

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Ruang Lingkup Penelitian

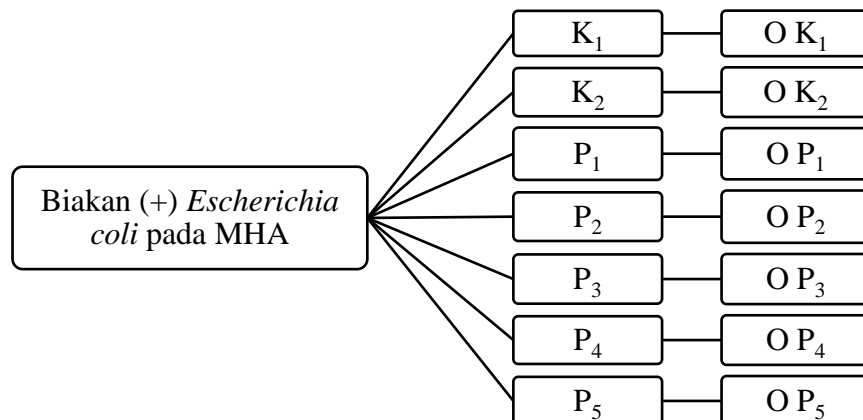
Ruang lingkup penelitian ini mencakup bidang Ilmu Kimia Medik, Ilmu Mikrobiologi, dan Ilmu Farmakologi.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro dan Laboratorium Kimia Pangan Semarang. Waktu penelitian dimulai pada bulan Juni sampai Oktober 2016.

3.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan jenis penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *post-test only control group design*. Berikut adalah tampilan dari skema rancangan penelitian:



Gambar 9. Rancangan Penelitian

Keterangan:

K₁ = Kontrol positif diisi Mueller Hinton Agar dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

K₂ = Kontrol negatif diisi Mueller Hinton Agar ditambah ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 50%

P₁ = Perlakuan 1 diisi campuran A (Mueller Hinton Agar + ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 10%) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

P₂ = Perlakuan 2 diisi campuran B (Mueller Hinton Agar + ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 20%) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

P₃ = Perlakuan 3 diisi campuran C (Mueller Hinton Agar + ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 30%) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

P₄ = Perlakuan 4 diisi campuran D (Mueller Hinton Agar + ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 40%) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

P₅ = Perlakuan 5 diisi campuran E (Mueller Hinton Agar + ekstrak biji pepaya serbuk konsentrasi 50%) dan suspensi bakteri *Escherichia coli* 1x10⁴ CFU

O K₁ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada K₁

O K₂ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada K₂

O P₁ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₁

O P₂ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₂

O P₃ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₃

O P₄ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₄

O P₅ = Pengamatan pertumbuhan bakteri pada P₅

3.4 Populasi dan Sampel

3.4.1 Populasi Target

Populasi target dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*.

3.4.2 Populasi Terjangkau

Populasi terjangkau dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro Semarang.

3.4.3 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah bakteri *Escherichia coli* strain standart (ATCC 25922) yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang.

3.4.3.1 Kriteria Inklusi

Koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada media Mueller Hinton Agar dengan perlakuan dan diinkubasi pada lingkungan anerob pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

3.4.3.2 Kriteria Eksklusi

Koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada media Mueller Hinton Agar disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

3.4.4 Cara Sampling

Pada penelitian ini sampel homogen berupa koloni *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Nasional Diponegoro dan memenuhi kriteria inklusi serta eksklusi, sehingga tidak dilakukan randomisasi.

3.4.5 Besar Sampel

Sampel penelitian ini ditentukan menurut rumus Federer untuk uji eksperimental, yaitu:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

Dimana (t) adalah banyaknya perlakuan, dan (n) adalah banyaknya replikasi.

Maka, perhitungan jumlah replikasi adalah sebagai berikut:

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$4r \geq 19$$

$$r \geq 4,75 = 5$$

Dari hasil perhitungan diatas, maka dilakukan 5 kali replikasi atau 5 media uji antibakteri untuk setiap kelompok. Dimana banyak perlakuan yang dilakukan berdasarkan konsentrasi ekstrak, kontrol positif dan kontrol negatif adalah sebanyak 7. Maka, banyak sampel pada penelitian ini adalah sebanyak 35 sampel.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L.*).

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* strain ATCC 25922.

3.6 Definisi Operasional

Tabel 3. Definisi Operasional

No.	Variabel	Unit	Skala
1	Konsentrasi ekstrak biji pepaya (<i>Carica papaya L.</i>) Ekstrak biji pepaya yang diencerkan menggunakan akuades steril, dilarutkan dalam media Mueller Hinton agar dinyatakan dalam %.	berat/volume	Ordinal 1. 10% 2. 20% 3. 30% 4. 40% 5. 50%
2	Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> Pertumbuhan <i>Escherichia coli</i> yang diamati dengan mata telanjang dengan mengesampingkan jumlah koloni dan zona hambat.	Ada/tidak ada pertumbuhan	Nominal 0 = tidak tumbuh 1 = tumbuh

3.7 Cara Pengumpulan Data

3.7.1 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- Biji pepaya hitam
- Etanol 96%
- Aquades steril

- d. Suspensi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922
- e. Media Mueller Hinton agar
- f. Larutan NaCl 0,9%

3.7.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

- a. Labu *Erlenmeyer*
- b. Gelas ukur
- c. Sendok pengaduk
- d. Lampu bunsen dan korek api
- e. Alkohol
- f. Timbangan
- g. Tabung ulir
- h. Cawan petri
- i. Pipet ukur
- j. Mikro pipet
- k. Osse
- l. *Autoclave*
- m. *Laminar air flow*
- n. Vortex
- o. Inkubator dengan suhu 37°C

3.7.3 Jenis Data

Jenis data yang dikumpulkan pada penelitian ini seluruhnya merupakan data primer yaitu data yang diambil langsung oleh peneliti berupa hasil ekstraksi,

hasil pertumbuhan koloni *Escherichia coli* pada media dan kelompok kontrol dengan masing-masing konsentrasi ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L.*).

3.7.4 Cara Kerja

3.7.4.1 Sterilisasi Bahan, Alat, dan Media

Semua bahan, alat, 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.

3.7.4.2 Pembuatan Ekstrak Biji Pepaya

- a. Memasukkan biji pepaya kering ke dalam etanol 96%
- b. Kemudian didiamkan selama 24 jam
- c. Menyaring hasil rendaman tersebut, lalu diambil filtratnya
- d. Residu diuji coba lagi dengan etanol 96%, jika residu masih kental, maka dilakukan perendaman lagi
- e. Filtrat diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental
- f. Lalu diuapkan lagi sampai terbentuk serbuk

3.7.4.3 Pembuatan Media Uji Antibakteri

- a. Membuat pengenceran ekstrak serbuk dalam 10 ml dengan aquades steril kedalam 5 tabung ulir, dimana pada:
 - Konsentrasi 10% diisi 1 gram ekstrak serbuk dalam 10 ml campuran
 - Konsentrasi 20% diisi 2 gram ekstrak serbuk dalam 10 ml campuran

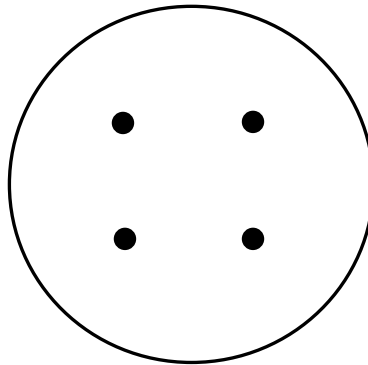
- Konsentrasi 30% diisi 3 gram ekstrak serbuk dalam 10 ml campuran
 - Konsentrasi 40% diisi 4 gram ekstrak serbuk dalam 10 ml campuran
 - Konsentrasi 50% diisi 5 gram ekstrak serbuk dalam 10 ml campuran
- b. Melakukan penyaringan dengan membran terhadap setiap konsentrasi ekstrak yang telah dimasukkan dalam tabung untuk mengurangi kontaminasi sebelum di aplikasikan ke media.
- c. Memasukkan setiap konsentrasi ekstrak yang telah disaring kedalam tabung ulir lalu masukkan MHA yang telah di buat kedalam masing-masing tabung ulir tersebut. Dimana setiap tabung ulir berisi kurang lebih 190 ml media MHA jika dalam 10 ml campuran ekstrak.
- d. Mengaduk kedua campuran tersebut sampai homogen.
- e. Menuangkan kedua campuran tersebut kedalam cawan petri kurang lebih sampai terisi setengah cawan petri. Dilakukan sebanyak 5x penuangan pada 5 cawan petri sesuai dengan besar sampel.
- f. Membuat kontrol positif yang berisi MHA ditambah suspensi bakteri *Escherichia coli* dan kontrol negatif yang berisi MHA ditambah ekstrak biji pepaya konsentrasi 50%. Kontrol positif dan negatif dibuat sebanyak 5x dalam 5 cawan petri.
- g. Membiarkan perlakuan dan kontrol membeku pada suhu ruangan.

3.7.4.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

- a. Menyiapkan tabung berisi 1 ml NaCl lalu dimasukkan kultur *Escherichia coli* dibandingkan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 yaitu 1×10^8 CFU
- b. Tabung yang telah berisi 1 ml NaCl dan koloni bakteri kemudian ditambah dengan 9 ml NaCl 0,9% sehingga didapatkan koloni 1×10^7 CFU
- c. Kemudian mengambil 1 ml dengan mikropipet pada tabung yang telah berisi koloni 1×10^7 CFU dimasukkan ketabung lain yang telah berisi 9 ml NaCl 0,9% sehingga didapatkan koloni 1×10^6 CFU
- d. Tabung yang telah berisi suspensi *Escherichia coli* 1×10^6 CFU diambil dengan mikropipet ukuran 10 mikron kemudian di inokulasikan pada media MHA sehingga pada media didapatkan inokulasi bakteri 1×10^4 CFU

3.7.4.5 Uji Efektivitas Ekstrak terhadap *E. coli*

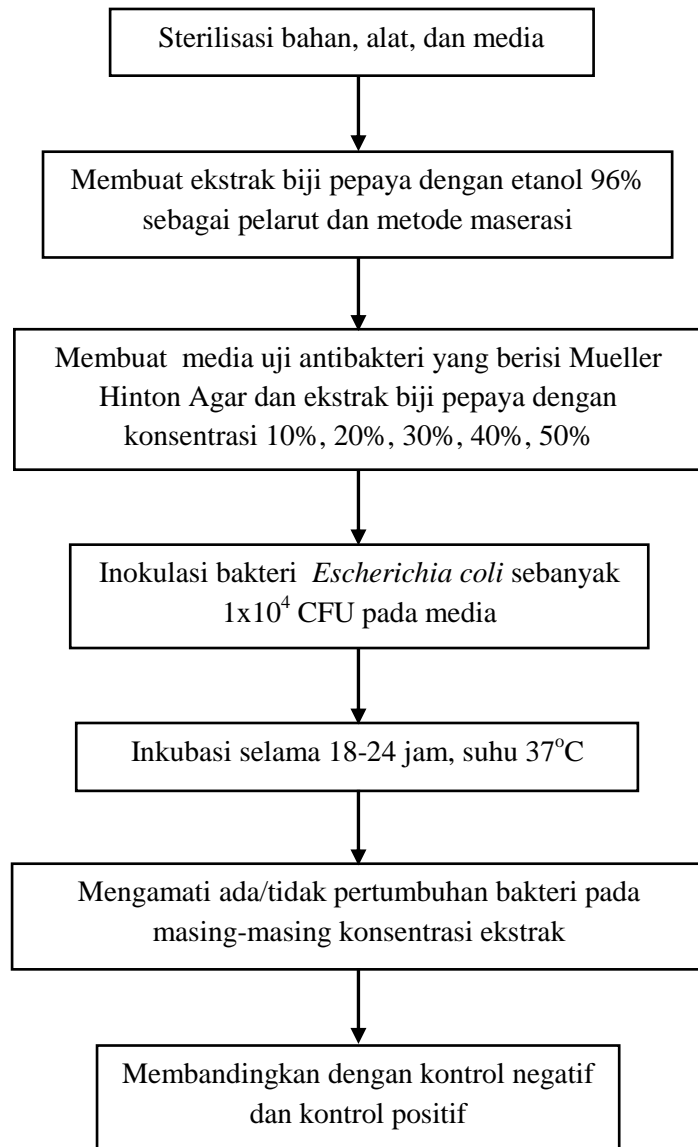
- a. Melakukan inokulasi suspensi bakteri *Escherichia coli* sebesar 1×10^6 CFU dengan mikropipet ukuran 10 mikron (setara dengan 1×10^4 CFU di media MHA) pada kelompok perlakuan dan kontrol positif, dimana 1 media berisi 4 titik inokulasi.



Gambar 10. Titik Inokulasi Koloni *Escherichia coli*

- b. Lalu inkubasi kelompok perlakuan, kontrol positif dan kontrol negatif tersebut selama 18-24 jam dalam suhu 37°C.
- c. Kemudian lakukan pembacaan pada daerah yang telah di inokulasi bakteri. Mengamati terdapat pertumbuhan bakteri atau tidak.

3.8 Alur Penelitian



Gambar 11. Alur Penelitian

