

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Metode yang digunakan yaitu eksperimental untuk mengetahui efektivitas antibakteri terhadap dua jenis bakteri. Penelitian ini menguji efektivitas ekstrak etanol 70% daun pepaya terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 PK/5 dan *Salmonella typhi* ATCC 6539. Proses pengujian dilakukan secara triplo dengan berbagai konsentrasi yaitu 100%, 50% 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125%.

3.2 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan seperti autoklaf (Hirayama), batang pengaduk, blender, botol coklat, botol vial, cawan petri, erlenmeyer 250 mL (Iwaki), gelas kimia 250 mL (Iwaki), gelas ukur 100 mL (Iwaki), inkubator (Memmert IN 55%), jangka sorong (Digital Caliper), jarum ose, lampu bunsen, mikropipet (Dragonlab), *Laminar Air Flow* (Monmouth), rak tabung reaksi, *hot plate* (Stuart), *water bath* (Stuart), oven (Heratherm), pipet tetes, pinset, tabung reaksi (Pyrex), timbangan analitik (Henher), *rotary evaporator*, pelubang sumuran, cawan porselin, loyang oven, corong (Pyrex), *magnetic stirrer*, dan maserator.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan seperti *aluminium foil*, aquadest (H_2O), asam sulfat 1% (H_2SO_4), bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhi*, daun pepaya (*Carica papaya* L.), eritromisin, dimetil sulfoksida 10% (DMSO), etanol 70% (C_2H_5OH), kertas saring, *Nutrient Agar* (NA), natrium klorida (NaCl) 0,9%, besi (III) klorida 10%, ($FeCl_3$), Mg, HCl 2N, reagen *Dragendorff*, *Mayer*, *Liebermann-Burchard*, kloroform, kassa steril, kapas steril dan kertas cokelat.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Mikrobiologi Universitas Buana Perjuangan Karawang. Penelitian dilakukan dari bulan Februari 2025 sampai Juli 2025.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Klasifikasi Variabel

a. Variabel Bebas

Variabel dalam penelitian ini meliputi ekstrak etanol 70% daun pepaya (*Carica papaya* L.) yang digunakan dengan berbagai konsentrasi.

b. Variabel Terikat

Variabel dalam penelitian ini meliputi skrining fitokimia dan diameter zona hambat yang dihasilkan.

c. Variabel Terkendali

Variabel dalam penelitian ini meliputi kualitas media yang digunakan, akurasi peralatan yang digunakan untuk mengambil volume sampel, dan tingkat akurasi selama penyiapan media agar. Untuk memungkinkan interpretasi hasil penelitian yang valid.

3.4.2 Definisi Operasional Variabel

Adapun definisi operasional variabel dapat dilihat pada tabel dibawah ini sebagai berikut:

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi	Alat Ukur	Skala	Hasil Ukur
Variabel Bebas					
1	Ekstrak daun pepaya	Konsentrasi yang diperoleh dan didapatkan dari sampel yang dibuat dengan variasi konsentrasi	Uji Antibakteri	Nominal	Ekstrak dibuat dengan konsentrasi 100%, 50% 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125%

Variabel Terikat					
2	Antibakteri	Pengujian berdasarkan nilai daya hambat pada media	-	Rasio	mm (milimeter)
3	Skrining Fitokimia Tanin	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa tanin	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
4	Skrining Fitokimia Flavonoid	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa flavonoid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
5	Skrining Fitokimia Saponin	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa saponin	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
6	Skrining Fitokimia Alkaloid	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa alkaloid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
7	Skrining Fitokimia Fenolik	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa fenolik	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif

8	Skrining Fitokimia Terpenoid dan Steroid	Pengujian dengan pereaksi yang ditandai dengan adanya perubahan warna yang menandakan terdapatnya senyawa terpenoid dan steroid	Pereaksi	Nominal	1. Positif 2. Negatif
---	--	---	----------	---------	--------------------------

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tanaman

Tujuan determinasi yaitu untuk mengidentifikasi dan memastikan kebenaran bahan yang digunakan dalam penelitian ini. Proses identifikasi tanaman pada daun pepaya dilakukan di Laboratorium Biologi (FMIPA), Universitas Padjadjaran (UNPAD).

3.5.2 Preparasi Simplisia

Daun pepaya yang matang, hijau, dan segar dipilih sebagai bahan untuk pembuatan ekstrak. Daun pepaya yang tua dipilih karena mengandung enzim papain dalam jumlah yang lebih tinggi. Enzim ini bertindak sebagai racun dan dapat menyebabkan gangguan pencernaan pada serangga (Azhari *et al.*, 2022). Setelah dipilih daun ditimbang, dicuci bersih dengan air mengalir, di potong kecil-kecil dan dikeringkan. Proses pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air pada daun pepaya. Pengeringan dilakukan dengan oven pada suhu 50°C selama 6 jam (Raja *et al.*, 2019). Setelah proses pengeringan selesai, daun pepaya diblender hingga menjadi serbuk halus (Putri & Trimulyono, 2023).

3.5.3 Ekstraksi Simplisia

Ekstrak daun pepaya dibuat dengan merendam serbuk daun pepaya dengan etanol 70% menggunakan perbandingan 1:5, yaitu dengan mencampurkan 100 g bubuk daun pepaya dengan 500 mL larutan etanol (Waruwu *et al.*, 2021). Untuk memulai proses ini, 100 g bubuk

daun pepaya direndam dalam 500 mL etanol 70% masukkan kedalam wadah, lalu ditutup rapat dan didiamkan selama tiga hari, sambil diaduk. Larutan kemudian disaring dan residu yang tersisa dimaserasi ulang sebanyak 500 mL etanol 70% selama 24 jam. Selanjutnya, hasil filtrat dicampur untuk menghasilkan ekstrak daun pepaya cair (Maharani *et al.*, 2022). Ekstrak cair selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan speed nomor 2. Ekstrak kental diperoleh dari hasil menguapkan ekstrak cair dalam penangas air pada suhu 50°C. Menurut (Pujiastuti & El'Zeba, 2021), ekstrak daun pepaya disimpan dalam wadah kaca dengan segel pengaman dan terlindung dari sinar matahari.

Rendemen yang diperoleh ditimbang, dan hitung berat antara rendemen ini dengan berat serbuk yang ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Rendemen (\%)} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Simplisia Awal}} \times 100\% \quad (3.1)$$

3.5.4 Uji Skrining Fitokimia

1. Uji Tanin

Ditambahkan 1 mL ekstrak ke tabung reaksi, kemudian tambahkan 10 tetes larutan FeCl_3 10%. Warna hijau kehitaman atau biru kehitaman menunjukkan adanya tanin dalam ekstrak (Potti *et al.*, 2022).

2. Uji Flavonoid

Ditambahkan 1 mL ekstrak ke tabung reaksi, kemudian tambahkan 2 mg bubuk Mg dan 3 tetes HCl 2N. Perubahan warna diamati setelah pengocokan. Menurut (Potti *et al.*, 2022), larutan yang terbentuk warna merah atau jingga menunjukkan adanya flavonoid.

3. Uji Saponin

Ditambahkan 1 mL ekstrak ke tabung reaksi dan tambahkan 5 mL aquadest panas. Selama 10 menit, campuran dikocok dengan kuat. Munculnya busa yang berlangsung sekitar 7 menit merupakan tanda

hasil positif. Dimasukkannya HCl 2N juga menandakan adanya saponin (Potti *et al.*, 2022).

4. Uji Alkaloid

Pada setiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL ekstrak. Selanjutnya ditambahkan masing-masing 2 tetes pereaksi *Dragendroff* dan *Mayer*, serta 12 tetes H_2SO_4 . Pembentukan endapan merah jingga dengan pereaksi *Dragendroff* dan endapan putih atau kuning pada pereaksi *Mayer* menegaskan keberadaan alkaloid dalam ekstrak (Potti *et al.*, 2022).

5. Uji Fenolik

Ditambahkan 2 mL ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquadest dan dikocok, selanjutnya 10 tetes FeCl_3 10% ditambahkan. Perubahan warna dari hijau menjadi ungu menunjukkan adanya senyawa fenolik (Waruwu *et al.*, 2021).

6. Uji Terpenoid dan Steroid

Ditambahkan 2 mL ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi. Setelah itu, 0,5 mL kloroform dan 0,5 mL reagen *Lieberman-Buchard* ditambahkan. Jika terbentuk warna coklat kemerahan atau ungu, hal ini menunjukkan adanya terpenoid. Sebaliknya, perubahan warna menjadi biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Waruwu *et al.*, 2021).

3.5.5 Uji Antibakteri

1. Sterilisasi Alat

Alat berbahan kaca disterilkan dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Sementara itu, alat berbahan plastik disterilkan dengan alkohol 70%. Sebagaimana dijelaskan oleh (Nor *et al.*, 2018), jarum ose dilakukan proses sterilisasi dengan ujungnya dipanaskan dalam lampu bunsen.

2. Pembuatan Larutan

a. Larutan Kontrol Positif

Di timbang sebanyak 1 mg eritromisin dan dilarutkan dengan 1 ml DMSO 10%, kemudian di aduk hingga larut (Inanta *et al.*, 2023). Eritromisin dipilih karena sebagai merupakan antibiotik golongan makrolida dengan mekanisme menghambat sintesis protein sel bakteri yang digunakan secara luas untuk menghambat bakteri gram positif dan negatif (Herawati *et al.*, 2024). Eritromisin bekerja dengan menghambat sintesis protein di dalam sel bakteri, yang menyebabkan kerusakan permanen pada membran sel (Hasanah *et al.*, 2023).

b. Larutan Kontrol Negatif

DMSO dengan konsentrasi 10% digunakan sebagai larutan kontrol negatif. Untuk menyiapkan kontrol negatif, 10 mL DMSO 10% dilarutkan, kemudian ditambahkan aquadest hingga 100 mL. Dimetil sulfoksida (DMSO) dipilih sebagai kontrol negatif, karena sebagai pelarut efektif yang tidak memengaruhi larutan uji (Katrin *et al.*, 2015).

c. Larutan Konsentrasi Ekstrak

Larutan uji dibuat dengan berbagai konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,125%. Konsentrasi tersebut merujuk pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh (Wiharningtias *et al.*, 2016). Untuk membuat larutan dengan konsentrasi 100% sebanyak 1 g ekstrak dicampurkan ke dalam 1 mL larutan DMSO 10%. Konsentrasi 50% sebanyak 0,5 g ekstrak dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%. Selain itu, untuk konsentrasi 25% sebanyak 0,25 g ekstrak dicampurkan dalam 1 mL DMSO 10%. Konsentrasi 12,5% sebanyak 0,125 g ekstrak dicampur dalam 1 mL DMSO 10%, untuk konsentrasi 6,25% sebanyak 0,062 g ekstrak dicampur dalam 1 mL DMSO 10%. Terakhir, untuk konsentrasi 3,125% sebanyak 0,031 g ekstrak dilarutkan dalam 1 mL DMSO 10%.

Konsentrasi ekstrak ditentukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Utami *et al.*, 2023) menggunakan rumus $\% = b/v$.

3. Pembuatan Media Bakteri

Dimasukkan 2,8 g media NA ke dalam *Erlenmeyer* dan ditambahkan 100 mL aquadest. Larutan diaduk dan dipanaskan hingga larut sempurna. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, media dibiarkan memadat selama 30 menit (Sarnia *et al.*, 2023).

4. Peremajaan Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan *Bacillus subtilis* dan *Salmonella typhi*, yang berasal dari kultur murni. Untuk melakukan proses peremajaan bakteri, 1 ose diambil dari kultur murni dan digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA). Kemudian, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Sarnia *et al.*, 2023).

5. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Setelah proses peremajaan, 1-2 ose bakteri diambil serta dibuat suspensi dalam tabung reaksi berisi 10 mL larutan NaCl 0,9%. Tujuan proses ini adalah mencapai kekeruhan yang sesuai dengan standar McFarland 0,5, yang setara dengan jumlah bakteri sekitar 10^8 (CFU)/mL. (Nor *et al.*, 2018), jumlah bakteri yang memenuhi syarat untuk uji berkisar antara 10^5 hingga 10^8 (CFU)/mL.

6. Uji KHM

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran pada media *Nutrient Agar* (NA). Suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan *Salmonella typhi* digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat menggunakan kapas lidi steril (Maharani *et al.*, 2022). Sebagai langkah selanjutnya, sumuran berdiameter sekitar 6 mm dibuat untuk menambahkan ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,7%, 0,3% dan 0,1%. Diambil masing-masing 50 μ L untuk tiap konsentrasi. Kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Wiharningtias *et al.*, 2016).

Menurut (Nirmalasari *et al.*, 2023) konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kejernihan yaitu disebut KHM.

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode sumuran pada media *Nutrient Agar* (NA). Suspensi bakteri *Bacillus subtilis* dan *Salmonella typhi* digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA) yang telah memadat menggunakan kapas lidi steril (Maharani *et al.*, 2022). Sebagai langkah selanjutnya, sumuran berdiameter sekitar 6 mm dibuat untuk menambahkan ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Selanjutnya, kontrol positif yaitu eritromisin dan kontrol negatif DMSO 10% ditambahkan ke dalam sumuran, masing-masing dengan volume 50 µL. Setelah itu, media disimpan pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat terhadap pertumbuhan *Bacillus subtilis* dan *Salmonella typhi* terbentuk setelah masa inkubasi, dan diameternya diukur dengan jangka sorong. Suhu inkubasi sekitar 37°C dipilih karena sesuai dengan fase pertumbuhan bakteri (Sarnia *et al.*, 2023).

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun pepaya ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat dalam milimeter (mm) menggunakan jangka sorong. Diameter zona hambat diukur menggunakan rumus berikut (As`ad *et al.*, 2024) :

$$\text{Zona hambat} = \frac{(D_v - D_s) + (D_h - D_s)}{2} \quad (3.2)$$

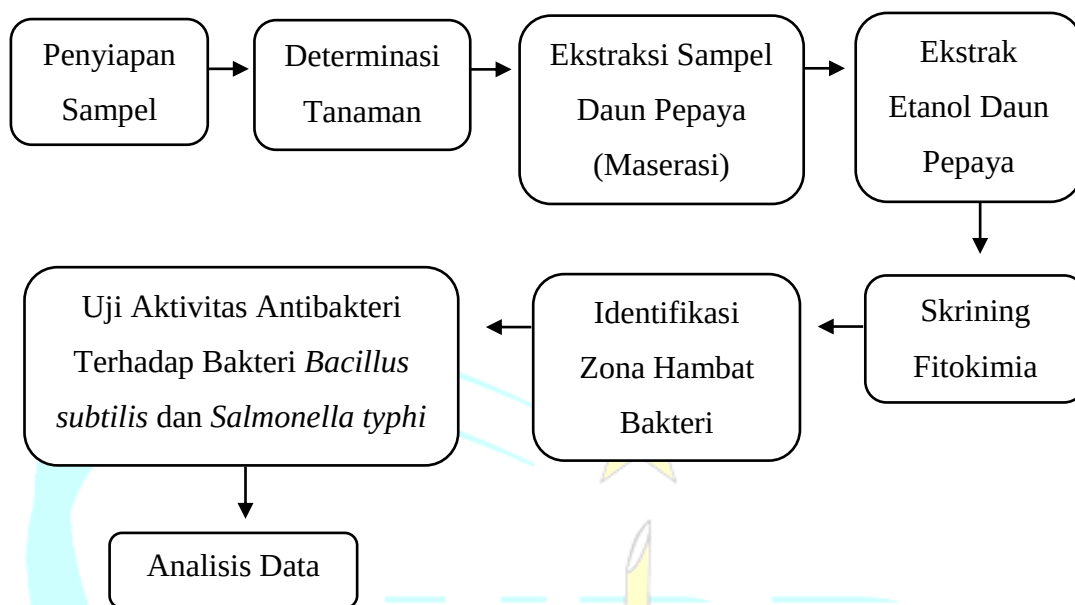
Keterangan :

Dv = diameter vertikal

Dh = diameter horizontal

Ds = diameter sumuran (6 mm)

3.6 Diagram Alir Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

3.7 Analisis Data

Diameter zona hambat yang diuji diukur dengan jangka sorong untuk menganalisis data efektivitas antibakteri. Selain itu, analisis statistik dilakukan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) untuk mengidentifikasi perbedaan nilai antar kelompok penelitian.