

BAB IV

PROSEDUR KERJA

4.1. Penyiapan dan Pengolahan Bahan

Penyiapan bahan meliputi pengambilan dan pengumpulan biji pepaya (*C. Papaya L.*) dari kebun buah pepaya di daerah Subang, Jawa Barat, biakan bakteri *E.coli* dan *Salmonella typhi* diperoleh dari Politeknik Kesehatan Bandung. Setelah pengumpulan dilakukan, kemudian biji pepaya (*C. papaya L.*) kemudian dihaluskan dengan blender. Determinasi tanaman dilakukan di Herbarium Bandungense Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati (SITH) Institut Teknologi Bandung (ITB).

4.2. Pembuatan Simplisia

Biji pepaya (*C. papaya L.*) setelah dicuci bersih dari debu dan kotoran yang melekat lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan di tempat yang tidak terkena matahari secara langsung. Hal ini dilakukan dengan tujuan menjaga kandungan bahan aktif agar tidak rusak karena penyinaran langsung. Setelah kering biji diblender sehingga diperoleh ukuran yang lebih kecil.

4.3. Penetapan Kadar Air Simplisia

Penetapan kadar air dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Simplisia sebanyak 1-2 gram dimasukkan kedalam cawan penguap dan ditimbang seksama dalam wadah yang telah ditara. Simplisia dikeringkan pada oven dengan suhu 105°C selama 3 jam, kemudian didinginkan di dalam deksikator dan

ditimbang. Pengeringan dilanjutkan dan pada jarak 1 jam sampai perbedaan antara penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% atau hingga bobot tetap (Depkes RI, 2000).

4.4. Pembuatan Ekstrak

Serbuk Simplisia biji pepaya (*C.papaya* L.) 650 gram ditambahkan 3300 ml pelarut etanol, kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi selama 5 kali 24 jam dan pengadukan selama 1 jam. Hasilnya kemudian disaring, dan filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *rotary vaccuum evaporator* pada suhu $\pm 70^{\circ}\text{C}$, hingga diperoleh ekstrak pekat. Penguapan kemudian dilanjutkan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak kental (Mulyono, 2013).

Persen rendemen ekstrak dihitung dengan rumus: (Muhyini, 2004:19, Harborne, 1987 : 6-7).

$$\text{Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak (gr)}}{\text{bobot simplisia (gr)}} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

4.5. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat pada simplisia dan ekstrak biji pepaya (*C.papaya* L.) hitam. Adapun senyawa yang diukur adalah alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, polifenolat, kuinon, triterpenoid, steroid, monoterpen dan sesquiterpen.

4.5.1. Alkaloid

Sebanyak 2 gram serbuk simplisia, dibasakan dengan 5 ml amonia 25%, kemudian digerus di dalam mortar. Selanjutnya ditambahkan 20 ml kloroform, lalu digerus kuat dan disaring. Cairan kloroform dipipet melalui kapas atau

disaring yang kemudian diberi tanda sebagai larutan A. Filtrat ditempatkan dalam tabung reaksi kemudian diekstraksi dengan larutan HCl 10% v/v sebanyak 2 kali yang kemudian diberi tanda sebagai larutan B.

Larutan A diteteskan pada kertas saring yang telah ditetesi pereaksi Dragendorff, apabila hasilnya positif ditandai dengan warna merah atau jingga pada kertas saringnya. Masing-masing 5ml larutan B dalam 2 tabung reaksi diuji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Pada pereaksi Dragendorff adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan atau kekeruhan berwarna jingga coklat. Pada pereaksi Mayer adanya endapan atau kekeruhan berwarna putih menunjukkan adanya senyawa kimia golongan alkaloid. Warna-warna tersebut bertahan selama 15 menit. (Farnsworth, 1996: 245-257).

4.5.2. Flavonoid

Sebanyak 10 gram serbuk simplisia ditambahkan 100 ml air panas, didihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas. Filtrat (larutan C) akan digunakan pada percobaan berikutnya. Larutan C yang diperoleh lalu diambil 5 ml kemudian dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 0,1 gram serbuk magnesium (Mg) atau seng dan 1 ml larutan HCl 2 N. Lalu ditambahkan 2 ml amil alkohol, lalu dikocok kuat-kuat. Adanya warna kuning hingga merah pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid (Farnsworth 1996: 262-264)

4.5.3. Saponin

Larutan C sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu tabung dikocok kuat-kuat selama 10 detik ke arah vertikal. Pembentukan buih atau busa diamati. Bila terjadi pembentukan buih atau busa setinggi minimal 1 cm dan

bertahan selama 5-10 menit serta tidak menghilang dengan penambahan 1 tetes HCL 0,1 N, berarti bahwa bahan yang diuji mengandung saponin (Farnsworth, 1996 : 257-260).

4.5.4. Tanin

Sebanyak 15 ml larutan C dibagi menjadi tiga bagian, dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam tabung satu diteteskan larutan pereaksi besi (III) klorida 1%. Adanya warna hijau violet hingga hitam menunjukkan adanya senyawa golongan tanin. Kedalam tabung dua diteteskan larutan gelatin 1%, lalu diamati terjadinya pengendapan atau penggumpalan. Adanya penggumpalan menunjukkan bahwa dalam filtrat terkandung senyawa golongan tanin. Kedalam tabung tiga ditambahkan pereaksi steasny, bila terbentuk endapan merah muda menunjukkan adanya tannin katekat.

Hasil dari tabung ke tiga disaring dan filtratnya ditambahkan Natrium asetat dan $FeCl_3$, bila terbentuk endapan biru tinta menunjukkan tannin galat (Farnsworth, 1996 : 264-265).

4.5.5. Senyawa polifenolat

Sebanyak 1 gram simplisia serbuk/ekstrak di tempatkan pada tabung reaksi, lalu ditambahkan 20 ml air, dan dipanaskan diatas penangas air kurang lebih 5 menit hingga mendidih, lalu disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan 2-3 tetes larutan pereaksi besi (III) klorida, apabila timbul warna hijau atau biru hijau, merah ungu, biru hitam menandakan positif fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat(Farnsworth, 1996 : 264-265).

4.5.6. Kuinon

Sebanyak 5 ml filtrat larutan C dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditetaskan 1 tetes larutan basa kuat (NaOH atau KOH) 6N. Terjadinya warna kuning hingga merah menunjukkan bahwa dalam simplisia atau bahan yang diuji terdapat senyawa golongan kuinon (Farnsworth, 1996: 265-266).

4.5.7. Triterpenoid dan steroid

Sebanyak 1 gram serbuk simplisia dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam kemudian disaring dengan kertas saring. Filtrat yang diperoleh ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap sampai kering, kemudian ke dalam residu ditambahkan larutan pereaksi Libermann-Burchard dan apabila timbul warna merah ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan apabila timbul warna hijau biru menandakan positif steroid (Farnsworth, 1996 : 257-260).

4.5.8. Monoterpen dan sesquiterpen

Sebanyak 1 gram simplisia ditambahkan 20 ml eter, kemudian disaring. Filtrat diuapkan dalam cawan penguap diatas *waterbath* atau *hotplate* hingga kering. Kemudian ditetaskan vanilin 10% dalam asam sulfat pekat. Terjadinya warna coklat menunjukkan adanya monoterpenoid dan sesquiterpen (Depkes, 1989).

4.6. Persiapan Uji

4.6.1 Sterilisasi Alat Bahan

Semua alat yang digunakan tabung reaksi, cawan petri, mikropipet dan erlemeyer di sterilisasi untuk menghindari kontaminasi. Alat-alat tersebut dibilas dengan alkohol kemudian dicuci bersih. Alat dibungkus dengan kertas sampai

rapat. Alat-alat dengan mulut terbuka seperti tabung reaksi dan erlemeyer bagian mulutnya disumbat dengan kapas, ditutup kain kasa lalu dibungkus dengan alumunium foil dan diikat rapat dengan benang kasur. Setelah itu baru dibungkus dengan kertas. Masukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

4.6.2 Pembuatan dan Sterilisasi Media

Media MCA dibuat dengan cara melarutkan 40 gram media dalam 1000 ml akuades. Media Natrium Agar dibuat dengan cara melarutkan 20 gram media dalam 1000 ml akuades. Media Nutrien Broth dibuat dengan cara melarutkan 8 gram media dalam 1000 ml akuades. Media yang sudah larut kemudian ditempatkan di dalam erlemeyer, dipanaskan dengan hot plate stirrer hingga bening dan mendidih sampai media larut dengan sempurna. Mulut erlemeyer disumbat dengan kapas, ditutup kain kasa lalu dibungkus dengan alumunium foil dan diikat rapat dengan benang kasur. Kemudian dilakukan sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

4.6.3 Peremajaan Bakteri

Media MCA dan NA yang sudah disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml, kemudian disimpan miring dan dibiarkan padat. Media MCA untuk *S.typhi* dan media NA untuk *E.coli*. Jarum ose yang sudah steril digoreskan ke dalam kultur bakteri murni, kemudian dioleskan ke media yang sudah memadat. Inkubasi 18-24 jam pada oven dengan suhu 37⁰C (Mulyono, 2013).

4.6.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Disiapkan akuades steril dan NB steril. Akuades steril untuk membuat suspensi *Salmonella typhi*, NB steril untuk membuat suspensi *E.coli*. Dimasukkan masing-masing 5 ml ke dalam tabung reaksi steril. Jarum ose yang telah di goreskan ke biakan bakteri dalam media agar miring dicelupkan ke dalam larutan NB dan akuades steril. Pengukuran koloni bakteri dilakukan dengan spektrofotometri pada panjang gelombang 530nm, hingga mencapai persen transmitan 25%.

4.6.5 Pembuatan Sediaan Uji

Ekstrak dilarutkan di dalam etanol. Isi cawan petri steril dengan 20 ml media, kemudian suspensi bakteri dipipet sebanyak 50 µl dan diinokulasikan pada media, putar searah jarum jam dan biarkan memadat. Cawan petri dibagi menjadi 4, dibuat lubang dengan perforator 6mm dan 4 lubang. Masing-masing cawan petri berisi 2 lubang untuk sediaan uji (ekstrak biji pepaya), 1 lubang untuk etanol (kontrol) dan 1 lubang untuk pembanding (kloramfenikol). Sediaan uji yang digunakan adalah konsentrasi bertingkat 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% sebanyak tiga kali pengulangan. Masing-masing lubang diisi sebanyak 50µl. Kemudian dilakukan Preinkubasi ±30-60 menit lalu di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Daerah hambatan pertumbuhan yang terjadi diamati dengan metode Konsentrasi Hambat Minimum. Apabila didapatkan sediaan uji yang memiliki zona bening/ zona hambat terhadap bakteri, maka konsentrasi sediaan

uji diturunkan sampai terbentuk lagi zona bening/ zona hambat. (Mulyono, 2013 ; Peter et al, 2014).

4.6.6 Pembuatan Dosis Pembanding

Orientasi dosis pembanding kloramfenikol dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi minimal obat yang menyebabkan kematian sel bakteri dengan cara membuat pengenceran kloramfenikol. Kloramfenikol kapsul dengan kekuatan sediaan 250 mg kemudian dilarutkan dalam dalam akuades. Dibuat larutan stok 2500 ppm, kemudian dilakukan pengenceran dengan konsentrasi bertingkat: 1000 ppm, 800 ppm, 600 ppm, 400 ppm, dan 200 ppm.

Dibuat perlakuan pada cawan petri khusus untuk pengukuran KHM kloramfenikol. Isi cawan petri steril dengan 20 ml media, kemudian suspensi bakteri dipipet sebanyak 50 μ l dan diinokulasikan pada media, putar searah jarum jam dan biarkan memadat. Cawan petri dilubangi 5 dengan perforator 6 mm kemudian dimasukkan masing-masing 50 μ l larutan kloramfenikol dari masing-masing konsentrasi. Kemudian dilakukan Preinkubasi \pm 30-60 menit lalu di inkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam. Amati adanya daerah hambatan pertumbuhan yang terjadi dengan metode Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). Konsentrasi antibiotik yang digunakan adalah yang memiliki konsentrasi hambat paling rendah (KHM).

4.6.7 Pengukuran Kesetaraan Dosis Antibiotik

Dicari angka KHM yang tepat dari rentang konsentrasi KHM yang dibuat. Kemudian Dibuat kurva baku konsentrasi antara log konsentrasi antibiotik (sumbu

x) dengan diameter hambatan (sumbu y). Didapatkan persamaan garis $y=mx+b$. Kemudian dari antilog b akan didapatkan kesetaraan konsentrasi antibiotik dengan ekstrak uji.

