

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan sebagai studi eksperimental di laboratorium dengan tujuan menilai potensi antibakteri dari ekstrak daun pepaya (*Carica papaya* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Pengujian dilaksanakan melalui metode gores dan difusi pada media blood agar. Ekstrak disiapkan menggunakan tiga jenis pelarut berbeda, yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol, masing-masing dengan variasi konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%. Sebagai kontrol negatif digunakan Dimetil sulfoksida (DMSO), sedangkan kontrol positif menggunakan Amoxsan. Aktivitas antibakteri dievaluasi berdasarkan ukuran zona hambat yang terbentuk selama periode observasi dua bulan.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

daun pepaya (*Carica papaya* Linn) berasal dari wilayah perkebunan milik warga yang terletak di Cikarang, Jawa Barat. Dan bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

3.3 Bahan dan Alat yang digunakan

3.3.1 Bahan

Dalam penelitian ini, bahan yang digunakan meliputi daun pepaya (*Carica papaya* Linn.) serta bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Indonesia. Pelarut yang digunakan terdiri dari etanol 70%, etil asetat, dan n-heksan, yang semuanya didapatkan dari PT. Brataco. Sementara itu, untuk media pertumbuhan dalam uji antibakteri, digunakan *blood agar plate*.

3.3.2 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kertas saring (filter paper), autoklaf, mikropipet beserta tip-nya, tabung reaksi, cawan petri, lampu spirtus, serta hot plate dan pemanas air (Memmert). Selain itu, digunakan juga inkubator dan Laminar Air Flow (LAF) untuk menjaga kondisi steril selama proses pengujian.

3.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan selama 7 bulan terhitung dari bulan Januari s/d Juli 2025.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Klasifikasi Variabel

1. Variabel bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang memengaruhi atau menjadi faktor penyebab perubahan pada variabel dependen (terikat) (Sugiyono, 2013). Dalam penelitian ini, variabel bebas terdiri dari fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol dari daun pepaya (*Carica papaya* Linn.) dengan variasi konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%. Selain itu, digunakan pula kontrol negatif berupa DMSO dan kontrol positif berupa Amoxsan sebagai pembanding.

2. Variabel terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipengaruhi atau menjadi hasil dari adanya perubahan pada variabel independen (Sugiyono, 2013). Dalam penelitian ini, variabel dependen yang diamati adalah ukuran diameter zona hambat dari fraksi n-heksan, etil asetat, dan etanol daun pepaya (*Carica papaya* Linn.) terhadap bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

3. Variabel terkendali

Variabel terkendali merupakan variabel yang dikondisikan secara tetap guna memastikan bahwa hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat tidak terpengaruh oleh faktor eksternal yang tidak diteliti (Sugiyono, 2013). Pada penelitian ini, variabel kontrol mencakup penggunaan bakteri *Streptococcus pneumoniae* dan metode ekstraksi dengan maserasi menggunakan etanol 70%.

3.6 Definisi Operasional Variabel

Mengacu pada klasifikasi variabel yang telah dijelaskan sebelumnya, maka pengertian operasional dari masing-masing variabel dalam penelitian ini dapat dirumuskan sebagai berikut:

Tabel 3. 1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
1.	Fraksi N- Heksan, Etil Aetat, dan Etanol Daun Papaya (<i>Carica papaya</i> Linn)	Fraksi N- Heksan, Etil Aetat, dan Etanol Daun Papaya (<i>Carica papaya</i> Linn) diuji untuk melihat potensi antibakterinya dengan pengukuran diameter zona hambat terhadap bakteri <i>streptococcus pneumoniae</i>	Uji Goresan, Uji difusi agar dengan media <i>blood agar</i> untuk pengukuran diameter zona hambat	Konsentra si ekstrak dalam larutan.	K1 = 2,5% K2 = 5% K3 = 7,5% K4 = 10% K(-) = DMSO 10% K(+) = Amoxsan
2.	Aktivitas Antibakteri	Kemampuan ekstrak daun pepaya menghambat pertumbuhan bakteri	Pengukura n zona hambat dilakukan dengan pengukura	Pengukura n zona hambat dalam milimeter (mm), atau	Diameter zona hambat (mm) atau nilai

	<i>Streptococcus pneumoniae</i> .	n diameter zona	nilai konsentras i dalam	konsentrasi MIC
	Aktivitas antibakteri	terbentuk di sekitar		
	diukur dengan	sumur	mL untuk	
	melihat zona	pada		
	hambat media			
	(inhibitory zone) atau	agar,		
	menggunakan	mengguna		
	metode	penggaris.		
	konsentrasi			
	hambat			
	minimum			
	(MIC).			
3.	Bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bakteri patogen gram-positif yang digunakan dalam penelitian ini sebagai target untuk menguji efek antibakteri dari ekstrak daun pepaya.	Kultur bakteri yang ditumbuhkan dalam media agar, serta alat seperti spektrofotometer untuk menentukan konsentrasi inokulum bakteri.	Penghitun gan jumlah koloni bakteri dalam unit CFU/mL atau kekeruhan larutan mengguna kan turbiditas
				Jumlah bakteri yang diinokulasi kan dalam media (CFU/mL) atau kekeruhan medium

4.	Media Pertumbuhan Bakteri	Media agar yang digunakan untuk menumbuhkan <i>Streptococcus pneumoniae</i> , seperti agar Muller-Hinton, yang menyediakan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhan bakteri.	Media agar yang telah disiapkan dan diinkubasi di dalam petri dish.	Media agar standar dengan komposisi yang ditetapkan (misalnya, agar Muller-Hinton).	Keberhasilan pertumbuhan bakteri pada media agar (terlihat dari koloni yang tumbuh).
5.	Waktu Inkubasi	Durasi waktu untuk inkubasi setelah pemberian ekstrak daun pepaya dan inokulasi bakteri, di mana bakteri akan berkembang biak pada suhu inkubasi yang ditentukan (37°C).	Inkubator dengan pengaturan suhu dan timer untuk mengatur durasi inkubasi.	Waktu inkubasi dalam satuan jam (24-48 jam).	Durasi inkubasi yang diperlukan untuk observasi pertumbuhan bakteri atau pembentukan zona hambat.

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Determinasi Tanaman

Penentuan identitas tanaman (determinasi) dilakukan untuk menjamin ketepatan spesies tanaman yang digunakan. Pada penelitian ini, sampel daun pepaya telah melalui proses determinasi di Universitas Padjadjaran (UNPAD), Bandung, Jawa Barat. Tujuan dari langkah ini adalah untuk memverifikasi bahwa tanaman yang digunakan sesuai dengan jenis yang diharapkan (Insanu *et al.*, 2011).

3.7.2 Pembuatan simplisia

Proses pembuatan ekstrak daun pepaya dimulai dengan mencuci daun hingga bersih, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40°C hingga 50°C. Setelah daun benar-benar kering, dilakukan penghalusan menggunakan blender hingga diperoleh serbuk simplisia. Serbuk tersebut kemudian diayak dengan ayakan berukuran 80 mesh guna memperoleh hasil yang lebih halus. Setelah itu, sebanyak 500 gram serbuk simplisia ditimbang dan digunakan dalam proses ekstraksi menggunakan metode maserasi (Depkes RI, 2017).

3.7.3 Uji Kadar Air Serbuk Simplisia

Analisis kadar air pada simplisia dilakukan dengan metode gravimetri, yang bertujuan untuk menentukan jumlah kandungan air dalam bahan, karena kadar air yang tinggi dapat memengaruhi kemurnian dan meningkatkan risiko kontaminasi (Depkes RI, 2000). Prosedur pengujian dilakukan dengan menimbang sekitar 10 gram serbuk simplisia ke dalam wadah yang telah ditera. Sampel kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C selama 5 jam, lalu ditimbang kembali. Pengeringan dan penimbangan dilanjutkan setiap satu jam hingga selisih berat antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25%. Menurut Huda *et al.* (2019), kadar air simplisia yang ideal tidak melebihi 10%, karena kadar air di atas ambang tersebut dapat menyebabkan pertumbuhan jamur (Ratnani *et al.*, 2015). Perhitungan kadar air mengacu pada rumus dari Depkes RI (2000) sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{A-B}{A} \times 100\%$$

3.7.4 Pembuatan Ekstrak Daun pepaya

Sebanyak 500 gram bubuk simplisia dari daun pepaya digunakan dalam proses maserasi (Dwi Ratna et al., 2015). Bubuk ini dimasukkan ke dalam kontainer yang tertutup, selanjutnya ditambahkan 5000 mL etanol 70% dan diaduk sampai merata. Campuran ini kemudian disimpan di lokasi gelap yang terhindar dari sinar matahari langsung selama tiga hari, untuk mencapai keseimbangan konsentrasi antara pelarut dan zat aktif dalam bahan. Selama proses maserasi, larutan diaduk secara berkala setiap harinya. Setelah tiga hari perendaman, campuran disaring untuk memperoleh maserat. Maserasi diteruskan dengan tahap pemekatan yang memanfaatkan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental dari daun pepaya (Depkes RI, 2017). Ekstrak kental yang dihasilkan selanjutnya dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Rendemen ekstrak (\%)} = \frac{\text{Bobot awal} - \text{Bobot akhir}}{\text{Bobot awal}} \times 100\%$$

3.8 Fraksinasi

Proses fraksinasi dari ekstrak daun pepaya dilakukan dengan cara pemisahan cair-cair yang memanfaatkan perbedaan polaritas antar pelarut (Harborne, 2006). Sebanyak 5 gram dari ekstrak daun pepaya dilarutkan dalam 25 mL aquadest. Setelah itu, ditambahkan 25 mL n-heksan, dicampurkan dengan kuat, dan dilakukan pemisahan antara fraksi n-heksan dan fraksi air. Fraksi air yang diperoleh kemudian dikembalikan ke corong pisah, ditambahkan 25 mL etil asetat, dicampurkan, dan dipisahkan lagi antara fraksi etil asetat dan fraksi air. Setiap langkah penyaringan dilakukan sebanyak tiga kali dengan menggunakan volume pelarut yang serupa. Fraksi yang dihasilkan dari pemisahan ini kemudian diuapkan dalam bak air pada suhu 50°C hingga menghasilkan ekstrak yang kental (Ditjen POM, 2000). Volume pelarut yang dipakai disesuaikan dengan jumlah air yang ditambahkan ke dalam ekstrak, dengan perbandingan 1:1 (Nuria et al., 2012). Rendemen dari fraksi kental yang dihasilkan kemudian dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen fraksi (\%)} = \frac{\text{Berat fraksi kental}}{\text{Berat ekstrak kental}} \times 100\%$$

3.9 Skrining Fitokimia

Abriyani et al. (2022) dan Jumadi (2023) menyatakan bahwa skrining fitokimia bertujuan untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa metabolit sekunder dalam suatu sampel. Identifikasi ini dilakukan melalui berbagai uji spesifik terhadap golongan senyawa tertentu, dengan tahapan pengujian sebagai berikut:

1. Identifikasi Alkaloid

Ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 mL larutan HCl 2N dan dikocok hingga larut secara merata. Campuran tersebut kemudian dibagi ke dalam dua tabung reaksi terpisah. Masing-masing tabung diberi satu tetes reagen: tabung pertama dengan reagen Dragendorff dan tabung kedua dengan reagen Mayer. Munculnya endapan merah pada penambahan reagen Dragendorff serta endapan kuning pada penambahan reagen Mayer mengindikasikan bahwa ekstrak yang diuji menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa alkaloid.

2. Identifikasi Flavonoid

Ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium dalam jumlah yang cukup serta 10 tetes asam klorida pekat. Indikasi adanya senyawa flavonoid ditandai dengan munculnya perubahan warna menjadi hitam kemerahan, kuning, atau jingga.

3. Identifikasi Tanin

Sejumlah 3 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 tetes larutan gelatin. Munculnya endapan putih menandakan bahwa ekstrak tersebut menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa tanin.

4. Identifikasi Kuinon

Sejumlah ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditetesi dengan larutan natrium hidroksida (NaOH). Indikasi positif terhadap keberadaan senyawa kuinon ditunjukkan oleh perubahan warna larutan menjadi kuning tua, jingga, atau merah.

5. Identifikasi Saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan sampel ke dalam aquadest, kemudian dipanaskan selama 15 menit. Setelah itu, larutan dikocok selama 10–15 detik.

Apabila terbentuk buih yang stabil dan bertahan selama kurang lebih 10 menit, serta tidak menghilang setelah penambahan beberapa tetes larutan asam klorida 2N, maka hasil uji menunjukkan bahwa sampel positif mengandung senyawa saponin.

6. Identifikasi Fenolik

Sejumlah 1 gram ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan sebanyak 10 tetes larutan FeCl_3 1%. Munculnya perubahan warna menjadi merah, biru, ungu, hitam, atau hijau menunjukkan hasil positif terhadap keberadaan senyawa golongan fenolik dalam sampel.

7. Identifikasi Terpenoid

Sejumlah 2 gram ekstrak ditambahkan dengan pereaksi Libermann-Burchard. Perubahan warna larutan menjadi merah atau violet mengindikasikan bahwa sampel menunjukkan hasil positif terhadap kandungan senyawa golongan steroid atau triterpenoid.

8. Identifikasi Steroid

Sejumlah 2 gram ekstrak ditambahkan pereaksi Libermann-Burchard. Terbentuknya warna hijau menandakan bahwa sampel menunjukkan reaksi positif terhadap kandungan senyawa golongan steroid.

3.10 Penyiapan Uji aktivitas Antibakteri

3.10.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan prosedur untuk membasmi seluruh mikroorganisme, seperti bakteri, jamur, protozoa, mikoplasma, dan virus yang mungkin terdapat pada suatu objek (Raudah et al., 2017). Alat dan bahan biasanya disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atmosfer selama 15 menit. Sedangkan larutan dan media disterilkan dengan cara dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer yang ditutup menggunakan kapas steril serta dibalut aluminium foil untuk mencegah terjadinya kontaminasi (Pratiwi, 2008).

3.10.2 Pembuatan Larutan Uji

Masing-masing fraksi, yaitu n-heksan, etil asetat, dan etanol, disiapkan dalam variasi konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%. Setiap fraksi

kemudian diencerkan dengan pelarut yang sesuai hingga mencapai volume akhir 100 mL. Fraksi n-heksan dilarutkan dalam n-heksan, fraksi etil asetat dalam etil asetat, dan fraksi etanol dalam etanol.

3.10.3 Pembuatan Media Blood Agar

Media agar darah dimanfaatkan untuk menumbuhkan serta mengisolasi bakteri patogen, terutama jenis yang memerlukan darah sebagai faktor pendukung pertumbuhan, seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, dan *Neisseria* sp. (Djannatun *et al.*, 2019).

Media agar darah dibuat dengan menimbang 40 gram Blood Agar Base (Oxoid) lalu menambahkan air suling (aquades) hingga mencapai volume akhir 1000 mL. Campuran ini kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, media didinginkan hingga mencapai suhu 45–50°C. Pada tahap ini, darah steril yang telah didefibrinasi dari manusia golongan O, AB, dan darah domba ditambahkan masing-masing sebanyak 7%. Setelah homogen, media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL per cawan, dengan jumlah total 9 petri (Krihariyani *et al.*, 2016).

3.10.4 Peremajaan Bakteri

Proses ini bertujuan untuk menjaga kualitas pertumbuhan bakteri dengan menggunakan media Blood Agar miring. Setiap media diinokulasi dengan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang dioleskan menggunakan kapas lidi steril pada permukaan agar. Setelah inokulasi, media diinkubasi pada suhu 37–38°C selama 24 jam (Yusriana *et al.*, 2014). Standar kekeruhan McFarland sebesar 0,5 digunakan sebagai acuan populasi bakteri, yang setara dengan sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Forbes *et al.*, 2017).

3.10.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri disiapkan dengan menumbuhkan kultur *Streptococcus pneumoniae* dalam tabung berisi 5 mL media Blood Agar, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah proses inkubasi, suspensi tersebut diencerkan menggunakan larutan NaCl steril

0,9% sampai tingkat kekeruhannya sesuai dengan standar McFarland 0,5 (Krishna, 2013). Standar McFarland 0,5 mengindikasikan populasi bakteri sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Forbes *et al.*, 2017).

3.11 Uji Antibakteri Metode Difusi Agar

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran (well diffusion) sesuai prosedur yang telah dimodifikasi dari metode standar (CLSI, 2012; Suhendra *et al.*, 2021). Media padat yang digunakan adalah *Blood Agar Plate* (BAP) yang disterilkan dan dicurahkan ke cawan petri, kemudian dibiarkan memadat. Suspensi bakteri uji, seperti *Streptococcus pneumoniae*, disesuaikan dengan standar kekeruhan McFarland 0,5, lalu dioleskan secara merata ke permukaan media menggunakan cotton bud steril.

Setelah media mengering, dibuat sumur dengan diameter ± 6 mm menggunakan bor steril. Setiap sumur diisi dengan larutan ekstrak etanol daun *Carica papaya* dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 7,5%, dan 10%. Sebagai kontrol positif digunakan chlorhexidine gluconate 0,2%, dan sebagai kontrol negatif digunakan aquadest steril.

Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 35–37°C selama 24 jam dalam inkubator (kondisi anaerob jika diperlukan, menggunakan anaerob jar dan GasPak CO₂). Setelah inkubasi, zona hambat di sekitar sumur diukur dalam satuan milimeter sebagai indikator aktivitas antibakteri dari masing-masing konsentrasi ekstrak (Djide *et al.*, 2020).

3.12 Pengukuran Zona Hambat

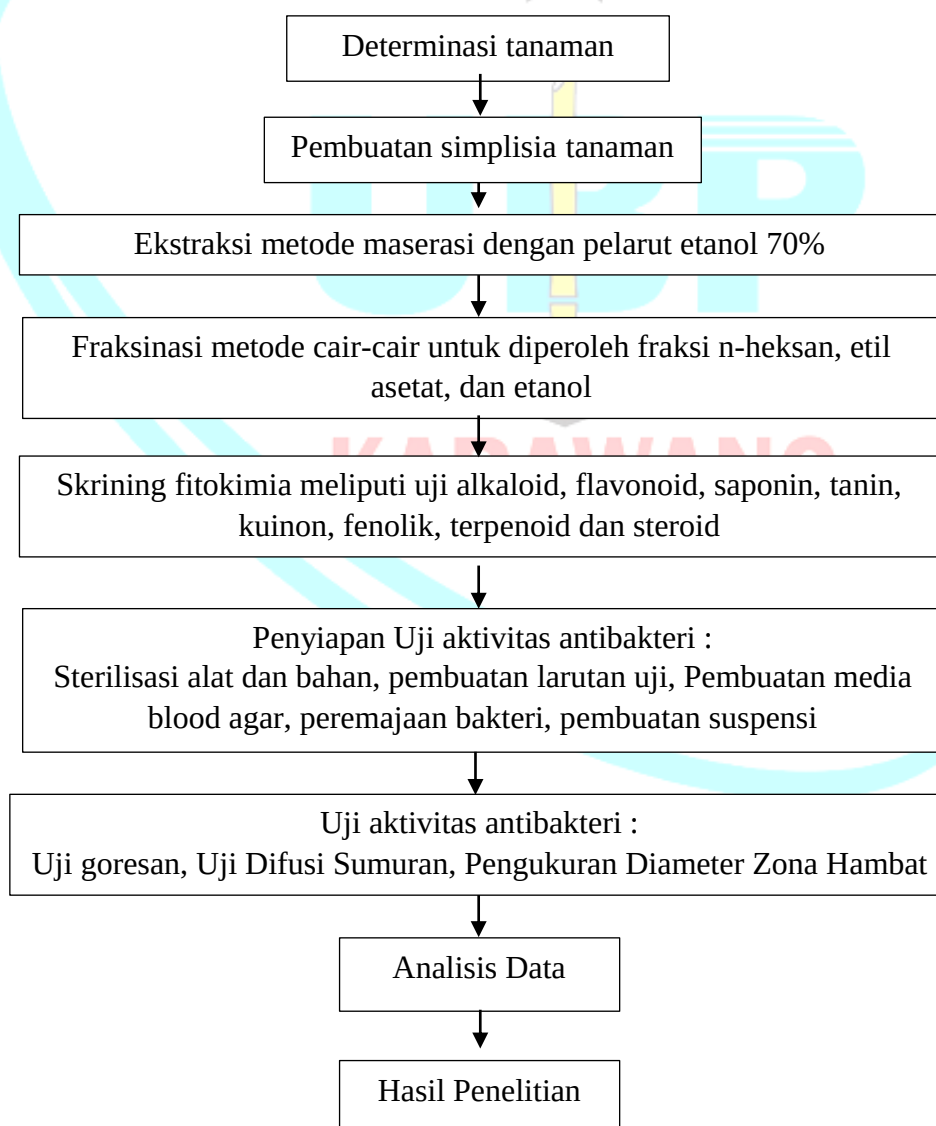
Pengukuran zona hambat dilakukan menggunakan alat bantu seperti mistar berskala atau jangka sorong, dengan cara mengukur diameter daerah bening yang terbentuk di sekitar cakram kertas, baik secara horizontal maupun vertikal. Hasil pengukuran dinyatakan dalam satuan milimeter (mm). Untuk memperoleh data yang lebih presisi, pengukuran dilakukan sebanyak tiga kali (Mulyatni, 2012). Selanjutnya, data rata-rata dianalisis menggunakan rumus penghitungan diameter zona hambat sebagai berikut:

$$\text{Diameter Zona Hambat} : \frac{(Dv - Ds) + (Dh - Ds)}{2}$$

Menurut Handayani (2019), diameter zona hambat digunakan sebagai parameter untuk menentukan tingkat efektivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Klasifikasi penghambatan dibagi menjadi sangat kuat apabila diameter lebih dari 21 mm, kuat pada rentang 11–20 mm, sedang antara 6–10 mm, dan lemah jika kurang dari 5 mm

3.13 Diagram Alir Penelitian

Diagram alir penelitian digunakan sebagai alat untuk merancang tahapan penelitian dengan menggambarkan subjek penelitian, variabel yang diteliti, dan variabel yang memengaruhi (Hidayat, 2003). Diagram alir yang diterapkan dalam penelitian ini disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3. 1 Diagram Alir Penelitian

3.14 Analisis Data

Data yang diperoleh (diameter zona hambat) dianalisis untuk menentukan potensi antibakteri ekstrak daun pepaya. Bandingkan hasil ekstrak dengan kontrol positif untuk menilai efektivitasnya. Jika ada efek antibakteri, identifikasi konsentrasi ekstrak yang paling efektif. data dianalisis menggunakan program GraphPad Prism versi 10.4.2.633 dengan metode *One-way* ANOVA dan dilanjutkan dengan uji Dunnett's Multiple Comparisons, yang dibandingkan dengan kontrol negatif (DMSO).

