

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Jenis Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian eksperimen.

#### **B. Tempat dan waktu penelitian**

##### **1. Tempat Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Farmasi Bahan Alam, Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Kimia, Prodi D-III Farmasi Kemenkes Poltekkes Kupang dan Laboratorium Mikrobiologi, Prodi D-III Teknologi Laboratorium Medis Kemenkes Poltekkes Kupang.

##### **2. Waktu Penelitian**

Penelitian ini dimulai bulan Februari hingga Mei 2026.

#### **C. Populasi dan Sampel**

##### **1. Populasi**

Sediaan *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*)

##### **2. Sampel**

Sediaan *clay mask* ekstrak etanol daun pepaya (*Carica papaya L.*) dengan konsentrasi ekstrak 5% dan 10%.

#### **D. Variabel Penelitian**

##### **1. Variabel Bebas**

Konsentrasi *clay mask* ekstrak daun pepaya (*Carica papaya L.*) 5% dan 10%.

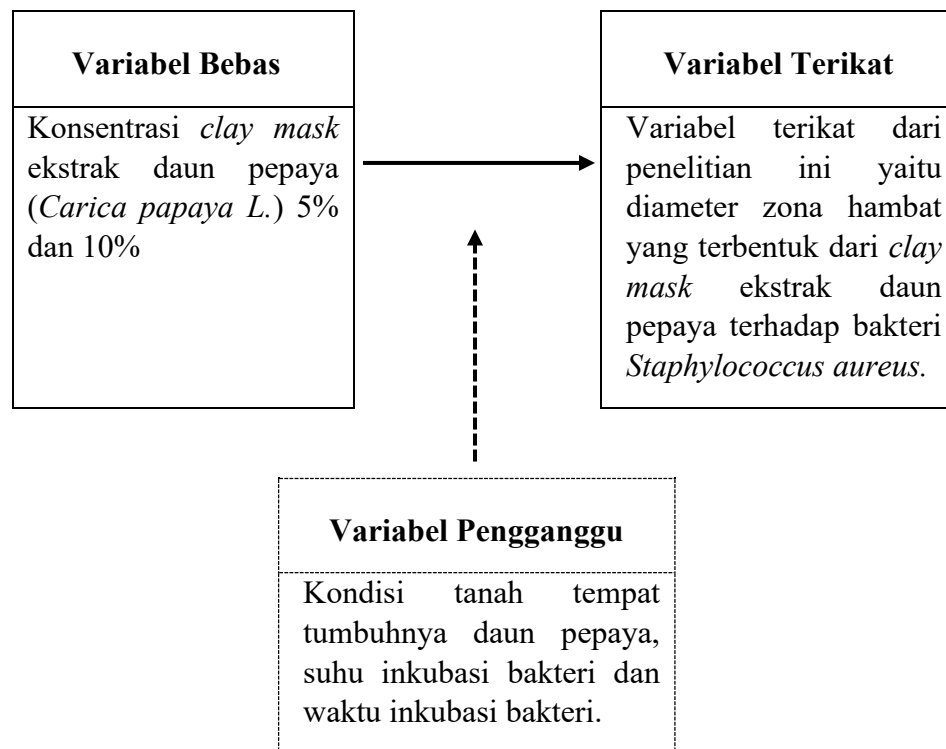
## 2. Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini yaitu diameter zona hambat yang terbentuk dari *clay mask* ekstrak daun pepaya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

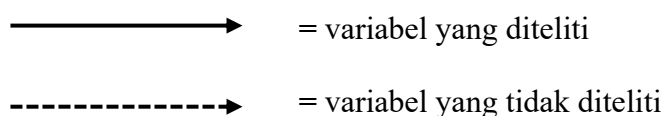
## 3. Variabel Pengganggu

Variabel pengganggu merupakan variabel yang mengganggu pengaruh atau hubungan variabel bebas dengan variabel terikat. Kondisi tanah tempat tumbuhnya daun pepaya, suhu inkubasi bakteri dan waktu inkubasi bakteri.

### E. Kerangka konsep



Gambar 3 Kerangka Konsep



## F. Definisi Operasional

Tabel 1. Definisi Operasional

| No | Variabel                                       | Definisi Operasional                                                                                                                                                                                    | Skala   |
|----|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1  | Bakteri<br><i>Staphylococcus aureus</i>        | Bakteri yang sudah diinkubasi untuk menguji daya hambatnya menggunakan ekstrak etanol daun pepaya ( <i>Carica papaya L.</i> ) yang telah diformulasikan menjadi <i>clay mask</i> .                      | ordinal |
| 2  | Daun pepaya                                    | Daun pepaya diambil dari daerah Labat kelurahan Bakunase II, Kecamatan Kota Raja, Kota Kupang, Nusa Tenggara Timur.                                                                                     | ordinal |
| 3  | Ekstrak Etanol Daun pepaya                     | Daun pepaya yang dimaserasi menggunakan etanol 70% lalu dipekatkan di evaporator untuk memperoleh ekstrak kental.                                                                                       | Rasio   |
| 4  | <i>Clay mask</i><br>Ekstrak Etanol Daun pepaya | Sediaan masker yang dihasilkan dari formulasi ekstrak daun pepaya ditambah zat tambahan lain dengan konsentrasi 5% dan 10%.                                                                             | Ordinal |
| 5  | Aktivitas antibakteri                          | Kemampuan sediaan <i>clay mask</i> ekstrak etanol daun pepaya ( <i>Carica papaya L.</i> ) dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang ditunjukkan dengan adanya zona bening. | Ordinal |
| 6  | Metode difusi sumuran                          | Metode yang digunakan untuk penanaman bakteri sehingga peneliti dapat melihat diameter zona hambat yang ditandai dengan adanya zona bening yang terbentuk di sekitar lubang.                            | Rasio   |
| 7  | Zona inhibisi perlakuan                        | Zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran, jika zat antimikroba tersebut efektif menghambat pertumbuhan mikroorganisme.                                                                             | Rasio   |
| 8  | Kontrol Negatif                                | Basis masker tanpa zat aktif yang digunakan dalam pengujian dan tidak memiliki efek menghambat pertumbuhan bakteri                                                                                      | Ordinal |
| 9  | Kontrol Positif                                | Sediaan masker <i>clay</i> ekstrak etanol daun pepaya dengan konsentrasi 5% dan 10% yang digunakan untuk melihat aktivitas antibakteri                                                                  | Ordinal |

## G. Alat dan bahan

### 1. Alat

Tabel 2 Daftar Alat

| No | Nama Alat              | No | Nama Alat       | No | Nama Alat                |
|----|------------------------|----|-----------------|----|--------------------------|
| 1  | blender                | 11 | mortar          | 21 | rak tabung               |
| 2  | kain hitam             | 12 | stamper         | 22 | tabung reaksi            |
| 3  | neraca                 | 13 | mikropipet      | 23 | ayakan no 45 mesh        |
| 4  | <i>hot plate</i>       | 14 | gelas ukur      | 24 | autoklaf                 |
| 5  | cawan petri            | 15 | gelas kimia     | 25 | erlenmeyer               |
| 6  | bejana maserasi        | 16 | batang pengaduk | 26 | inkubator                |
| 7  | <i>waterbath</i>       | 17 | cawan porselin  | 27 | <i>Laminar Air Flow</i>  |
| 8  | pipet tetes            | 18 | kertas perkamen | 28 | kawat ose                |
| 9  | tissue                 | 19 | aluminium foil  | 29 | bunsen                   |
| 10 | <i>cork borer 5 mm</i> | 20 | jangka sorong   | 30 | <i>rotary evaporator</i> |

### 2. Bahan

Tabel 3 Daftar Bahan

| No | Nama Bahan                           | No | Nama Bahan           | No | Nama Bahan                                    |
|----|--------------------------------------|----|----------------------|----|-----------------------------------------------|
| 1  | FeCl <sub>3</sub>                    | 5  | etanol 70%           | 9  | ekstrak daun pepaya                           |
| 2  | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat | 6  | CH <sub>3</sub> COOH | 10 | pereaksi wagner                               |
| 3  | HCL 2N                               | 7  | Kertas label         | 11 | isolat bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> . |
| 4  | pereaksi mayer                       | 8  | <i>nutrient agar</i> | 12 | kertas coklat pembungkus                      |

## H. Prosedur pembuatan

### 1. Pengambilan bahan

Daun pepaya diambil dari daerah Labat, Kelurahan Bakunase II, Kecamatan Kota Raja, Kota kupang, Nusa Tenggara Timur.

### 2. Pembuatan Simplisia Daun Pepaya

- Diambil simplisia daun pepaya (*Carica papaya* L.) dari daerah Labat, Kelurahan Bakunase II, Kecamatan Kota Raja, Kota kupang, Nusa Tenggara Timur. Daun diambil pada pagi hari untuk mencegah adanya penguapan zat

aktif oleh karena sinar matahari. Daun yang digunakan merupakan daun yang tidak terlalu muda dan agak sudah tua tetapi berwarna hijau segar.

- b. Dilakukan sortasi basah di bawah air mengalir untuk membersihkan bagian yang digunakan dengan bagian lainnya yang tidak digunakan.
- c. Dilakukan perajangan agar ukuran daun menjadi kecil sehingga luas permukaan menjadi lebih luas.
- d. Hasil rajangan kemudian dijemur di bawah sinar matahari agar kandungan air berkurang sehingga mencegah adanya pertumbuhan mikroba pada bahan tanaman
- e. Dilakukan sortasi kering dengan cara memisahkan partikel asing, Daun yang tidak layak pakai dan berbagai macam kerusakan yang lainnya. Kemudian dilakukan penghalusan menggunakan blender menjadi serbuk.

### **3. Maserasi dan pembuatan ekstrak**

- a. Ekstraksi simplisia dari daun pepaya dilakukan dengan metode yang dikenal sebagai metode maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan cara perendaman dengan rasio 1:10 (b/v) yaitu 1 bagian sampel dicampurkan ke dalam 10 bagian pelarut (Fauziah *et al.*, 2022).
- b. Ditimbang 1000 gram serbuk simplisia kemudian dimaserasi menggunakan etanol 70% sebanyak 7.5 liter di dalam wadah yang tertutup rapat. Perendaman simplisia dilakukan di suhu kamar dengan sesekali diaduk selama 5 hari untuk mematikan senyawa telah ditarik secara sempurna.
- c. Dilakukan penyaringan untuk memperoleh filtrat, kemudian dilakukan remaserasi menggunakan 2.5 liter etanol 70% selama 2 hari.

d. Pemekatan dilaksanakan dengan memanfaatkan *rotary evaporator* pada suhu 40<sup>0</sup>C untuk menghilangkan residu pelarut yang tersisa dalam filtrat. Sampel yang telah mengalami proses evaporasi selanjutnya dipindahkan ke dalam cawan porselen untuk dilakukan penguapan, dengan menempatkan sampel di atas *waterbath* pada suhu 60<sup>0</sup>C hingga diperoleh ekstrak yang kental. Setelah itu, ekstrak kental dikeluarkan dari cawan porselin dan dipindahkan pada wadah yang disiapkan khusus untuk ekstrak (Endah, 2017).

#### 4. Perhitungan Rendemen

Rendemen adalah nilai yang dinyatakan dalam presentase dimana menggambarkan perbandingan antara jumlah ekstrak yang diperoleh dengan jumlah bahan awal yang digunakan. Semakin tinggi nilai rendemen, semakin banyak ekstrak yang dihasilkan. Besarnya rendemen ekstrak dipengaruhi oleh berbagai faktor, salah satunya adalah metode ekstraksi yang digunakan (Hujjatusnaini *et al.*, 2021).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak yang di dapat}}{\text{Berat simplisia yang di ekstrak}} \times 100\%$$

#### 5. Uji bebas etanol

Sebanyak 1 ml dari ekstrak pekat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan masing-masing 2 tetes asam sulfat dan asam asetat, kemudian

dipanaskan di atas penangas air. Ekstrak dianggap mengandung etanol jika tercium bau khas eter dari etanol (Priamsari and Rokhana, 2020).

## **6. Skrining fitokimia**

### **1) Alkaloid**

Dari hasil maserasi daun pepaya diambil sebanyak 2ml ekstrak yang kemudian diuapkan menggunakan cawan porselin. Setelah proses penguapan, ekstrak tersebut dilarutkan dengan 5ml HCL 2N dan dibagi ke dalam 3 tabung reaksi yang berbeda. Pada tabung yang pertama ditetesi 2-3 tetes reagen Wagner, pada tabung kedua ditambahkan 3 tetes HCl pekat dan 5 tetes reagen Mayer, dan pada tabung ketiga ditambahkan 5 tetes reagen Dragendorff. Hasil positif kandungan alkaloid ditunjukkan dengan munculnya warna endapan berwarna coklat kemerahan pada uji Wagner, terbentuk endapan putih pada uji Mayer, terbentuk endapan merah atau jingga pada uji Dragendorff (Khafid *et al.*, 2023). Larutan dinyatakan positif mengandung alkaloid ketika terbentuk endapan pada dengan menggunakan dua jenis larutan percobaan (Depkes, 1995).

### **2) Flavonoid**

Sebanyak 0.5g dari ekstrak daun pepaya dimasukkan ke tabung reaksi. Selanjutnya pada sampel ditambahkan HCL 2N sebanyak 2 tetes dan 0,2g bubuk Mg, kemudian tabung tersebut dipanaskan selama 3 menit dan disaring untuk melihat warna dari hasil uji. Kandungan flavonoid positif ditandai dengan munculnya warna kuning jingga hingga warna merah tua (Khafid *et al.*, 2023).

### 3) Saponin

Sebanyak 0.5g dari ekstrak daun pepaya diletakkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan dengan 10 ml akuades dan dipanaskan di atas *hotplate* selama setengah jam. Setelah itu, campuran didinginkan dan dikocok kuat hingga terbentuk busa stabil. Selanjutnya, satu tetes HCl dimasukkan melalui sisi tabung reaksi. Apabila busa tetap bertahan setelah penambahan HCl, maka hal tersebut menunjukkan bahwa sampel tersebut positif mengandung saponin (Khafid *et al.*, 2023).

### 4) Tanin

Ekstrak etanol daun pepaya ditimbang sebanyak 0.5 gram dan dilarutkan dalam 5 mL akuades, kemudian ditambahkan dengan 10 tetes larutan  $\text{FeCl}_3$  10%. Ekstrak dianggap positif mengandung tanin jika menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru kehitaman (Khafid *et al.*, 2023).

## 7. Formulasi sediaan

*Tabel 4 Formula Sediaan*

| Bahan          | Formula  |          | Fungsi    |
|----------------|----------|----------|-----------|
|                | F1       | F2       |           |
| Ekstrak pepaya | 5        | 10       | Zat Aktif |
| Bentonite      | 4        | 4        | Adsorben  |
| Kaolin         | 35       | 35       | Adsorben  |
| Xanthan Gum    | 1        | 1        | Pengental |
| Gliserin       | 15       | 15       | Humektan  |
| Nipagin        | 0.2      | 0.2      | Pengawet  |
| Akuades        | Ad 100ml | Ad 100ml | Pelarut   |

Sumber: (Hafid, Buang and Astuti, 2023)

## 8. Pembuatan sediaan

- Disiapkan alat dan bahan
- Ditimbang seluruh bahan berdasarkan formula yang telah dibuat.

- c. Diambil nipagin yang sudah ditimbang dan dilarutkan ke dalam 48 ml akuades yang telah dipanaskan terlebih dahulu
- d. Ditambahkan bentonit secara sedikit demi sedikit ke dalam akuades dan dibiarkan hingga basah secara perlahan
- e. Ditambahkan xanthan gum sedikit demi sedikit ke dalam campuran dan digerus dengan cepat hingga terbentuk massa yang homogen.
- f. Kaolin dan gliserin ditambahkan secara bertahap dan seluruh campuran digerus kembali hingga homogen.
- g. Ditambahkan ekstrak sedikit demi sedikit sambil digerus *ad* homogen.

#### **I. Prosedur pengujian aktivitas antibakteri**

##### **1. Sterilisasi Alat, Bahan dan Media**

- a. Disiapkan alat dan bahan
- b. Dilakukan pencucian semua alat-alat yang akan digunakan dalam pengujian hingga bersih
- c. Dibungkus setiap alat dengan kertas sampul coklat.
- d. Dilakukan sterilisasi menggunakan *autoklaf* pada suhu 121°C dalam waktu 60 menit. Untuk bahan yang terbuat dari karet dan plastik disterilisasi menggunakan alkohol 70% dengan cara direndam, sedangkan kawat ose dipijarkan di atas api *Bunsen* (Andriani, 2016).

##### **2. Peremajaan Bakteri**

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang berasal dari biakan murninya diambil sebanyak 1 ose kemudian diinokulasi, dengan cara dimasukkan dalam media

NB. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Kosasi, Lolo and Sedewi, 2019).

### **3. Uji Mikroskopik dan Maksroskopik Bakteri *Staphylococcus aureus***

#### **a. Uji Makroskopik**

- 1) Koloni yang mengalami hemolisis diambil dari media *blood* agar menggunakan jarum ose yang sudah steril, kemudian ditanam pada media MSA
- 2) Dilakukan penipisan hingga 4 kwadran
- 3) Disimpan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam
- 4) Pertumbuhan koloni diamati setelah masa inkubasi
- 5) Koloni spesifik yang berwarna kuning keemasan dipilih, yang mana terjadi perubahan warna dari media merah muda menjadi kuning

#### **b. Uji Mikroskopik**

- 1) Kaca objek dibersihkan agar terbebas dari lemak dan kotoran
- 2) Beberapa tetes alkohol 96 % diteteskan pada kedua sisi permukaan objek glass dan dikeringkan menggunakan kertas saring
- 3) Lingkaran dibuat di tengah permukaan bawah kaca objek untuk memudahkan penempatan olesan bakteri
- 4) Inokulum bakteri diletakkan di atas kaca objek pada titik yang telah ditandai, lalu olesan disebar merata.
- 5) Dibiarkan mengering
- 6) Fiksasi panas dilakukan dengan cara menggoreskan kaca objek di atas api

- 7) Kristal violet ditetesi ke atas kaca objek dan dibiarkan mengering selama 1-2 menit
- 8) Kelebihan Kristal Violet dibuang dengan memiringkan objek glass di atas bak pewarna
- 9) Dibilas dengan akuades
- 10) Larutan lugol ditambahkan dan dibiarkan selama 1-2 menit
- 11) Dibilas lagi dengan akuades, lalu dibilas dengan alkohol 70%±30 detik hingga warna zat ungu kristal tidak tampak mengalir dari objek *glass*
- 12) Diberi safranin biarkan selama 30 detik
- 13) Kelebihan safranin dibuang dan dibilas dengan akuades semprot menggunakan botol
- 14) Dikeringkan dengan kertas saring secara hati-hati
- 15) Diamati di bawah mikroskop 10 x 100
- 16) Hasil pewarnaan yang menunjukkan warna ungu = Gram positif (*Staphylococcus aureus*) (Rachmad and Afiah, 2022).

#### **4. Pembuatan Suspensi Bakteri**

Larutan suspensi bakteri disiapkan dengan mengambil bakteri dari media MHA menggunakan pipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% yang telah disterilkan, diaduk hingga merata, lalu dibandingkan dengan standar *Mc Farland* 0,5 yang sebanding dengan  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL (Purnamaningsih and Supadmi, 2020).

## 5. Pembuatan kontrol positif

- a. Dibuat larutan kontrol positif dari sediaan obat tablet clindamicin 300 mg, dengan cara ditimbang tiap bobot isi kapsul clindamicin sebanyak 10 tablet.
- b. Setelah itu ditimbang setara 20 mg, dilarutkan dalam 10 ml akuades steril,
- c. Dilakukan pengenceran hingga memperoleh konsentrasi 2 $\mu$ g/ml.

## 6. Pembuatan Media Pengujian Dan Pengujian Antibakteri

- a. Disiapkan alat dan bahan yang sudah disterilkan
- b. Ditimbang media *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 4 g dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 200 ml dalam labu erlenmeyer
- c. Labu berisi media ditutup menggunakan gumpalan kapas dibalut kasa pada bagian mulut labu kemudian ditutup dengan kertas coklat
- d. Disterilkan media menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 1 jam
- e. Setelah steril media didinginkan hingga hangat, kemudian diambil 1ml suspensi bakteri dan dicampurkan ke dalam media
- f. Media yang sudah bercampur dengan bakteri kemudian dituang sebanyak 20 ml ke dalam tiap cawan petri dan didiamkan hingga membeku
- g. Setelah media membeku, dilakukan pelubangan menggunakan *cork borer* sebanyak 4 lubang pada tiap cawan petri
- h. Diambil Masker masing-masing sebanyak 0.05g kemudian ditetaskan kedalam lubang sumuran
- i. Dilakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C
- j. Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengamatan dengan melihat zona bening yang terbentuk pada lubang sumuran dan mengukur diameter

zona hambat di sekeliling sumuran menggunakan jangka sorong.  
(Purnamaningsih and Supadmi, 2020).

#### J. Perhitungan diameter zona hambat

$$\text{Rumus: } L = \frac{(D1-D3)+(D2-D3)}{2}$$

Keterangan:

- L : Lebar zona hambat
- D1 : Lebar zona hambat horizontal
- D2 : Lebar zona hambat vertikal
- D3 : Diameter sumuran

#### K. Analisis Data

Hasil dari pengujian terhadap aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara mengukur diameter total zona bening yang mengelilingi sumuran dengan menggunakan jangka sorong. Adanya aktivitas anti bakteri yang signifikan ditunjukkan dengan ukuran dari daerah zona hambat yang terbentuk.

1. Apabila nilai Sig. (P value) < (0,05) maka data tersebut dianggap tidak terdistribusi normal.
2. Apabila nilai Sig. (P value) > (0,05) maka data tersebut dianggap terdistribusi normal.

Pengujian homogenitas dilakukan untuk mengevaluasi apakah sampel-sampel data-data memiliki varian yang sama atau data homogen. Penafsiran uji homogenitas varian adalah:

1. Jika nilai Sig. Berdasarkan Based on Mean < (0,05) maka dinyatakan bahwa varians data tidak homogen (uji homogenitas tidak terpenuhi).

2. Jika nilai Sig. *Based on Mean* (0,05) maka dinyatakan bahwa varians data homogen (uji homogenitas terpenuhi).

Apabila data terdistribusi normal dan variannya homogen maka analisis dilanjutkan dengan analisis dengan uji *One Way Anova* (Anova satu arah) dengan interpretasi uji sebagai berikut:

1. Jika nilai Sig. (P value)  $< (0,05)$  maka berkesimpulan ada perbedaan signifikan.
2. Jika nilai Sig. (P value)  $> (0,05)$  maka berkesimpulan tidak ada perbedaan secara signifikan.

Apabila pada uji ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan maka akan dilanjutkan dengan *Post Hoc test* (*Bonferroni test*) dengan interpretasi uji:

1. Jika nilai Sig. (P value)  $< (0,05)$  maka disimpulkan ada perbedaan secara nyata.
2. Jika nilai Sig.  $> (0.05)$  maka disimpulkan tidak ada perbedaan secara nyata.