

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental *post control group design* dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L*) sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae*. Uji dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada medium *broth* untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan tahap *streaking* pada media NAP untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM).

4.2 Sampel Penelitian

Sampel Bakteri *Shigella dysenteriae* isolat 2312 – F dengan kepadatan 10^6 CFU/ml yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Estimasi Jumlah Pengulangan Sampel

Dasar pengulangan adalah dengan rumus (Lukito, 1998) :

$$p(n - 1) \geq 15$$

Keterangan : n : Jumlah pengulangan

p : Jumlah perlakuan (jumlah isolat + jumlah konsentrasi)

Pada penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi (12%, 14%, 16%, 18%, dan 20%) dari ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*) dan 1 Kontrol Bakteri (KK) *Shigella dysenteriae* tanpa diberi ekstrak etanol daun pepaya

(*Carica papaya* L.) ($p = 5 + 1$) = 6, maka berdasarkan perhitungan rumus

Notobroto (2005) didapatkan :

$$p(n - 1) \geq 15$$

$$6(n - 1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5 \rightarrow 4$$

Jadi jumlah pengulangan sampel pada penelitian ini adalah minimal 4 kali pengulangan

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam kurun waktu 2 bulan antara bulan April – Juni 2012.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya* L.) dengan konsentrasi 12%, 14%, 16%, 18%, dan 20%.

Konsentrasi tersebut diperoleh melalui eksplorasi (penelitian pendahuluan).

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat kekeruhan pada tabung untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* pada media agar padat (NAP) untuk menentukan KBM.

4.6 Definisi Operasional

- Bakteri *Shigella dysenteriae* yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri yang berasal dari feses dengan kode isolat 2312 – F.
- Daun pepaya yang digunakan adalah daun pepaya tua yang dipilih secara acak di Malang tanpa memperdulikan jenis pepaya.
- Ekstrak daun pepaya yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun pepaya kering yang diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi yang dilanjutkan dengan proses evaporasi.
- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun pepaya yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji, ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada bakteri uji yang diberi ekstrak etanol daun pepaya. (Dzen *et al.*, 2010)
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak etanol daun pepaya yang mampu membunuh *Shigella dysenteriae* ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan bakteri. (Dzen *et al.*, 2010)

4.7 Alat dan Bahan

4.7.1 Alat

Neraca analitik, labu erlenmeyer, mikroskop, pembakar Bunsen, klem dan statis, labu ekstraksi, cawan petri, obyek glass, minyak emersi, kertas saring, saringan, stiker label, labu destilasi, inkubator, rotary evaporator, water batch, corong pisah, pendingin spiral, ose, spektrofotometer, pipet ukur, colony counter, tabung reaksi, pisau.

4.7.2 Bahan – bahan

- Daun pepaya segar 1 kg
- Bakteri *Shigella dysenteriae*
- Etanol 96%
- Aquadest steril
- NaCl
- Nutrient broth
- *Mac Conkey Agar*
- *Nutrient Agar Plate (NAP)*
- *Triple Sugar Iron (TSI) Agar*
- Bahan pewarnaan Gram : Crystal Violet, Lugol, Alkohol 96%, Safranin

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*), identifikasi bakteri uji, persiapan suspensi uji bakteri dan uji antimikroba ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*

4.8.1 Persiapan Sampel Daun Pepaya

Daun pepaya tua yang didapatkan dari pasar tradisional dicuci bersih untuk menghilangkan debu dan kotoran lain yang melekat. Daun pepaya yang sudah bersih dipotong – potong (dirajang), lalu masukkan oven dengan suhu 40-60°C atau dengan panas matahari hingga kering (bebas kandungan air).

4.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pepaya

- a. Setelah kering, haluskan dengan blender sampai halus
- b. Timbang sebanyak 100 gram (sample kering)
- c. Masukkan 100 gram sample kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran \pm 1 L
- d. Kemudian rendam dengan etanol sampai volume 900 ml
- e. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit)
- f. Diamkan 1 malam sampai mengendap
- g. Ambil lapisan atas campuran etanol (pelarut) dengan zat aktif yang sudah tercampur (bisa dengan cara penyaringan menggunakan kertas saring)
- h. Lakukan proses perendaman ini sampai 3 kali

Proses evaporasi :

- a. Masukkan dalam labu evaporasi 1 L
- b. Pasang labu evaporasi pada evaporator
- c. Isi *water bath* dengan air sampai penuh
- d. Pasang semua rangkaian alat termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90° C atau sesuai dengan titik didih pelarut), sambungkan dengan aliran listrik
- e. Biarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu evaporasi
- f. Tunggu sampai aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu) \pm 900 mL
- g. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{4}$ dari bahan alam kering
- h. Masukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik / kaca

- i. Kemudian simpan dalam freezer

4.8.3 Identifikasi *Shigella dysenteriae*

4.8.3.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk menyaring bakteri *Shigella dysenteriae*.

Prosedur pewarnaan :

- a. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak lalu dibiarkan dingin.
- b. Satu tetes aquades steril atau larutan saline diteteskan pada gelas obyek.
- c. Dengan ose jarum steril, diambil sedikit koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan saline yang sudah diteteskan dahulu pada gelas obyek.
- d. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering, hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan 3 kali diatas api.
- e. Sediaan dituangi kristal Violet selama 1 menit, kemudian sisa kristal Violet dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dituangi Lugol selama 1 menit, kemudian sisa Lugol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
- g. Sediaan dituangi Alkohol 96% selama 5 – 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian sisa Alkohol 96% dibuang dan sediaan dibilas dengan air.

- h. Sediaan dituangi Safranin selama 1 menit, kemudian sisa Safranin dibuang dan sediaan dibilas dengan air lalu dikeringkan dengan kertas penghisap.
- i. Dilihat menggunakan mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 100x.
- j. Bakteri *Shigella dysenteriae* berbentuk batang dan berwarna merah (Gram negatif).

4.8.3.2 Kultur pada *Mac Conkey Agar*

Mac Conkey Agar merupakan medium diferensial untuk bakteri yang meragikan dan tidak meragikan laktosa. Prosedur :

- a. Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode *streaking* pada medium *Mac Conkey Agar*.
- b. Di inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18 – 24 jam, kemudian di amati hasilnya.
- c. Hasil dinyatakan positif apabila ditemukan morfologi koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang berbentuk konveks, bulat, transparan dengan tepi yang utuh dan mencapai diameter sekitar 2 mm dalam 24 jam, serta khas didapatkan mediumnya berwarna pucat (*non lactose fermenter*).

4.8.4 Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya L.*)

Prosedur :

- a. Disediakan 7 tabung reaksi steril, masing – masing diberi label penandaan 24%, 28%, 32%, 36%, 40% (setelah melalui penelitian pendahuluan), KK (kontrol bakteri), dan KB (kontrol bahan). Kontrol

bakteri adalah biakan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml tanpa ekstrak etanol daun pepaya. kontrol bahan adalah ekstrak etanol daun pepaya tanpa bakteri *Shigella dysenteriae*.

- b. Pada tabung 24% dimasukkan 0,24 ml ekstrak daun pepaya, kemudian ditambah 0,76 ml aquadest steril.
- c. Pada tabung 28% dimasukkan 0,28 ml ekstrak daun pepaya, kemudian ditambah 0,72 ml aquadest steril.
- d. Pada tabung 32% dimasukkan 0,32 ml ekstrak daun pepaya, kemudian ditambah 0,68 ml aquadest steril.
- e. Pada tabung 36% dimasukkan 0,36 ml ekstrak daun pepaya, kemudian ditambah 0,64 ml aquadest steril.
- f. Pada tabung 40% dimasukkan 0,40 ml ekstrak daun pepaya, kemudian ditambah 0,60 ml aquadest steril.
- g. Ke dalam tabung bertanda KK, dimasukkan 1 ml aquadest steril.
- h. Ke dalam tiap tabung di atas, dimasukkan masing – masing 1 ml biakan cair bakteri *Shigella dysenteriae*, kecuali tabung bertanda KB. Dengan demikian konsentrasi akhir tiap ekstrak etanol daun pepaya di dalam tabung berturut – turut adalah 12%, 14%, 16%, 18%, dan 20%.
- i. Ke dalam tabung bertanda KB dimasukkan 2 ml ekstrak etanol daun pepaya.
- j. Semua tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- k. Setelah 18 – 24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan selembar kertas putih dibelakang tabung, dimana pada

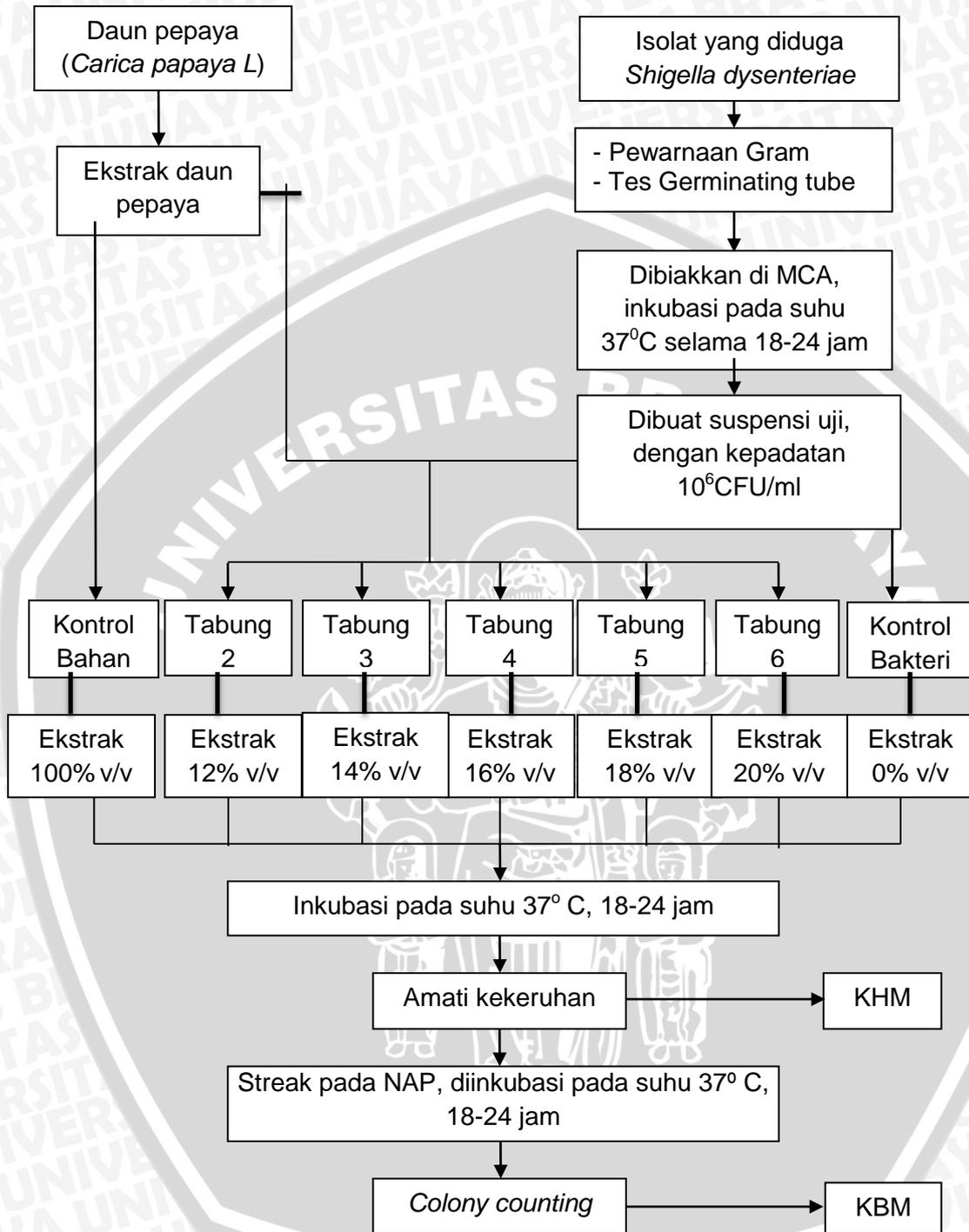
selembar kertas tersebut telah diberi beberapa garis hitam. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.

- l. Jumlah koloni dihitung dengan menggunakan *colony counter*.
- m. Untuk mengetahui KBM, dilakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media NAP, kemudian di inkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
- n. Setelah 18 – 24 jam, di hitung jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh dengan *colony counter*. Konsentrasi terendah dengan jumlah koloni $\leq 0,1\%$ adalah KBM.

4.9 Analisis Data

Data penelitian adalah jumlah koloni *Shigella dysenteriae* dan analisa data yang digunakan adalah *one way ANOVA*. Dengan menggunakan *one way ANOVA*, maka akan diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun pepaya terhadap *Shigella dysenteriae*.

Setelah itu dilakukan uji statistik regresi korelasi yang bertujuan untuk menentukan besarnya pengaruh dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun pepaya terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Dalam penelitian ini, besar interval kepercayaan yang dipakai adalah 95% ($\alpha = 0,05$).



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Daun Pepaya terhadap *Shigella dysenteriae*.