

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Desain Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan bersifat eksperimental, Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) diekstraksi dengan metode maserasi yaitu menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan. Kemudian hasil dari ekstrak akan diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi cakram, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji.

B. Lokasi penelitian dan Waktu

1. Determinasi tanaman akan dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistemika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).
2. Ekstraksi Daun jambu biji dan skrining metabolit sekunder dilakukan di Laboratorium Bahan alam Universitas Ngudi Waluyo.
3. Uji aktivitas antibakteri akan dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Ngudi Waluyo.
4. Waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan mulai dari Bulan November 2023 sampai Januari 2024.

C. Subjek Penelitian

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) yang berasal dari Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) sebanyak 5 kg yang berasal dari Kecamatan Bandungan Kabupaten Semarang.

D. Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini yaitu :

1. Ekstraksi

Metode ekstraksi maserasi yaitu dengan mencampurkan serbuk simplisia yang direndam dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan pelarut N-heksan di dalam toples tertutup rapat pada suhu kamar selama 3 hari.

2. Ekstrak Daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L)

Ekstrak daun jambu biji merupakan ekstrak yang didapatkan dari proses maserasi dengan pelarut etanol 96%, etil asetat dan n-heksan, kemudian dilanjutkan pada proses penguapan menggunakan *evaporator* pada suhu 50°C sampai diperoleh ekstrak pekat.

3. Aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri merupakan uji yang akan dilakukan terhadap sampel ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L) dengan variasi pelarut

terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan menggunakan metode difusi cakram dan hasilnya berupa zona hambat.

4. Zona hambat

Zona hambat adalah daerah jernih di sekelilingi cakram dari media pertumbuhan bakteri uji yang tidak ditumbuhi bakteri.

E. Variabel Penelitian

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20% dan 25% dengan menggunakan 3 variasi pelarut yaitu etanol 96%, etil asetat dan n-heksan.
2. Variabel tergantung pada penelitian ini yaitu diameter zona hambat ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L) terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*.
3. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah simplisia daun jambu biji (*Psidium guajava* L), cara pembuatan ekstrak, pelarut yang digunakan, media pertumbuhan, suhu inkubasi, lama inkubasi, metode pengujian antibakteri.

F. Pengumpulan Data

1. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu inkubator (Memmert), LAF (*Laminar Air Flow*) (Airtech), blender (Philips), *rotary evaporator* (RE200-PRO), batang pengaduk, mikropipet, jangka sorong, alat-alat gelas (Pyrex/Iwaki), kawat ose, oven (Memmert UN-

30), pipet tetes, ayakan 40 mesh, seperangkat alat maserasi (toples kaca), cawan petri, cawan penguap, mikroskop, timbangan analitik (Ohaus), rak tabung reaksi, beker gelas 250 ml (Pyrex), erlenmeyer 250 ml (Pyrex/Iwaki), tabung reaksi (Pyrex), lampu spiritus, kain flanel, kertas hvs, tabung 32 reaksi (Pyrex), *blank disc* steril (kertas cakram steril) (Oxioid), labu ukur (Iwaki), autoklaf (Hiramaya), waterabath (Anametri DHH-8), corong pisah, pinset, dan pisau, hot plate (Maspion S-301).

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol 96%, etil asetat, n-heksan, bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *aluminium foil*, daun jambu biji (*Psidium guajava* L), medium *Nutrient Agar* (NA), *disk* doksisisiklin, pereaksi dragendrof, pereaksi mayer, Pereaksi FeCl_3 (besi klorida), plastik wrap, H_2SO_4 (asam sulfat), NaCl 0,9%, hcl pekat (asam klorida), cat gram A (kristal violet), serbuk Mg (magnesium), cat gram B (larutan lugol), cat gram C (alkohol aseton), cat gram D (larutan Safranin), DMSO.

2. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Ekologi dan Biosistematika Departemen Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro Semarang (UNDIP).

3. Pemanenan Daun Jambu Biji

Kriteria pemanenan daun jambu biji dalam penelitian ini adalah daun jambu biji muda dan daun jambu biji tidak terlalu tua. Setelah pemanenan daun jambu biji kemudian dilakukan pembuatan simplisia daun jambu biji.

4. Pembuatan simplisia daun jambu biji

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah melakukan pemanenan daun jambu biji yang tua dan tidak terserang hama. Tahap kedua melakukan sortasi basah untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing seperti tanah, kerikil, rumput, batang, dan akar yang telah rusak. Tahap ketiga melakukan pencucian dengan air mengalir. Tahap keempat melakukan perajangan dengan di potong kecil. Tahap kelima adalah proses pengeringan daun jambu biji. Pengeringan daun jambu biji dengan sinar matahari tidak langsung menggunakan pemanasan tidak langsung selama ± 10 hari. Tahap keenam melakukan sortasi kering dengan cara pemisahan benda asing seperti tanaman yang tidak diperlukan yang tertinggal dan menempel pada simplisia yang masih kering. Proses ini dapat dilakukan dengan cara manual. Tahap ketujuh pembuatan serbuk simplisia dengan cara menghaluskan menggunakan blender. Tahap kedelapan melakukan pengayakan menggunakan pengayakan 40 mesh. Tahap terakhir penimbangan serbuk simplisia daun jambu biji.

5. Standarisasi simplisia parameter non spesifik

a. Uji kadar air simplisia

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven, pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang bobotnya. Sampel ditimbang menggunakan neraca analitik 2 g, dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Syafriada *et al.*, 2018).

Rumus % Kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

b. Uji kadar abu simplisia

Sejumlah serbuk simplisia dimasukan kedalam krus porselen terlebih dahulu lalu ditimbang sebanyak 2 g. Cawan yang sudah berisi serbuk simplisia dimasukan kedalam furnace, perlahan-lahan dipanaskan mulai dari suhu kamar sampai 600°C selama 3 jam. Kemudian didinginkan dalam desikator sampai beratnya konstan, kemudian ditimbang bobotnya (Mayasari & Laoli, 2018).

Kadar abu total dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu(\%)} = \frac{\text{Berat abu}}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\%$$

6. Pembuatan ekstrak daun jambu biji

Serbuk simplisia daun jambu biji 350 gram dimasukkan kedalam masing-masing bejana tertutup (toples kaca), maserasi dilakukan dengan menggunakan tiga pelarut yaitu pelarut etanol 96%, etil asetat, N-heksan. Pelarut yang digunakan yaitu dengan perbandingan (1:5) sebanyak 1.750 ml, pada masing-masing pelarut kemudian ditutup dengan alumunium foil, proses maserasi dilakukan pada ruangan yang terlindung dari cahaya dan sering dilakukan pengadukan. Kemudian ekstrak yang diperoleh dari maserasi disaring terlebih dahulu menggunakan kain flanel (Adiningsih *et al.*, 2021). Selanjutnya dilakukan remaserasi selama 2 hari menggunakan pelarut etanol 96%, etil asetat, N-heksan dengan perbandingan (1:3) pelarut yang digunakan 1.050 ml, filtrat yang telah diperoleh kemudian diuapkan menggunakan alat *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan dilanjutkan di atas *waterbath* dengan suhu 50°C hingga didapatkan ekstrak kental (Ramadhani & Novema, 2022).

7. Perhitungan nilai rendemen ekstrak

Perhitungan nilai rendemen dilakukan untuk setiap ekstraksi. Rendemen merupakan hasil bagi dari berat produk (ekstrak) yang diperoleh dibagi berat bahan baku dikalikan 100% (Chairunnisa *et al.*, 2019). Perhitungan Rumus rendemen ekstrak sebagai berikut :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat ekstrak kental (gram)}}{\text{Berat sampel awal (gram)}} \times 100\%$$

8. Uji kadar air ekstrak

Pengukuran kadar air dilakukan dengan cara cawan porselin dikeringkan menggunakan oven, pada suhu 105°C selama 1 jam dan ditimbang bobotnya. Sampel ditimbang menggunakan neraca analitik 2 g, dan dimasukkan kedalam oven dengan suhu 105°C selama 3 jam. Kemudian sampel didinginkan di dalam desikator selama 20 menit dan ditimbang bobotnya (Syafrida *et al.*, 2018).

Rumus % Kadar air sebagai berikut:

$$\text{kadar air (\%)} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

Keterangan:

a = bobot sampel sebelum pemanasan (gram)

b = bobot sampel setelah pemanasan (gram)

9. Uji bebas etanol

Pada uji etanol secara kualitatif dilakukan dengan menambahkan 5 tetes H₂SO₄ pekat dan 2 ml larutan kalium dikromat, adanya etanol pada ekstrak ditunjukkan dengan adanya perubahan warna mula-mula dari jingga menjadi hijau kebiruan (Adiningsih *et al.*, 2021).

10. Uji bebas etil asetat

Pemeriksaan etil asetat dalam ekstrak dilakukan dengan cara, ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan asam sulfat encer dan dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etil asetat jika tidak tercium bau asetat (cuka) (Yuliani *et al.*, 2016).

11. Uji bebas n-heksan

Uji bebas pelarut n-heksan dilakukan dengan cara 2 tetes ekstrak dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu dibakar. Ekstrak dikatakan bebas n-heksan apabila tidak ada api dan asam yang terbentuk, tetapi jika ada api dan asap maka ekstrak perlu diuapkan (Pakaya *et al.*, 2023)

12. Standarisasi Ekstrak Parameter Spesifik

a. Pengamatan organoleptik

Pengamatan organoleptik merupakan suatu pengujian yang menggunakan panca indra sebagai alat utama untuk menggambarkan bentuk, warna dan bau ekstrak daun jambu biji pada setiap pelarut (Sogandi & Gunarto, 2020).

b. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia yang bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat pada ekstrak daun Jambu Biji (*Psidium guajava* L) dilakukan secara kualitatif meliputi uji flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, steroid dan fenolik.

1) Skrining fitokimia pada ekstrak daun jambu biji

a) Uji Flavonoid

Ekstrak daun jambu biji ditimbang sebanyak 10 mg masing-masing ekstrak lalu tambahkan serbuk magnesium sebanyak 2 mg dan beri 3 tetes hcl pekat. Terbentuknya perubahan warna merah, kuning atau jingga menandakan reaksi positif terhadap flavonoid (Ramadhani *et al.*, 2020).

b) Uji Saponin

Ekstrak daun jambu biji masing-masing ditimbang sebanyak 10 mg, ditambahkan 20 ml air panas. Selanjutnya di kocok kuat selama 10 detik, akan terbentuk buih yang stabil setinggi 1-10 cm selama 30 menit, dan tidak hilang setelah penambahan 1 tetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin (Ramadhani *et al.*, 2020).

c) Uji Tanin

Ekstrak daun jambu biji ditimbang sebanyak 0,5 gram dimasukkan kedalam cawan lalu ditimbang dengan 20 ml air panas dan larutan nacl 10% sebanyak 3 tetes, kemudian ditambahkan larutan $FeCl_3$, bila terbentuk warna biru hitam menunjukkan adanya tanin (Handayani *et al.*, 2020).

d) Uji Steroid

Timbang 10 mg ekstrak daun jambu biji kemudian ditambahkan beberapa tetes pereaksi asam asetat anhidrat 2 ml dan asam sulfat pekat 2 ml dan adanya steroid ditandai dengan perubahan warna menjadi hijau kebiruan (Yanti & Vera, 2019).

e) Uji Alkaloid

Siapkan tiga tabung reaksi, lalu tambahkan 10 mg ekstrak daun jambu biji kedalam masing-masing tabung. Kemudian tambahkan 10 ml kloroform dan aduk rata. Kemudian tambahkan 1 ml hcl 2N dan aduk rata, diamkan beberapa saat.

Kemudian ditambahkan 3 tetes pereaksi Mayer kedalam tabung pertama hingga terbentuk endapan putih yang menunjukkan adanya kandungan alkaloid. Pada tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi Bouchardat. Jika terdapat endapan berwarna coklat atau kehitaman, hal ini menandakan adanya alkaloid. Pada tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendrof. Jika terdapat endapan berwarna jingga atau merah coklat, berarti mengandung alkaloid (Syamsul *et al.*, 2016).

f) Uji Fenolik

Timbang 10 mg ekstrak daun jambu biji, tambahkan 20 ml air panas dan tambahkan 3 tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman.

13. Identifikasi bakteri

Langkah pertama yang dilakukan adalah membersihkan objek kaca dengan kapas menggunakan alkohol 96% lalu dikeringkan. Biarkan bakteri pada agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose steril dan oleskan secara merata pada kaca objek. Kemudian difiksasi diatas bunsen hingga kering dengan cara dilewatkan kaca objek. Pada kaca objek yang telah kering, kemudian ditetesi menggunakan larutan kristal violet dan dibiarkan selama satu menit, selanjutnya dibilas menggunakan aquades dengan cara memegang kaca obyek pada posisi miring dan dikeringkan dengan kertas tisu secara hati-hati. Langkah kedua, masing-masing objek ditetesi dengan

larutan lugol 2 tetes dan di diamkan selama satu menit lalu dibilas dengan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu. Langkah ketiga, masing-masing kaca objek ditetesi dengan larutan pemucat warna yaitu alkohol 96% selama 15 detik. Dicuci menggunakan larutan aquades dan dikeringkan menggunakan kertas tisu. Langkah yang terakhir yaitu ditetesi larutan safranin diamkan selama 1 menit lalu dicuci dengan aquades dan keringkan menggunakan kertas tisu. Selanjutnya diamati bentuk selnya menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100 x. Bakteri dinyatakan bersifat gram positif yaitu apabila warna selnya ungu dan gram negatif apa bila warna selnya merah (Datta *et al.*, 2019).

14. Sterilisasi alat

Langkah pertama adalah mencuci alat yang akan digunakan sampai bersih kemudian dikeringkan. Alat non gelas disterilkan menggunakan autoklaf (*autoclave*) dilengkapi dengan katup pengaman selama 15 menit pada suhu 121°C. Alat-alat gelas dibungkus dahulu menggunakan kertas, dan disterilkan menggunakan oven selama 2 jam dengan suhu 180°C (Azizah *et al.*, 2020).

15. Pembuatan media

a. Pembuatan media NA

Nutrien Agar (NA) sebanyak 5 g dilarutkan dalam 250 ml aquades menggunakan Erlenmeyer. Selanjutnya media disterilkan dengan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama \pm 30 menit sampai kemudian media

memadat. Media agar ini digunakan untuk inokulasi bakteri, lapisan dasar, dan lapisan kedua (Somba *et al.*, 2019).

b. Inokulasi Bakteri

Inokulasi bakteri yaitu menumbuhkan bakteri dalam tabung reaksi pada media agar yang sudah dibuat. Pada kultur bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil menggunakan jarum ose. Selanjutnya bakteri digoreskan rapat pada media agar miring secara zig-zag dari bawah sampai atas dan biarkan di inkubator pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Rizki *et al.*, 2021).

c. Pembuatan suspensi bakteri

Pada pembuatan suspensi bakteri yaitu dengan cara diambil sebanyak 3 ose bakteri *Staphylococcus epidermidis* dimasukan kedalam tabung reaksi yang berisi 10 ml larutan NaCl fisiologi 0,9%, lalu tabung reaksi dikocok sampai homogen. Kemudian disamakan dengan larutan standar Mc farland. Jika biakan bakteri *Staphylococcus epidermidis* belum sama degan larutan pembanding, maka ditambahkan bakteri dengan jarum ose hingga mendapatkan kekeruhan yang sama (Qomar *et al.*, 2018).

d. Pembuatan konsentrasi larutan Uji Ekstrak Daun Jambu Biji

Uji aktivitas antibakteri metode difusi cakram dilakukan menggunakan lima konsentrasi ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava* L), konsentrasi larutan uji yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

e. Pembuatan larutan uji kontrol positif dan kontrol negatif

Kontrol positif yang digunakan adalah *disk* doksisisiklin sedangkan kontrol negatif adalah DMSO (Wahdaningsih *et al.*, 2014).

f. Perlakuan uji aktivitas antibakteri

Tahap pertama mempersiapkan alat dan bahan. Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* diambil menggunakan mikropipet kemudian masukkan kedalam cawan petri, kemudian dituangkan media NA kedalam cawan petri menggunakan metode *pour plate* (metode tuang) lalu diratakan dengan memutar cawan petri mengikuti pola angka delapan. Setiap cawan petri dibagi menjadi 5 bagian dan dilakukan pelebelan pada setiap bagian. Tahap selanjutnya merendam paper disk pada masing – masing konsentrasi ekstrak daun jambu biji pada variasi pelarut, kontrol positif, kontrol negatif selama 15 menit (Rizky & Sogandi, 2018).

Masing-masing konsentrasi ekstrak diencerkan menggunakan DMSO, paper disk diletakan di atas media agar yang telah dituangkan suspensi *Staphylococcus epidermidis* dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Setelah itu cawan petri ditutup, kemudian panaskan cawan diatas api bunsen dengan memutar-mutar agar cawan petri lebih steril. Kemudian tutup bagian tepi cawan petri menggunakan plastik wrap dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dengan posisi cawan petri terbalik (Ugha *et al.*, 2019).

g. Pengamatan hasil aktivitas antibakteri

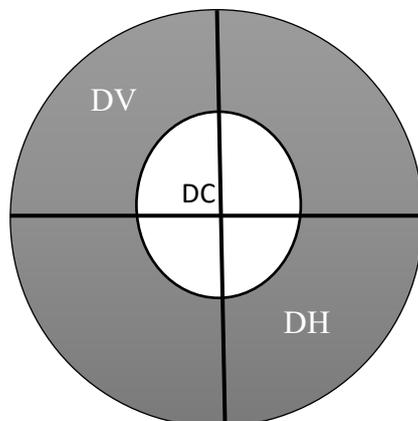
Pengamatan dilakukan 24 jam masa inkubasi. Zona bening sekitar cakram merupakan petunjuk kepekaan bakteri terhadap bahan antibakteri yang digunakan sebagai bahan uji dan dinyatakan dengan luas zona hambat (Toy *et al.*, 2015).

Cara pengamatan antibakteri yaitu sebagai berikut.

- 1) Meletakkan cawan petri secara berurutan diatas meja sesuai dengan perlakuannya.
- 2) Meletakkan cawan petri secara terbalik dan tutup cawan petri tidak terbuka.
- 3) Zona hambat diamati dengan cara mengukur daerah bening (diameter zona hambat) disekitar lubang sumur dengan menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter (Afifi, 2018).

Diameter zona hambat diukur menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\frac{(DV - DC) + (DH - DC)}{2}$$



Keterangan :

 : Zona hambat

DV = Diameter vertikal

DH = Diameter horizontal

DC = Diameter cakram (Toy *et al.*, 2015).

G. Analisis Data

Data diameter zona hambat yang terbentuk, dianalisis menggunakan SPSS for windows. Data yang diperoleh dari uji aktivitas ekstrak daun jambu biji pada masing-masing pelarut kemudian dianalisis menggunakan proses SPSS. Langkah pertama yakni melakukan uji normalitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak (Ikhsan *et al.*, 2021). Pada uji normalitas dalam penelitian ini menggunakan *Shapiro-Wilk* dikarenakan data yang digunakan kurang dari 50 yaitu 3 kali, replikasi dengan taraf uji signifikansi 5% atau 0,05 (Fiqih *et al.*, 2016). Bila signifikansi pada p-value hasilnya adalah $<0,05$ maka H_0 ditolak begitu sebaliknya, bila hasil p-value $>0,05$ atau sama dengan 0,05 maka H_0 diterima (Gaspersz & Salamor, 2021). Selanjutnya dilakukan uji homogenitas untuk mengetahui data yang akan digunakan dalam analisis telah homogen atau tidak homogen. Uji homogen ini akan dilakukan menggunakan uji levene, jika p-value menunjukkan hasil $<0,05$ maka H_0 ditolak atau data tidak terdistribusi homogen. Uji homogenitas data sampel adalah uji *One Way Anava*. Kriteria uji homogenitas data dari sampel adalah sebagai berikut: jika nilai signifikan $> 0,05$ maka varians setiap sampel homogen dan H_1 ditolak, jika nilai signifikan $< 0,05$

maka masing-masing varians setiap sampel tidak homogen dan H_0 diterima (Permana, 2019). Untuk uji akhir analisis dilakukan dengan uji *T-Test*, uji ini menggunakan satu individu (objek penelitian) dengan menggunakan dua perlakuan yang berbeda atau dua data berpasangan (Ardiyansyah *et al.*, 2018). Uji ini dilakukan untuk melihat apakah ada perbedaan yang bermakna antara sampel ekstrak pada etanol 96%, etil asetat dan n-heksan dengan hipotesis bila nilai *p-value* $>0,05$ penelitian maka keputusan hipotesis yaitu menolak H_1 yang berarti tidak ada perbedaan (A. A. Sari & Sholehah, 2022)