

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini bersifat analitik laboratorik dengan menggunakan desain penelitian eksperimen. Rancangan penelitian ini untuk mengetahui uji aktivitas antibakteri infusa daun jambu biji australia terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Pembuatan infusa daun jambu biji australia menggunakan metode infundasi dengan pelarut aquadest. Kemudian dilakukan skrining fitokimia meliputi uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji steroid, uji terpenoid, uji alkaloid dan uji kuinon. Tahap selanjutnya dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi sumuran. Pada penelitian ini dilakukan beberapa prosedur yaitu pengumpulan tanaman, pembuatan infusa daun jambu biji australia, persiapan alat dan bahan, pembuatan media, peremajaan bakteri, uji skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10% dan 20%.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Berikut ini adalah populasi dan sampel penelitian dalam penelitian ini yaitu:

3.2.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah infusa daun jambu biji australia terhadap *Salmonella typhi*.

3.2.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah infusa daun jambu biji australia dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10% dan 20%.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Untuk pengambilan bahan baku daun jambu biji australia (*Psidium guajava* L.) dilakukan di Kota Gresik.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Farmakognosi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai Juni 2019.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Dalam penelitian ini digunakan beberapa variabel yang dibagi ke dalam beberapa bagian yaitu variabel independen dan dependen.

3.4.1 Variabel Independen

Variabel bebas dalam penelitian ini infusa daun jambu biji australia (*Psidium guajava* L.) dengan berbagai konsentrasi.

3.4.2 Variabel Dependen

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri infusa daun jambu biji australia (*Psidium guajava* L.) terhadap *Salmonella typhi*.

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Infusa daun jambu biji australia (<i>Psidium guajava</i> L.)	Hasil infundasi daun jambu biji australia menggunakan pelarut aquadest pada suhu 90°C selama 15 menit.	Termometer, Pipet volume	Pengenceran (ml)	Ordinal
Aktivitas antibakteri <i>Salmonella typhi</i>	Kemampuan infusa daun jambu biji australia (<i>Psidium guajava</i> L.) dalam menghambat bakteri <i>Salmonella typhi</i> dilihat dari zona bening yang terbentuk.	Jangka sorong	Diameter zona hambat sekitar sumuran (mm)	Ordinal

3.5 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu timbangan digital (Idealife), timbangan analitik (ohaus), panci infundasi, spektrofotometri, tabung reaksi (pyrex), beaker glass (pyrex), pipet volume (pyrex), mikro pipet, gelas ukur (pyrex), cawan petri, autoclave, inkubator (memert), gelas pengaduk, jangka sorong.

Bahan yang diperlukan adalah daun jambu biji australia, SSA (*Salmonella Shigella Agar*) merek Oxoid, NaCl 0,9 %, BaCl₂ 1%, H₂SO₄ 1%, aquadest steril, biakan murni *Salmonella typhi*, HCl, logam Mg, dragendoff, meyer, FeCl₃, gelatin 1%, H₂SO₄, pelarut liebermann-burchard dan KOH.

3.6 Prosedur Kerja

Prosedur kerja dalam penelitian ini melalui langkah kerja sebagai berikut:

3.6.1 Determinasi Tumbuhan

Determinasi tumbuhan dilakukan dengan urutan sebagai berikut:

1. Diperiksa morfologi tumbuhan yang akan di determinasi.
2. Diperiksa perawakan tumbuhan, ekologi, batang, daun, bagian tumbuhan lainnya, buah dan biji pada tumbuhan tersebut.
3. Dicocokkan dengan kunci determinasi pada buku Flora

3.6.2 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan sebelum alat digunakan, dengan cara dimasukkan alat kedalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Untuk alat yang berbahan kaca dibungkus dengan kertas coklat.

3.6.3 Pembuatan Media SSA (*Salmonella shigella agar*)

Pembuatan media SSA (*Salmonella shiegella agar*) dengan urutan sebagai berikut:

1. Ditimbang 18,90 g SSA (*Salmonella shigella agar*).
2. Ditambahkan aquadest 300 ml
3. Dipanaskan diatas bunsen sampai mendidih.

3.6.4 Pembuatan Media Miring

Pembuatan media miring dengan urutan sebagai berikut:

1. Diambil ±14 ml media SSA (*Salmonella shigella agar*)
2. Dimasukkan kedalam tabung reaksi

3. Ditunggalkan menggunakan kapas steril kemudian diletakkan dengan posisi miring.

3.6.5 Peremajaan Bakteri Murni *Salmonella typhi*

Peremajaan bakteri murni *Salmonella typhi* dengan urutan sebagai berikut:

1. Diambil 1-2 ose biakan murni *Salmonella typhi*.
2. Diinokulasikan secara aseptik pada media miring SSA (*Salmonella shigella agar*).
3. Diinkubasi selama 24- 48 jam pada suhu 37°C (Irianto,2006).

3.6.6 Pembuatan Infusa Daun Jambu Biji Australia.

Pembuatan infusa menggunakan metode (Rahma *et al*,2009), pembuatan infusa daun jambu biji australia, meliputi:

1. Dicuci daun jambu biji australia.
2. Ditimbang daun jambu biji australia sebanyak 40g.
3. Dipotong-potong kemudian dimasukkan kedalam panci infundasi.
4. Ditambahkan aquadest steril sebanyak 200 ml.
5. Dipanaskan sampai suhu 90°C selama 15 menit.
6. Disaring menggunakan kertas saring dan dimasukkan kedalam botol kaca coklat. Hasilnya merupakan infusa dengan konsentrasi 20%,
7. Dilakukan pengenceran dengan konsentrasi 2,5%, 5%, 10%.

3.6.7 Skrining Fitokimia

Berikut ini prosedur uji metabolit sekunder dalam penelitian ini, yaitu (Maysarah, dkk,2015):

3.6.7.1 Uji flavonoid

Uji flavonoid dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Dimasukkan 1 ml infusa.
2. Ditambahkan 3 tetes HCl pekat
3. Ditambahkan logam Magnesium
4. Diamati perubahan warna, adanya flavonoid ditandai dengan perubahan warna merah kekuningan.

3.6.7.2 Uji alkaloid

Uji alkaloid dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Dipanaskan infusa sebanyak 4 ml sampai mendapat residu.
2. Dilarutkan residu dengan HCl sebanyak 5ml.
3. Dibagi larutan kedalam tiga tabung reaksi.
4. Ditambahkan HCl 2 tetes pada tabung pertama.
5. Ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendoff* pada tabung yang kedua, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua.
6. Ditambahkan 2 tetes pereaksi *meyer* pada tabung yang ketiga, diamati ketiga tabung, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan pada tabung ketiga.

3.6.7.3 Uji tanin

Uji tanin dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Diambil 1 ml infusa.

2. Ditambahkan 2 tetes FeCl_3 .
3. Ditambahkan gelatin 1%.
4. Diamati perubahan warna, hasil positif apabila terjadi endapan putih.

3.6.7.4 Uji polifenol

Uji polifenol dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Diambil 1 ml infusa.
2. Ditambahkan 2 tetes FeCl_3 .
3. Diamati perubahan warna, apabila terbentuk warna merah, ungu, hijau, biru atau hitam yang kuat menunjukkan adanya polifenol.

3.6.7.5 Uji saponin

Uji saponin dilakukan sebagai berikut:

1. Diambil 1 ml infusa.
2. Ditambahkan 1 ml aquadest.
3. Dipanaskan diatas api bunsen kemudian didiamkan sampai dingin lalu dikocok kuat-kuat dan diamati adanya buih yang stabil menunjukkan adanya saponin.

3.6.7.6 Uji steroid dan triterpenoid

Uji steroid dan triterpenoid dilakukan sebagai berikut:

1. Diambil 1 ml infusa.
2. Diteteskan larutan pereaksi *LiebermannBurchard* (asam asetat : asam sulfat pekat = 20 : 1). Terbentuknya warna ungu menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, sedangkan bila terbentuk warna hijau-biru, menunjukkan adanya senyawa steroid.

3.6.7.7 Uji kuinon

Uji kuinon dilakukan sebagai berikut:

1. Diambil 1 ml infusa.
2. Ditambahkan 2 tetes kalium hidroksida, kemudian diamati perubahan warna, terbentuknya warna kuning hingga merah menunjukkan adanya kuinon.

3.6.8 Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* .

Pembuatan suspensi bakteri *Salmonella typhi* sebagai berikut:

1. Diambil 1-2 ose biakan bakteri *Salmonella typhi*.
2. Disuspensikan kedalam larutan NaCl 0,9% sampai diperoleh kekeruhan sesuai standar 0,5 ekuivalen *McFarland* atau sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/mL.

Pembuatan zat pembanding larutan baku *McFarland* terdiri atas 2 larutan, yaitu BaCl_2 1% sebanyak 0,05 ml dan H_2SO_4 1% 9,95 ml dan dikocok homogen. Nilai absorban larutan baku *McFarland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel sebanding dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/mL (Sutton Scott,2011).

3.6.9 Uji Antibakteri

Prosedur kerja uji antibakteri menurut (Ruhana dan Euis,2017) meliputi:

1. Diambil 400 μl suspensi bakteri *Salmonella typhi*.
2. Dicampurkan dengan media SSA (*Salmonella shigella* agar).
3. Diaduk dengan cara memutar gelas sampai semuanya tercampur, dituang kedalam cawan petri dengan metode *pour pate*.
4. Dimasukkan kedalam lubang sumuran dengan diameter $\pm 6\text{mm}$ kedalam 14 cawan petri yang terdiri dari:

Tabel 3.2 Konsentrasi Sampel Infusa Pada Cawan Petri

Nomer Cawan	Konsentrasi Sampel Infusa
Cawan 1	
Cawan 2	2,5%
Cawan 3	
Cawan 4	
Cawan 5	5 %
Cawan 6	
Cawan 7	
Cawan 8	10 %
Cawan 9	
Cawan 10	
Cawan 11	20 %
Cawan 12	

5. Dimasukkan infusa daun jambu biji australia (*Psidium guajava L.*) sebanyak ± 0,2 ml.
6. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, diukur zona bening yang terbentuk disekitar sumuran dengan menggunakan jangka sorong.

3.7 Analisis Data

Data yang dihasilkan pada penelitian ini bersifat deskriptif. Analisis dilakukan dengan membandingkan diameter zona bening yang dihasilkan pada penelitian dengan menggunakan pembanding standar klasifikasi daya hambat pertumbuhan bakteri menurut Pan Chen Wu Tang (2009). Respon pertumbuhan *Salmonella typhi* yang telah diberi agen antibakteri yaitu infusa daun jambu biji australia (*Psidium guajava L.*) dapat diklasifikasikan dalam kategori lemah, sedang atau kuat.