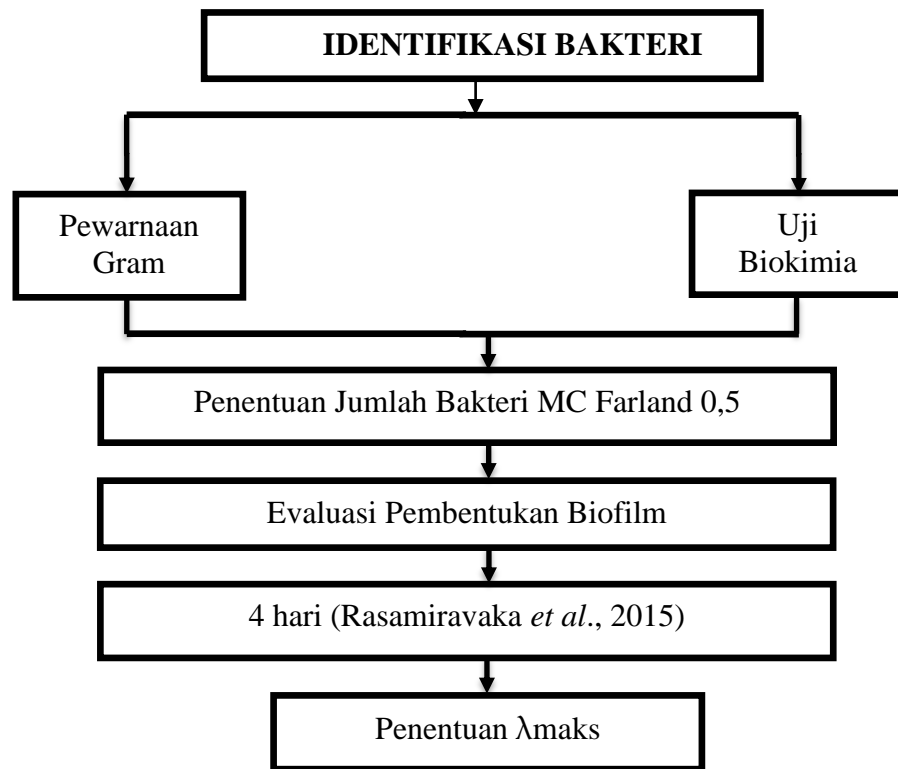
E. Analisis Data

Data hasil pengujian aktivitas ekstrak, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun pepaya terhadap penghambatan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dianalisis secara statistik dengan Uji Normalitas *One-Sample Kolmogorv-Smimov*. Tujuan uji tersebut adalah untuk melihat normalitas distribusi data persen penghambatan dan Uji Homogenitas (*Levene*) yang bertujuan untuk melihat homogenitas dari persen penghambatan. Data persen penghambatan jika bervariasi homogen maka dilanjutkan dengan Uji *Two-Way* ANOVA untuk melihat persen penghambatan antar konsentrasi terdapat perbedaan secara bermakna atau tidak. Data persen penghambatan jika tidak bervariasi homogen maka dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan bermakna dari data biofilm. Jika data persen penghambatan berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *post hoc*.

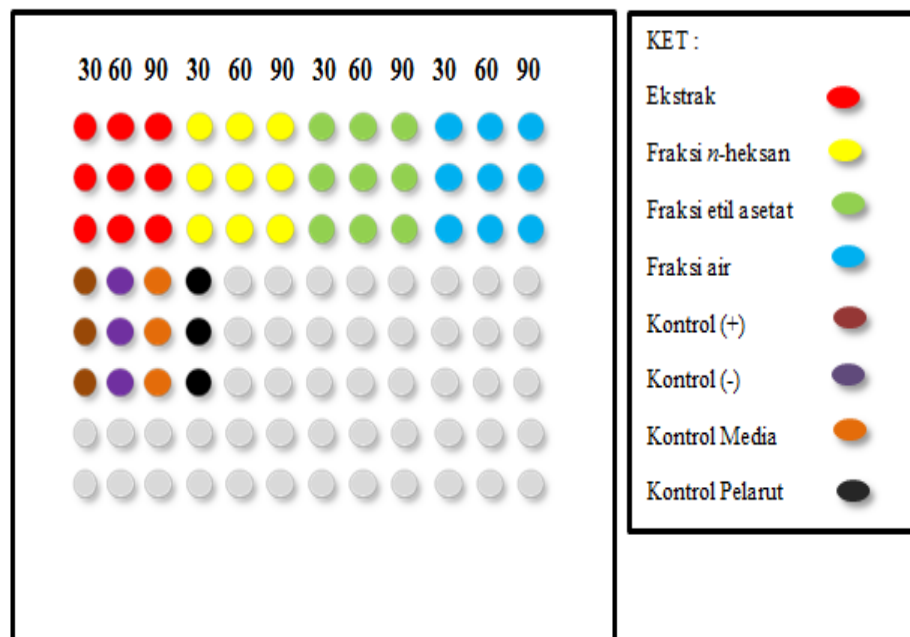
F. Skema Penelitian



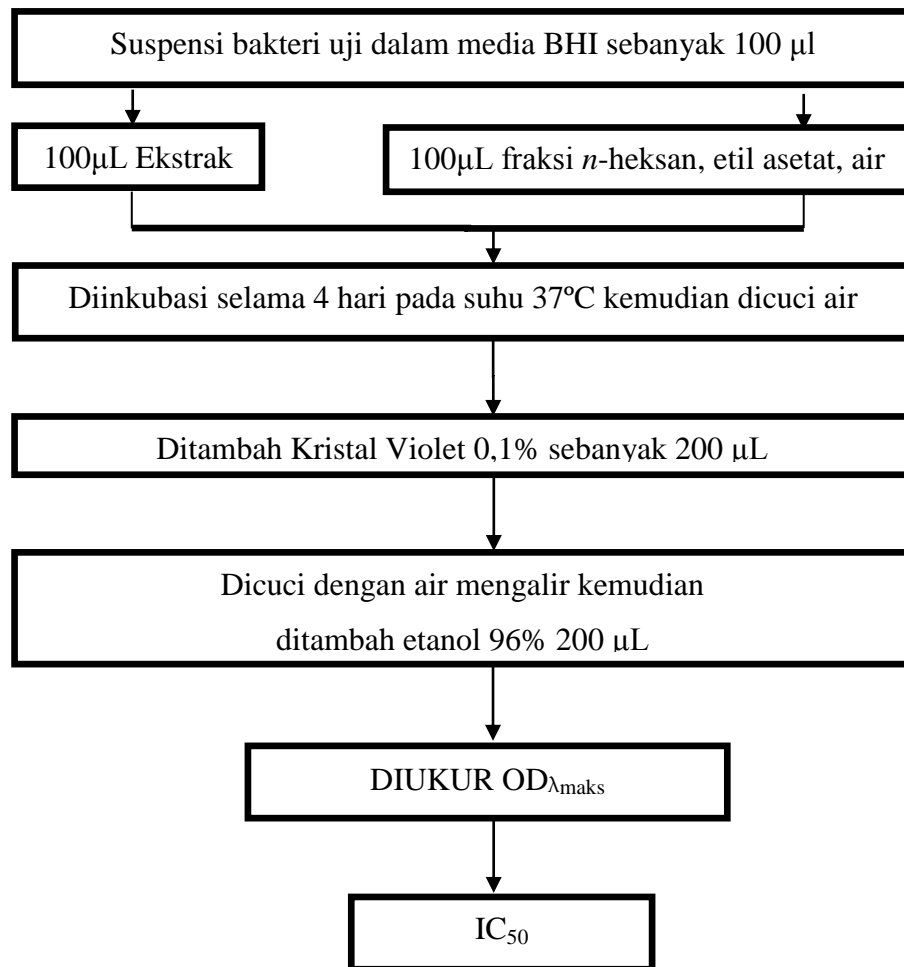
Gambar 3. Diagram skema pembuatan ekstrak dan fraksi daun pepaya



Gambar 4. Diagram skema identifikasi *S. mutans* ATCC 25175 dan optimasi biofilm



Gambar 5. Tata letak uji penghambatan pembentukan biofilm



Gambar 6. Diagram skema uji penghambatan pembentukan biofilm