

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*in vitro*).

B. Populasi dan Sampel Penelitian

Koloni *Actinobacillus actinomycetemcomitans* diperoleh dari biakan murni yang telah tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian adalah 25 sampel yang dibagi ke dalam 5 piring petri. Setiap piring petri diberi 5 lubang sumuran yang terdiri dari 3 kelompok perlakuan dengan berbagai konsentrasi (100%, 50%, 25%) kontrol positif berupa antibiotik Tetrasiklin dan kontrol negatif berupa aquades steril.

Jumlah sampel ditentukan dengan rumus, menurut Daniel (1999) yaitu:

$$N = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

N = jumlah sampel

Z = nilai Z pada tingkat kesalahan tertentu

$\alpha = 0,05$ (maka $Z = 1,96$)

σ = standar deviasi sampel

d = kesalahan yang dapat ditoleransi

Kesalahan standar deviasi (σ) dan nilai d dapat diasumsikan sama, maka $\sigma^2 = d^2$ sehingga:

$$N = \frac{Z^2 \sigma^2}{d^2}$$

$$\begin{aligned} N &= Z^2 \\ &= (1,96)^2 \\ &= 3,8416 \\ &= 4 \end{aligned}$$

Jumlah sampel yang dibutuhkan pada setiap kelompok perlakuan adalah 4, dengan drop out 10% sehingga menjadi 5.

C. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan penelitian berupa proses ekstraksi biji pepaya dilakukan di LPPT Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, serta pengujian ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L.*) dengan bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dilakukan di Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian ini adalah pada bulan Agustus 2014.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel pengaruh

Ekstrak etanol biji pepaya (*Carica papaya L.*) pada konsentrasi 100%, 50%, 25%

2. Variabel terpengaruh

Zona hambat bakteri *Actinonobacillus actinomycetecomitans*

3. Variabel terkontrol

a. Jenis media pertumbuhan yaitu media agar TSA

b. Suhu inkubasi 37° C

c. Waktu inkubasi 24 jam

d. Diameter sumuran 5 mm

e. Volume larutan tiap sumuran 50 µl

f. Sterilisasi alat dan bahan sebelum pembiakan.

4. Variabel tak terkontrol

Zat aktif yang terkandung dalam ekstrak biji pepaya.

E. Definisi Operasional

1. Ekstrak biji pepaya

Ekstrak biji pepaya (*Carica papaya L.*) diperoleh dengan mengekstrak biji pepaya muda dengan metode maserasi yang menghasilkan ekstrak kering. Aquades steril ditambahkan kepada ekstrak kering dengan perbandingan 1:1 untuk memperoleh ekstrak 100%, 1:2 untuk memperoleh ekstrak 50%, dan 1:4 untuk memperoleh ekstrak 25%.

2. *Actinobacillus actinomycesmcomitans*

Suspensi bakteri *Actinobacillus actinomycesmcomitans* diperoleh dengan menginokulasikan 1-2 ose koloni bakteri kedalam larutan BHI yang kemudian diencerkan hingga kekeruhan mencapai standar Brown III 10^6 CFU/ml.

3. Daya antibakteri

Daya antibakteri diukur dengan metode difusi. Sumur dibuat pada media TSA yang telah ditanami bakteri dengan menggunakan pipet pelubang. Agen antibakteri yang akan diuji diteteskan pada sumur tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri oleh agen antibakteri pada permukaan media TSA.

F. Instrument Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: blender atau cawan dan mortar untuk menghaluskan biji pepaya, lemari inkubasi sebagai media inkubasi ekstrak, *vacuum rotary evaporator* untuk penguapan ekstrak, corong untuk menyaring ekstrak, pengaduk ekstrak, *waterbath*, lampu spirtus untuk mensterilkan ose, inkubator sebagai media inkubasi bakteri, ose steril untuk mengambil koloni bakteri, cakram untuk menanam mikroorganismenya, *sliding caliper* untuk mengukur diameter zona hambat, mikropipet untuk meneteskan larutan ekstrak berbagai konsentrasi, gelas ukur dan tabung Erlenmeyer untuk tempat ekstrak dan Tetrasiklin serta aquades sebelum ditetaskan ke cakram, alat pelubang berupa pipet untuk membuat sumuran.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol biji pepaya 100% 50% 25%, sediaan bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 10^6 CFU/ml, antibiotik Tetrasiklin sebagai kontrol positif, aquades sebagai kontrol negatif, media TSA (*Tryptic Soy Agar*) sebagai media pertumbuhan, dan media BHI (*Brain Heart Infusion*) sebagai media pengenceran bakteri.

G. Cara Penelitian

1. Persiapan Penelitian

Membuat surat perijinan penggunaan Laboratorium Mikrobiologi FKIK UMY untuk digunakan selama penelitian berlangsung. Setelah itu menguji validitas dan reliabilitas instrument penelitian dengan memastikan semua alat sudah dikalibrasi sesuai besaran standar.

2. Pelaksanaan Penelitian

a. Pembuatan ekstrak biji pepaya dengan cara maserasi

Biji pepaya dicuci sampai bersih kemudian dikeringkan dengan cara dijemur lalu ditumbuk sampai menjadi serbuk. Kemudian diekstraksi dengan etanol 70% secara maserasi kemudian direndam selama 24 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan, sehingga residu tertinggal dan mendapatkan filtrat. Filtrat yang didapat lalu dievaporasi, hasilnya didapat ekstrak kental. Untuk mendapat konsentrasi ekstrak biji pepaya 100%, 50%, 25% adalah sebagai berikut:

100 gram ditambah aquades 100 ml : 100%

50 gram ditambah aquades 100 ml : 50%

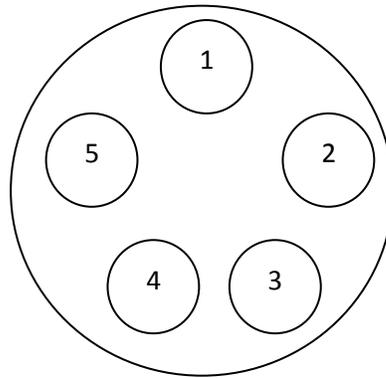
25 gram ditambah aquades 100 ml : 25%

b. Pembiakan bakteri *Actinobacillus actinomcetemcomitans*

Bakteri *Actinonobacillus actinomycetemcomitans* hasil biakan diambil dengan ose steril, kemudian dimasukkan ke media BHI (*Brain Heart Infusion*) dan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C sehingga diperoleh suspensi *Actinonobacillus actinomycetemcomitans*. Aquades ditambahkan pada suspensi *Actinonobacillus actinomycetemcomitans* sehingga mencapai kekeruhan sesuai standar *Brown III* yaitu 10^6 CFU/ml. Akan terbentuk koloni dan ditempatkan pada suhu 37°C.

c. Uji Daya Antibakteri

Biakan dibagi menjadi 5 sektor dan masing-masing dibuat sumuran menggunakan pipet dengan diameter 5 mm dan kedalaman 3 mm. Kemudian 1 mm suspensi kuman diinokulasi pada permukaan media agar TSA (*Tryptic Soy Agar*) hingga rata. Tiap-tiap sumuran diisi ekstrak biji pepaya dengan konsentrasi yang berbeda (100%, 50%, 25%) sebanyak 50 µl. Kontrol yang digunakan adalah Tetrasiklin dan aquades. Kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Potensi kuman diukur dengan melihat zona radikal menggunakan *sliding caliper* dengan ketelitian 0,05 mm, diulang sebanyak 3 kali.



Keterangan:

1. Ekstrak biji pepaya 100%
2. Ekstrak biji pepaya 50%
3. Ekstrak biji pepaya 25%
4. Antibiotik Tetraksiklin
5. Aquades

Gambar 4. Skema Sumuran Ekstrak Biji Pepaya pada Cawan Petri

d. Pengukuran zona radikal

Pengukuran zona radikal yaitu dengan mengambil tiga garis yang melalui titik pusat lubang sumuran. Pada pengukuran pertama menggunakan diameter daerah bening (A-B) dikurangi diameter sumuran (a-b) dibagi dua. Pengukuran kedua menggunakan diameter daerah bening (C-D) dikurangi diameter sumuran (c-d) dibagi dua. Pengukuran ketiga menggunakan diameter daerah bening (E-F) dikurangi diameter sumuran (e-f) dibagi dua. Hasil akhir dari pengukuran zona radikal adalah pengukuran pertama ditambah dengan pengukuran kedua ditambah pengukuran ketiga kemudian hasilnya dibagi tiga (Kartikasari et al, 2008).

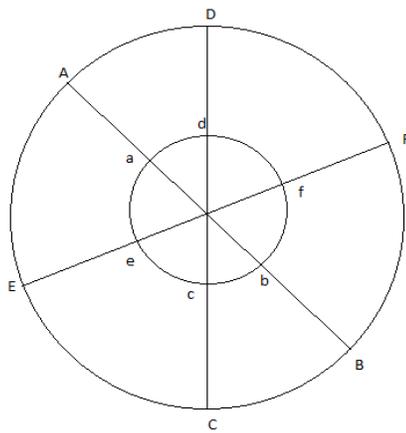
$$\text{Pengukuran zona radikal (1)} = (AB-ab) : 2$$

$$\text{Pengukuran zona radikal (2)} = (CD-cd) : 2$$

Pengukuran zona radikal (3) = $(EF-ef) : 2$

Pengukuran zona radikal satu lubang sumuran :

Pengukuran $\frac{1 + 2 + 3}{3}$



Keterangan :

Aa, Bb, Cc, Dd, Ee, Ff: Zona radikal

AB, CD, EF: Diameter lubang sumuran

Gambar 5. Cara Pengukuran Zona Hambat

H. Analisis Data

Analisis data menggunakan analisis deskriptif dan analitik sebagai berikut:

1. Analisis Deskriptif

Data penelitian yang diperoleh dianalisis secara deskriptif untuk mengetahui rata-ratanya. Analisis statistika deskriptif ini

memiliki tujuan untuk memberikan gambaran mengenai suatu data agar data yang tersaji menjadi mudah dipahami dan informatif bagi orang yang membacanya. Statistika deskriptif menjelaskan berbagai karakteristik data seperti rata-rata (*mean*), jumlah (*sum*) simpangan baku (*standard deviation*), varians (*variance*), rentang (*range*), nilai minimum dan maximum dan sebagainya

2. Analisa Analitik

Langkah selanjutnya yaitu melakukan analisis secara analitik. Analisis statistika analitik memerlukan uji hipotesis. Uji *One Way ANOVA* merupakan uji hipotesis yang digunakan pada penelitian ini. Syarat yang harus dipenuhi sebelum melakukan uji *One Way ANOVA* yaitu: data bersifat independen, distribusi data normal, serta data memiliki varians yang sama.

Hasil pengukuran diameter zona hambat pada penelitian ini dimasukkan ke dalam tabel dengan bentuk data kuantitatif berskala rasio. Data tersebut diuji normalitas menggunakan uji *Saphiro-Wilk* untuk mengetahui distribusi data tersebut normal atau tidak. Selanjutnya, dilanjutkan dengan uji statistik parametrik yaitu uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui apakah ada perbedaan rata-rata dari masing-masing konsentrasi ekstrak biji pepaya terhadap zona hambat *Actinonobacillus actinomycetecomitans*. Berikut penjabaran dari hasil uji *One Way ANOVA* pada penelitian ini:

H_0 = Rata-rata daya antibakteri setiap kelompok adalah sama.

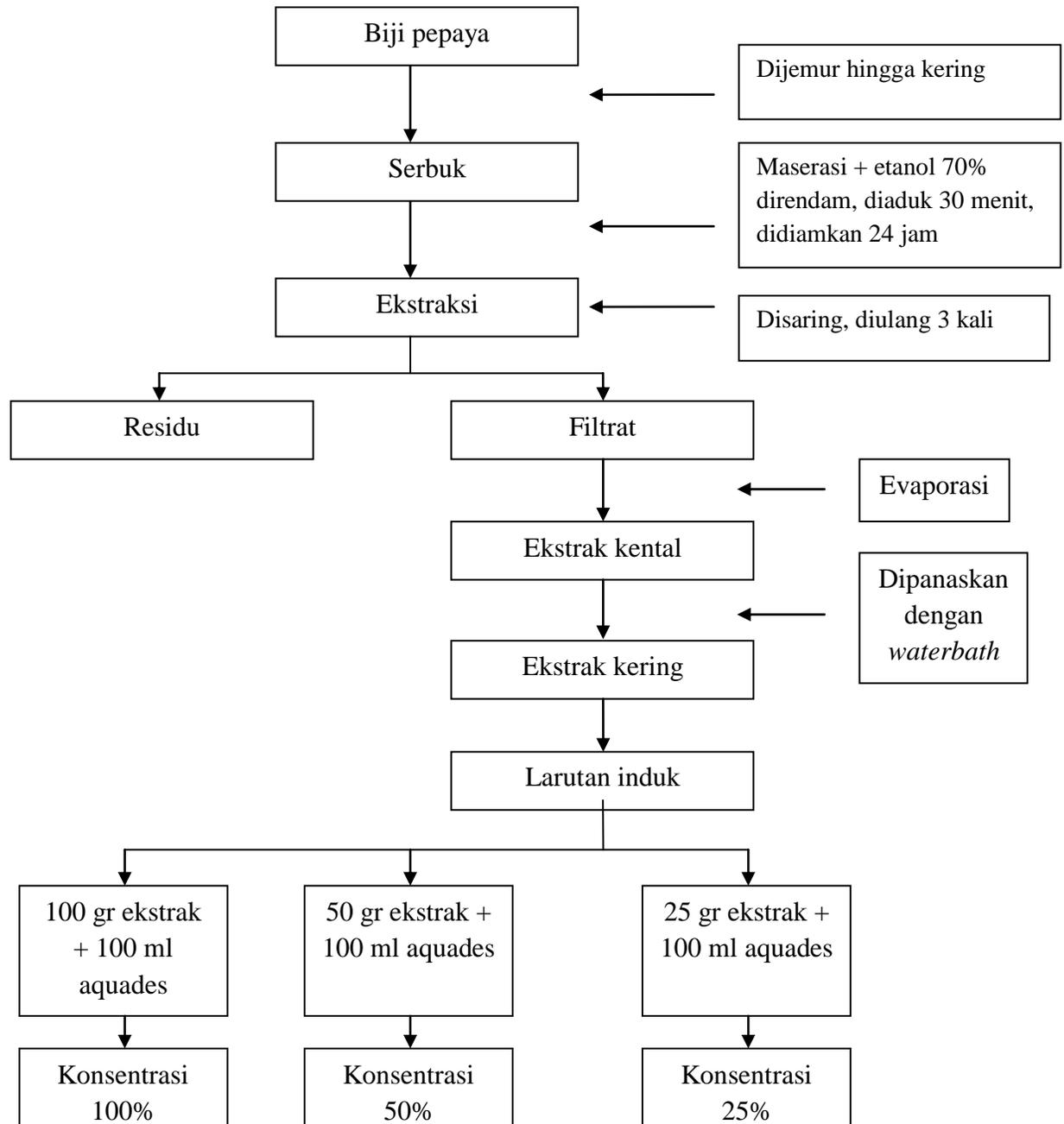
H_1 = Rata-rata daya antibakteri setiap kelompok adalah tidak sama.

Hipotesis ditolak apabila nilai signifikansi menunjukkan nilai $p < 0.05$, sedangkan apabila $p > 0.05$ maka hipotesis diterima.

Uji lanjutan yang dilakukan setelah langkah tersebut yaitu uji *Post Hoc* LSD, tujuannya untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap kelompok perlakuan.

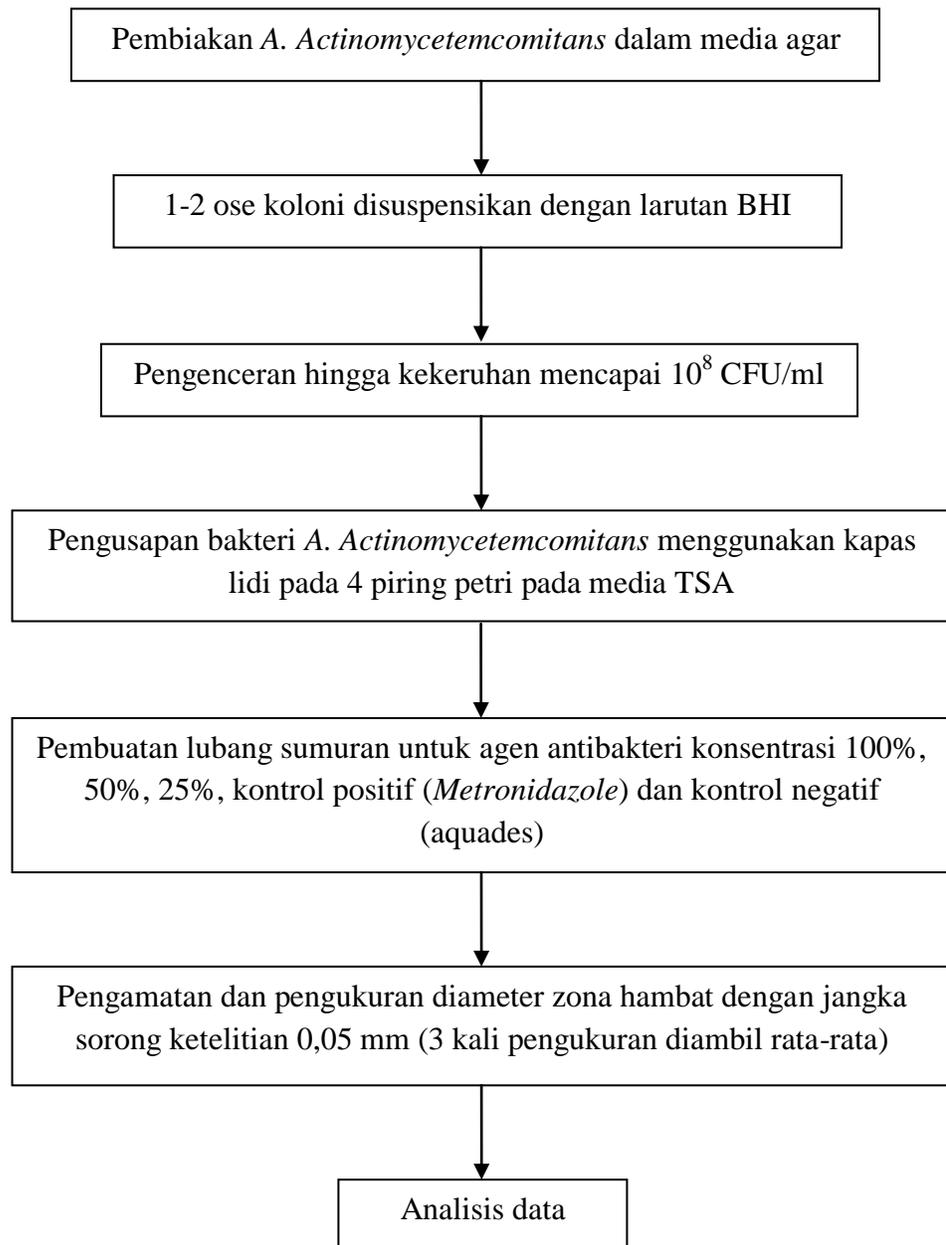
I. Alur Penelitian

1. Alur pembuatan ekstrak biji pepaya



Gambar 6. Alur Penelitian

2. Skema alur penelitian efek antibakteri ekstrak biji pepaya terhadap bakteri *Actinobacillus actinomycetemcomitans*



Gambar 7. Skema Alur Penelitian