

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan yaitu penelitian eksperimental yang bertujuan untuk menganalisis perbandingan daya hambat eksudat, infusa dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Metode yang digunakan dalam uji daya hambat adalah metode sumuran. Konsentrasi sampel yang digunakan adalah 10% untuk infusa, konsentrasi 5%, 10% dan 20% untuk eksudat dan ekstrak.

B. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Balai Laboratorium Kesehatan Kota Mataram daerah Provinsi Nusa Tenggara Barat.

C. Subjek Penelitian

Pada penelitian ini populasi dan sampel yang digunakan yaitu tanaman jambu biji (*Psidium guajava*) yang diperoleh dari Desa Mapak Kelurahan Jempong Baru Kecamatan Selaparang Kota Mataram. Bagian tanaman yang digunakan adalah bagian daun jambu biji (*Psidium guajava* L.).

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang menjadi sebab perubahan atau timbulnya variabel terikat. Dinamakan sebagai variabel bebas karena dapat

memberikan pengaruh secara bebas pada variabel lain (Minarsih, 2019). Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu infusa dengan konsentrasi 10%, eksudat dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 5%, 10% dan 20%.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat adanya variabel bebas. Dinamakan variabel terikat karena dapat dipengaruhi oleh perubahan variabel lain (Minarsih, 2019). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah daya hambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan oleh terbentuknya zona bening di sekitar lubang sumuran untuk kemudian diameter zona hambatannya diukur (mm).

E. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Dalam penelitian ini, alat yang digunakan yaitu bejana maserasi, aluminium foil, kain kain saring, blender, mortir dan stamper, ayakan nomor 40 mesh, *waterbath*, *rotary evaporator*, batang pengaduk, gelas beaker, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, bunsen spiritus dan kaki tiga, tabung reaksi, rak tabung reaksi, termometer, timbangan analitik, *stopwatch*, *moisture balance*, pipet tetes, *blue-tipe*, *autoclave*, inkubator, *laminar air flow*, jangka sorong, *cotton bad* steril, pinset dan jarum ose.

b. Bahan

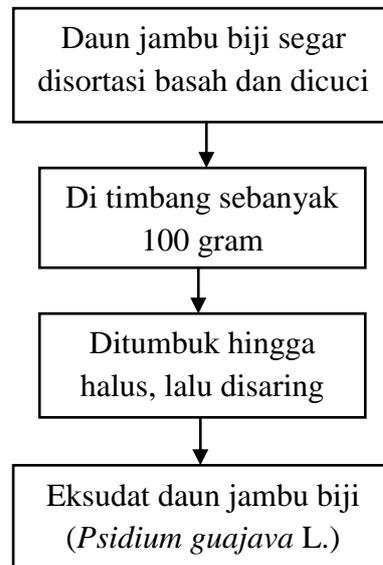
Bahan yang digunakan adalah daun jambu biji (*Psidium guajava L.*), etanol 96%, ciprofloxacin, aquadest steril, HCl 1%, NaCl 0,9%, MHA (*Mueller Hinton Agar*), biakan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2. Persiapan Bahan

Persiapan bahan merupakan tahap awal yaitu dengan melakukan pengumpulan bahan baku daun jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang diperoleh dari Desa Mapak Kelurahan Jempong Baru Kecamatan Selaparang Kota Mataram. Daun jambu biji yang telah dikumpulkan kemudian diolah menjadi 3 bentuk sediaan yang akan digunakan sebagai sampel uji, yaitu eksudat, infusa dan ekstrak.

a. Pembuatan Eksudat

Daun jambu biji segar disortasi basah terlebih dahulu kemudian dicuci hingga bersih dan ditimbang sebanyak 100 gram, lalu dihaluskan dengan cara ditumbuk menggunakan mortir dan stamper yang sebelumnya telah diusap menggunakan alkohol agar steril (Azizah, 2017). Hasil tumbukan yang telah halus selanjutnya diperas dan disaring hingga diperoleh air perasan daun jambu biji (Wahyuni & Nugrahani, 2021). Air perasan yang didapatkan merupakan eksudat daun jambu biji yang akan digunakan sebagai sampel uji dan dibuat dengan konsentrasi 5%, 10% dan 20%.



3.1 Skema Pembuatan Eksudat Daun Jambu Biji

b. Pembuatan Simplisia

Tanaman jambu biji yang masih dalam keadaan segar dikumpulkan dan di sortasi basah dengan cara memisahkan daun jambu biji dari tulang tangkai serta kotoran atau bahan asing yang masih menempel dan kemudian dicuci dengan air mengalir hingga bersih, lalu dirajang menjadi ukuran yang lebih kecil untuk mempermudah dan mempercepat proses pengeringan. Selanjutnya, dilakukan pengeringan dengan cara di angin-anginkan beberapa hari hingga benar-benar kering. Pengeringan dengan cara dianginkan tanpa langsung terkena sinar matahari bertujuan untuk mencegah kerusakan senyawa aktif dalam tanaman. Setelah proses pengeringan selesai, dilakukan sortasi kering untuk menghilangkan bahan yang rusak dan kotor. Simplisia daun jambu biji yang telah disortasi kemudian

dihaluskan dengan cara diblender dan serbuk yang dihasilkan selanjutnya diayak menggunakan ayakan nomor 40 mesh.



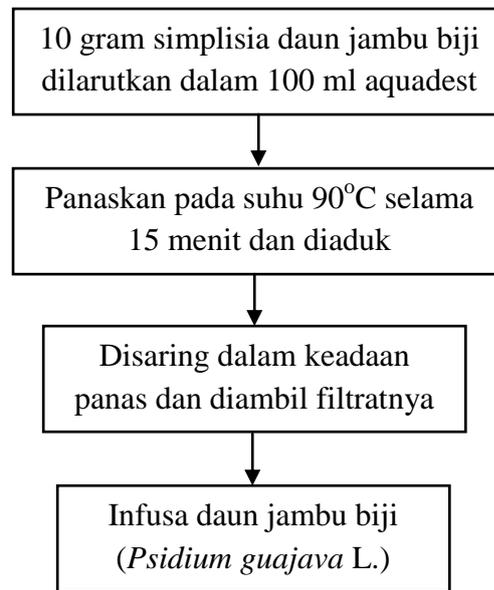
3.2 Skema Pembuatan Simplisia Daun Jambu Biji

c. Pembuatan Infusa Daun Jambu Biji dengan Metode Infudasi

Infusa yang bukan bahan berkhasiat keras dibuat berdasarkan ketentuan standar yaitu dengan konsentrasi 10% simplisia, artinya dalam 100 mL infusa mengandung kandungan kimia setara dengan 10 gram simplisia (Farmakope Indonesia IV). Oleh karena itu, pada penelitian ini infusa hanya dibuat dengan konsentrasi 10% dengan cara menimbang simplisia daun jambu biji sebanyak 10 gram, lalu dilarutkan dengan aquadest sebanyak 2 kali berat simplisia dan diaduk hingga semua simplisia menjadi basah, dibiarkan selama 10 menit kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 100 mL (Hamdan, 2017).

Panaskan pada *waterbath* atau penangas air selama 15 menit dengan suhu 90°C sambil dilakukan pengadukan, selanjutnya disaring

dalam keadaan panas lalu tambahkan air panas melalui ampas sampai volume 100 mL (Retnaningsih *et al.*, 2018).



3.3 Skema Pembuatan Infusa Daun Jambu Biji

d. Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji dengan Metode Maserasi

Ekstrak daun jambu biji diperoleh dengan 2 tahap proses ekstraksi yaitu maserasi dan remaserasi dengan perbandingan serbuk simplisia dan pelarut adalah 1:10 (Sari *et al.*, 2021). Maserasi dilakukan dengan menimbang serbuk simplisia sebanyak 300 gram, kemudian dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 2250 mL. Lakukan perendaman selama 5 hari sambil sesekali diaduk (Ningsih *et al.*, 2018). Setelah proses perendaman selesai, simplisia disaring untuk menghasilkan maserat I dan ampas. Hasil ampas dipisahkan dan diremaserasi dengan menambahkan 750 mL etanol 96%. Lakukan perendaman selama 2 hari, lalu disaring kembali hingga diperoleh

maserat II (Farah, 2019). Maserat I dan II dikumpulkan lalu diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak agak kental, lalu diuapkan kembali di atas *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Ambaro *et al.*, 2020).

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Bobot ekstrak}}{\text{Bobot simplisia}} \times 100\%$$

Standarisasi ekstrak dengan parameter non spesifik yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji bebas etanol, uji kadar air dan uji kadar abu. Uji bebas etanol dilakukan dengan uji kualitatif, yaitu ekstrak kental sebanyak 1 gram pada tabung reaksi ditambahkan H₂SO₄ pekat sebanyak 2 tetes dan 1 mL larutan kalium dikromat. Adanya kandungan etanol dalam ekstrak ditandai dengan terjadinya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2020).

Uji kadar air dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*. Masukkan 1 gram ekstrak kental dalam aluminium foil lalu ditara dan diukur kadar airnya dengan menekan tombol start dan ditunggu 3-5 menit hingga pada layar menampilkan persen kadar air. Kadar air ekstrak yang baik dan memenuhi syarat adalah tidak lebih dari 10% (Pambudi *et al.*, 2021).

Uji kadar abu dilakukan dengan memanaskan cawan dalam tanur selama 30 menit, lalu didinginkan dalam desikator selama 10 menit. Cawan yang telah dipanaskan kemudian ditimbang terlebih dahulu lalu ditambahkan sampel sebanyak 1 gram. Lakukan

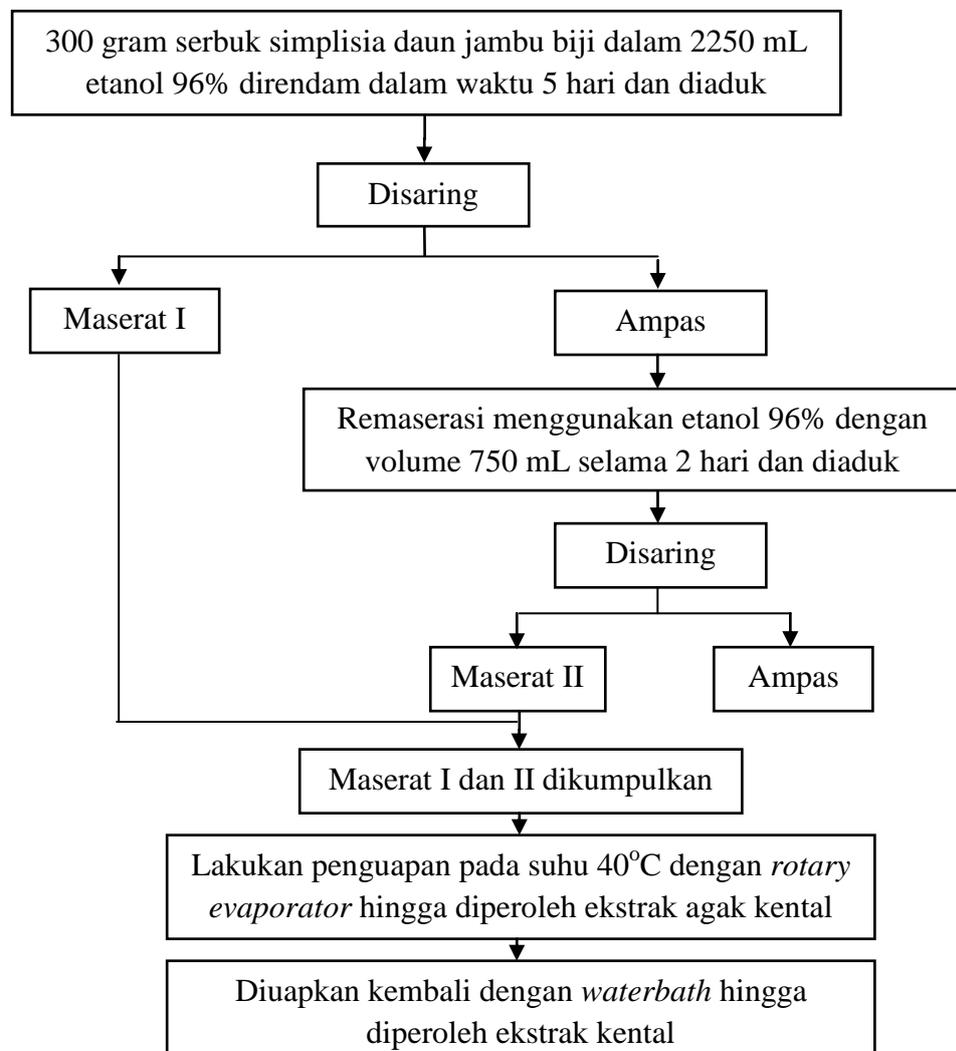
pemanasan kembali untuk cawan dan sampel dalam tanur pada suhu 750°C. Dinginkan ke dalam desikator selama 10 menit, kemudian ditimbang berat cawan dan sampel (Sandri & Hadi, 2017). Lakukan perhitungan bobot kadar abu dengan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{c - a}{b} \times 100\%$$

Keterangan: a = bobot cawan kosong (g)

b = bobot sampel awal (g)

c = bobot cawan dan sampel setelah pengabuan (g)



1.4 Skema Pembuatan Ekstrak Daun Jambu Biji

e. Pembuatan Sampel Uji Konsentrasi 5%, 10% dan 20%

Sampel yaitu eksudat dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) konsentrasi 100% b/v, selanjutnya dilakukan pengenceran menjadi konsentrasi 5%, 10% dan 20% untuk setiap replikasi pada masing-masing kelompok perlakuan.

Rumus pengenceran yang digunakan adalah:

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

Keterangan: V_1 = Volume sebelum pengenceran

V_2 = Volume sesudah pengenceran

M_1 = Konsentrasi sebelum pengenceran

M_2 = Konsentrasi sesudah pengenceran

3. Skrining Fitokimia

a. Uji Tanin dan polifenol

Sampel sebanyak 1 mL ditambahkan 2 tetes FeCl_3 , lalu amati perubahan yang terjadi. Adanya tanin dan polifenol ditandai dengan terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tua. Penambahan larutan uji dengan larutan gelatin 0,5% pada volume yang sama, dan beberapa tetes larutan NaCl 10% akan memberikan adanya endapan (Fajriaty *et al.*, 2018).

b. Uji Flavonoid

1. Pereaksi Wilstater

Sampel sebanyak 2 mL dimasukkan kedalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 0,5 gram serbuk Mg dan 1 mL larutan HCl pekat 2-3 tetes secara perlahan. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan

perubahan warna larutan menjadi merah jingga atau merah ungu (Marcellia & Diarto, 2021).

2. Pereaksi NaOH 10%

Sampel sebanyak 1 mL, ditambahkan larutan NaOH 10% beberapa tetes. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi kuning kecokelatan (Palupi *et al.*, 2022).

c. Uji Alkaloid

Sampel sebanyak 2 gram dalam tabung reaksi ditambahkan 5 mL HCl 2 N beberapa tetes, lalu lakukan pemanasan dan dinginkan kembali selanjutnya dibagi masing-masing 1 mL ke dalam 3 tabung reaksi. Masing-masing tabung ditetesi dengan masing-masing reagen. Pada penambahan reagen Mayer, terbentuknya endapan putih atau kuning menunjukkan positif mengandung alkaloid, penambahan pereaksi Wagner terbentuknya endapan berwarna coklat, sedangkan penambahan pereaksi Dragendroff, terbentuknya endapan jingga (Muthmainnah, 2017).

d. Uji Saponin

Pada tabung reaksi, sampel sebanyak 0,5 mL, ditambahkan 5 mL aquadest dan 1 tetes HCl 2 N. Lakukan pengocokan pada tabung reaksi dengan kuat selama 60 detik. Sampel mengandung saponin ditandai dengan terbentuknya busa (Palupi *et al.*, 2022).

e. Uji Steroid

Sampel sebanyak 1 gram ditambahkan dengan 2 mL kloroform dan dikocok. Filtrat kemudian ditambahkan asetat anhidrat dan asam sulfat pekat masing-masing 2 tetes. Jika terbentuk warna biru atau hijau menunjukkan sampel mengandung senyawa steroid (Farah *et al.*, 2019).

f. Uji Minyak Atsiri

Sampel dengan volume 1 mL dilakukan penguapan di atas cawan porselin sampai diperoleh residu. Terciumnya bau khas yang dihasilkan oleh residu menunjukkan sampel positif mengandung minyak atsiri (Astarina *et al.*, 2012).

4. Uji Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus***a. Sterilisasi alat**

Alat-alat yang digunakan disterilkan terlebih dahulu. Alat-alat dari kaca dicuci menggunakan sabun cair lalu dibilas dengan air hingga bersih. Setelah pencucian selesai, alat-alat kemudian direndam dalam larutan HCl 1% dan dicuci kembali dengan air lalu dikeringkan diudara terbuka. Setelah itu disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C tekanan 2 atm. Sedangkan untuk alat berbahan logam seperti pinset dan ose dicuci dengan alkohol dan disterilkan dengan cara pemijaran di atas api bunsen.

b. Pembuatan Medium *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Ditimbang media MHA sebanyak 38 gram menggunakan neraca elektrik lalu dilarutkan dalam 1000 ml aquadest, kemudian dipanaskan hingga mendidih. Larutan disterilisasi menggunakan *autoclave* selama 25 menit pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah proses sterilisasi selesai, tunggu hingga suhu MHA turun sampai 40°C (Nofita, 2021). Media kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak \pm 10 ml dan dibiarkan memadat (Retnaningsih *et al.*, 2018).

c. Peremajaan Bakteri

Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diperoleh dari Balai Laboratorium Kesehatan Kota Mataram daerah Provinsi Nusa Tenggara Barat. Peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil masing-masing 1 ose bakteri, lalu dipindahkan ke media agar baru yang berbeda untuk setiap jenis bakteri dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C sebelum digunakan untuk pengujian antibakteri (Nofita, 2021).

d. Pembuatan Biakan

Dari biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang telah diremajakan diambil masing-masing 1-2 ose dan ditambahkan NaCl 0,9%, lalu dikocok hingga homogen. Inokulasikan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada media MHA, kemudian diuji dengan memasukkan *Cotton bud* steril ke

dalam campuran bakteri dan NaCl 0,9% untuk memperoleh suspensi bakteri. Selanjutnya, goreskan *Cotton bud* steril yang telah dikeringkan di atas media MHA sebanyak tiga kali pada seluruh area media untuk setiap jenis bakteri. Masing-masing penggoresan dilakukan sambil memutar media sebanyak tiga kali dengan sudut kurang lebih 60°C agar bakteri tergores merata di seluruh media agar (Nofita, 2021).

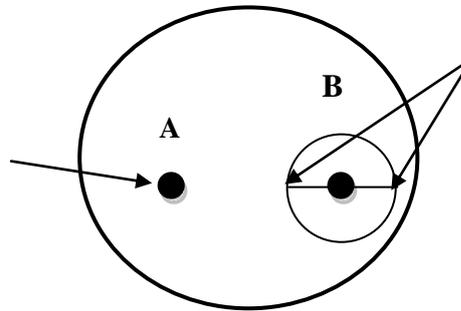
e. Uji Daya Hambat Eksudat, Infusa dan Ekstrak Daun Jambu Biji

MHA padat sebagai media yang sudah diinokulasi bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* untuk masing-masing cawan petri dibuat lubang sumuran dengan *blue-tipe* pada permukaan media MHA dengan diameter 6 mm. Siapkan sampel berupa infusa konsentrasi 10%, eksudat dan ekstrak dengan konsentrasi 5%, 10% dan 20% dan aquadest steril sebagai kontrol (-). Injeksikan setiap larutan uji dengan volume 50 µL pada masing-masing cawan petri ke dalam masing-masing lubang sumuran. Untuk kontrol (+) menggunakan metode difusi cakram dimana disk ciprofloxacin diletakkan di permukaan media pada cawan petri. Cawan petri selanjutnya diinkubasi pada inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengujian setiap sampel untuk bakteri *Escherichia coli* dan juga *Staphylococcus aureus*, dilakukan replikasi sebanyak 3 kali. Pengukuran aktivitas daya hambat bakteri dilakukan dengan mengukur zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran

setelah 24 jam masa inkubasi menggunakan jangka sorong (Nofita, 2021). Terbentuknya zona bening menunjukkan adanya daya hambat pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri yang terkandung di dalam sampel (Hau & Rohyati, 2017).

f. Pengamatan dan Pengukuran Zona Hambat

Dalam penelitian ini, data yang digunakan berupa diameter zona hambat dari masing-masing sampel yaitu eksudat, infusa dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Data diperoleh dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran untuk setiap sampel uji dengan menggunakan jangka sorong yang dinyatakan dalam satuan millimeter (mm). Pengukuran zona hambat dilakukan sebanyak 2-3 kali pada diameter lingkaran atau zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Perhitungan dilakukan dengan cara menghitung diameter terluar zona bening (Putra *et al.*, 2017).

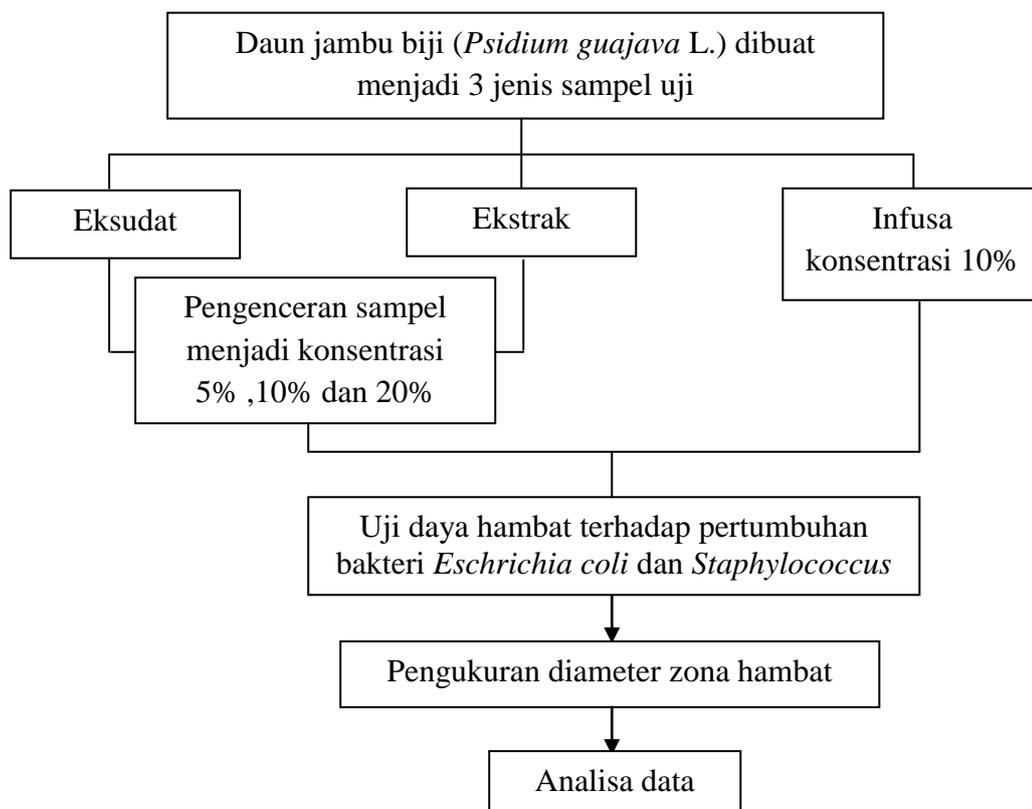


Gambar 3.5 Cara Pengukuran Diameter Zona Hambat

Keterangan: A = tidak terdapat zona hambat disekitar sumuran

B = terdapat zona hambat ditandai dengan terbentuknya zona bening/jernih disekitar sumuran

5. Alur Penelitian



Gambar 3.6 Skema Alur Penelitian

6. Analisis Data

Dari hasil pengamatan berupa diameter zona hambat dari eksudat, infusa dan ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* disajikan dalam bentuk tabel kemudian dilanjutkan dengan analisis data diameter rata-rata zona hambat setiap replikasi untuk masing-masing kelompok perlakuan. Data dianalisis menggunakan SPSS 16.0 *for windows* karena penggunaannya lebih mudah dipahami. Jika data bersifat homogen dan berdistribusi normal, digunakan uji *One Way Anova* pada taraf kepercayaan 95% kemudian dilanjutkan dengan analisis *post-hoc* test LSD. Jika hasil uji diperoleh data yang tidak homogen dan terdistribusi normal, homogen dan tidak terdistribusi normal, atau tidak keduanya, data selanjutnya diuji menggunakan uji non parametrik yaitu *Kruskal Walls*, dan dilanjutkan menggunakan *Mann Whitney*.