

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

3.1.1 Ruang Lingkup Ilmu

Penelitian ini adalah penelitian di bidang Ilmu Kimia Medik, Ilmu Mikrobiologi, dan Ilmu Farmakologi.

3.1.2 Ruang Lingkup Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.1.3 Ruang Lingkup Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Juni 2016.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

1) Tempat penelitian

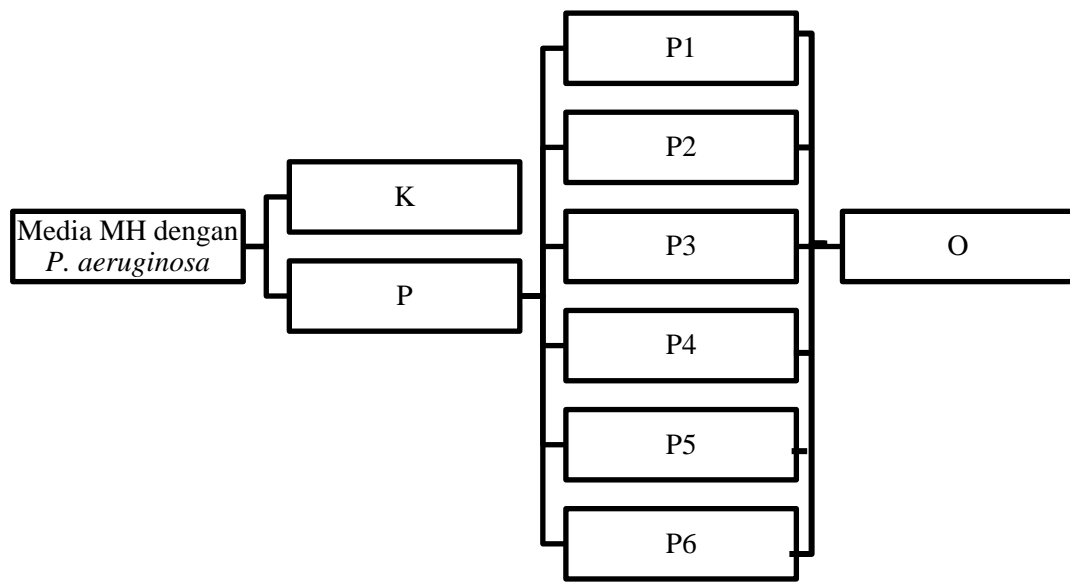
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang

2) Waktu penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April sampai Juni 2016

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan *post test only control group design*.



Gambar 3. Rancangan Penelitian

Keterangan:

K: Kelompok kontrol. Sampel diberi disk antibiotik

P: Kelompok perlakuan. Sampel diberi ekstrak daun pepaya

P1: Kelompok perlakuan 1. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 5%

P1: Kelompok perlakuan 1. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 5%

P2: Kelompok perlakuan 2. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 20%

P3: Kelompok perlakuan 3. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 35%

P4: Kelompok perlakuan 4. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 50%

P5: Kelompok perlakuan 5. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 65%

P6: Kelompok perlakuan 6. Sampel diberi ekstrak daun pepaya dengan konsentrasi sebesar 80%

O: Diukur diameter hambat

3.3.1 Variabel Bebas

Konsentrasi ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*)

Skala: rasio

3.3.2 Variabel Terikat

Pertumbuhan *P. aeruginosa*

Skala: rasio

3.3.3 Definisi Operasional Variabel

Tabel 2. Definisi Operasional Variabel

| No. | Variabel | Unit | Skala |
|-----|--|------------|-------|
| 1. | Ekstrak daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) Ekstrak daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) merupakan suatu hasil ekstraksi daun pepaya (<i>Carica papaya L.</i>), kemudian dibuat konsentrasi 80%, 65%, 50%, 35%, 20%, 5% dalam aquades. | % (persen) | rasio |
| 2. | Kadar Hambat Minimum Larutan sampel dengan konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri ditentukan dengan hasil pengukuran besar diameter zona hambat (gambaran kemampuan suatu zat dalam menghambat pertumbuhan bakteri) pada media tanam. | mm | rasio |

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Biakan bakteri *P. aeruginosa*.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Biakan bakteri *P. aeruginosa* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.4.3 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah biakan bakteri *P. aeruginosa* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.4.3.1 Kriteria inklusi

Koloni *P. aeruginosa* yang tumbuh pada media Mueller Hinton (MH) setelah dipaparkan dengan perlakuan dan diinkubasi pada lingkungan aerob pada suhu 35° C selama 18-24 jam.

3.4.3.2 Kriteria eksklusi

Koloni *P. aeruginosa* yang tumbuh pada media MH dengan disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

3.4.4 Cara sampling

Cara sampling yang digunakan pada penelitian ini adalah *non-probability sampling* jenis *consecutive sampling*.

3.4.5 Besar sampel

Pada penelitian ini akan dilakukan 4 kali replikasi terhadap masing masing konsentrasi dan kelompok kontrol. Maka, banyak sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 36.

3.5 Cara pengumpulan data

3.5.1 Bahan

- 1) Ekstrak daun pepaya
- 2) Suspensi bakteri *P. aeruginosa*
- 3) Bahan Media Mueller Hinton (MH):
 - Ekstrak daging 2gr/L

- *Acid Hydrolase of Casein* 17,5 gr/L
- Pati 1,5 gr/L
- Agar 17 gr/L

4) Aquades

3.5.2 Alat

- 1) Labu Erlenmeyer
- 2) Cawan petri
- 3) Timbangan
- 4) Gelas ukur
- 5) *Shaker*
- 6) Pipet ukur
- 7) Lidi Kapas Steril
- 8) Lampu Bunsen
- 9) *Autoclave*
- 10) Inkubator dengan suhu 35°C
- 11) *Agar hole punching apparatus*
- 12) Jangka sorong

3.5.3 Jenis data

Data yang dikumpulkan berdasarkan uji eksperimental yang dilakukan oleh peneliti di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro merupakan data primer berupa hasil pertumbuhan koloni *P. aeruginosa* pada media MH dan kelompok kontrol.

3.5.4 Persiapan Alat, Bahan dan Media

Semua alat, bahan, dan media yang digunakan pada penelitian disterilkan terlebih dahulu untuk mencegah kontaminasi, dengan menggunakan *autoclave* pada temperatur 121°C dengan tekanan 1-2 atm selama 15 menit, yang kemudian dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 2 jam.

3.5.5 Cara Kerja

3.5.5.1 Pembuatan Suspensi Bakteri

- 1) Mengambil bakteri *P. aeruginosa* dari media padat
- 2) Suspensikan bakteri tersebut dalam larutan NaCl 0,9% sampai didapatkan kekeruhan standar Mc Farland 0,5

3.5.5.2 Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya

- 1) Mengambil daun pepaya kemudian dipotong
- 2) Maserasi daun pepaya dengan ethanol 60%-70% dengan shaker
- 3) Menyaring daun pepaya
- 4) Memisahkan antara fase air dan fase ekstrak daun pepaya
- 5) Menguapkan pelarut ekstrak tersebut dalam suhu 30°-40°C selama 1-2 hari
- 6) Membuat ekstrak dalam konsentrasi berbeda dengan cara melarutkan dalam aquades dalam 1 ml campuran ekstrak:
 - Konsentrasi ekstrak 5%: 0,05 ml ekstrak + 0,95 ml pelarut
 - Konsentrasi ekstrak 20%: 0,2 ml ekstrak + 0,8 ml pelarut
 - Konsentrasi ekstrak 35%: 0,35 ml ekstrak + 0,65 ml pelarut
 - Konsentrasi ekstrak 50%: 0,5 ml ekstrak + 0,5 ml pelarut

- Konsentrasi ekstrak 65%: 0,65 ml ekstrak + 0,35 ml pelarut
 - Konsentrasi ekstrak 80%: 0,8 ml ekstrak + 0,2 ml pelarut
- 7) Merendam kertas filter Whatman yang sudah disterilisai pada masing-masing konsentrasi selama 24 jam

3.5.5.3 Pembuatan Media Mueller Hinton

- 1) Melarutkan 38 gr bahan media dalam 1 L air
- 2) Memanaskannya hingga mendidih sampai media larut
- 3) Meletakkan pada autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dinginkan pada suhu ruangan
- 4) Menuangkan bahan media yang sudah didinginkan ke cawan petri steril pada bidang horizontal agar kedalamannya seragam
- 5) Membiarkan media yang sudah diletakkan di cawan petri steril pada suhu ruangan
- 6) Memastikan pH akhir media yaitu pada $7,3 \pm$ pada suhu 25°C

3.5.5.4 Uji Kadar Hambat Minimum

Metode agar *well-diffusion*:

- 1) Menyiapkan media Mueller Hinton steril
- 2) Mengambil suspensi *P. aeruginosa* dengan lidi kapas steril
- 3) Meratakan suspensi pada media
- 4) Membuat sumur pada media menggunakan *agar hole punching apparatus* sebanyak 9 sumur
- 5) Meneteskan ekstrak pada sumur

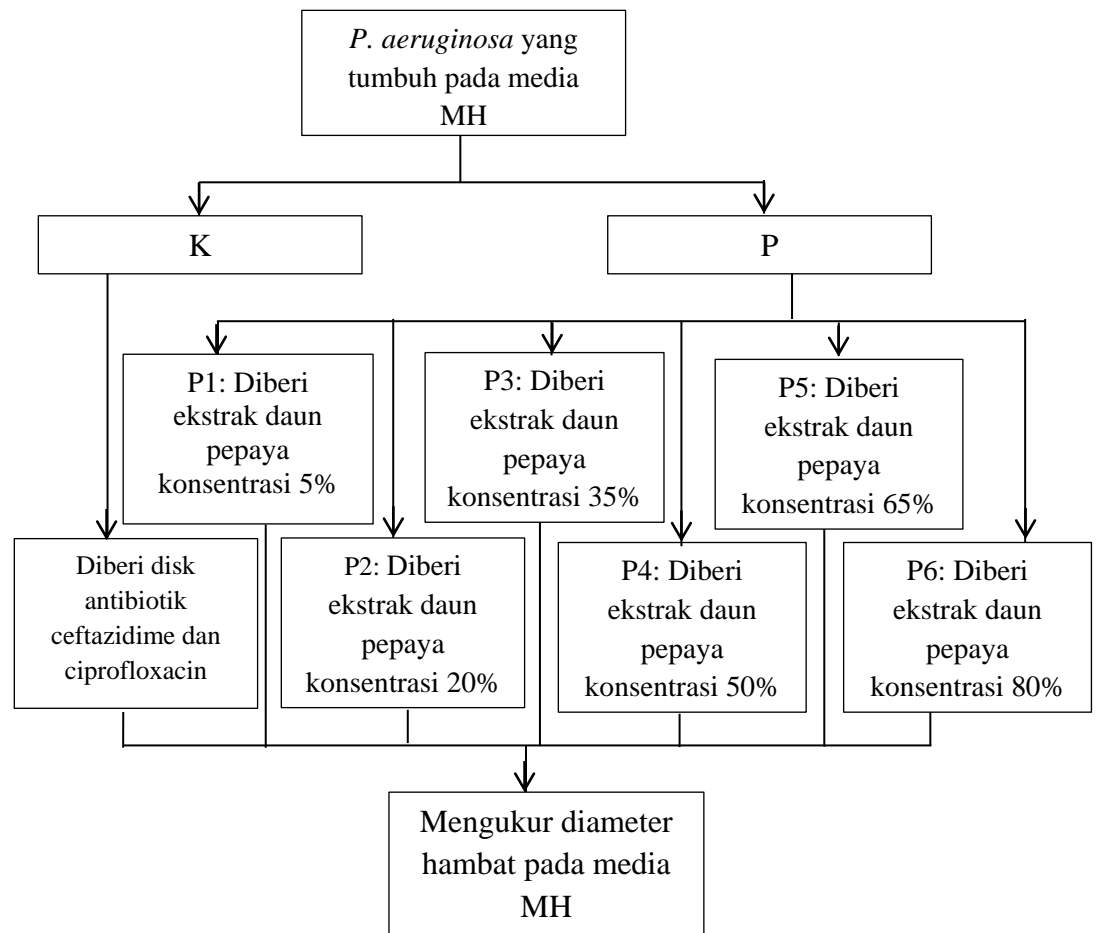
6) Menginkubasi pada lingkungan aerob dengan suhu 35°C selama 18-24 jam

7) Menghitung diameter hambat pada media dengan jangka sorong

Metode *disc-diffusion*:

- 1) Menyiapkan media Mueller Hinton steril
- 2) Mengambil suspensi *P. aeruginosa* dengan lidi kapas steril
- 3) Meratakan suspensi pada media
- 4) Meletakkan disk ekstrak pada permukaan media
- 5) Menginkubasi pada lingkungan aerob dengan suhu 35°C selama 18-24 jam
- 6) Menghitung diameter hambat media dengan menggunakan jangka sorong

3.6 Alur Penelitian



Gambar 4. Alur Penelitian

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian akan dilakukan uji normalitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro Wilk* karena jumlah sampel pada penelitian ini lebih dari 2. Apabila data tersebut berdistribusi normal maka dilakukan uji parametrik *one way Anova* untuk menganalisis perbedaan antar kelompok, kemudian dilanjutkan dengan uji *post hoc LSD* untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna. Apabila data tidak berdistribusi normal, dan mempunyai varians yang berbeda dilakukan uji

nonparametrik *Kruskal Wallis* yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney*. H_0 ditolak apabila nilai derajat kemaknaan adalah $p < 0,05$, pada interval kepercayaan 95%.

3.8 Etika Penelitian

Sebelum dilakukan penelitian dimintakan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, serta ijin penelitian di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.