

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan merupakan jenis penelitian deskriptif . Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya antibakteri pada kulit buah jambu biji terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*. Tahap penelitian meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan, pembuatan ekstrak dan simplisia kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*) dengan metode maserasi dan pelarut etanol 96%, Sterilisasi alat dan bahan, pembuatan media, peremajaan bakteri, pembuatan suspensi ekstrak kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*), pembuatan suspensi bakteri, pengujian aktivitas antibakteri, analisis data dan membuat kesimpulan dari data yang diperoleh.

3.2 Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*), sedangkan untuk sampelnya sebagian dari ekstrak kulit buah jambu biji.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi di Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Waktu penelitian pada bulan Februari 2021.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Pada penelitian ini terdapat 2 variabel yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas ekstrak kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*), sedangkan untuk variabel terikat aktivitas antibakteri *Streptococcus pyogenes*

Tabel 3.1. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Variabel bebas : Ekstrak kulit buah jambu biji (<i>Psidium guajava L.</i>)	Cairan kental yang diperoleh dari ekstraksi kulit buah jambu biji (<i>Psidium guajava L.</i>)	Neraca analitik	Berat ekstrak	Ratio
Variabel terikat : Aktivitas antibakteri	Kemampuan zat uji dalam menghambat pertumbuhan bakteri	Jangka sorong	Adanya diameter zona bening di sekitar sumuran.	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

3.5.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, telenan, pipet tetes, Beaker glass 100 mL (Pyrex) , Gelas ukur 10 mL (Pyrex) , Erlenmeyer 250 mL (Iwaki) , Batang pengaduk, Tabung reaksi(Pyrex), Aluminium foil, Cawan petri, Inkubator (Memmert), Kompor, Laminary Air Flow, Spoit (VITLAB), Timbangan analitik (Pioneer) , Blender,Oven (Memmert) , Kapas, Gunting, Lampu spritus, Penggaris, Kertas label, Sarung tangan, Masker, Autoklaf, Jarum ose, Evaporator (IKA),Spektrofotometri Uv-Vis (Thermo scientific)

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*) , aquades, etanol 70%, Mueller Hinton Agar, *Streptococcus pyogenes* (), Alkohol 70%, Media Blood Agar, larutan NaCl 0,9%.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Penyiapan Bahan Uji (Salasa et al., 2018)

Bahan uji yang digunakan adalah Kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*) yang diperoleh dari Lawang. Sebelum diolah, buah jambu biji dicuci hingga bersih dari segala kotoran, serangga maupun insekta yang menempel pada kulit buah jambu biji. Setelah itu pisahkan terlebih dahulu Kulit buah jambu biji dari biji dan daging buahnya selanjutnya dicuci dan dipotong-potong dan dikeringkan.

3.6.2 Pembuatan Simplisia (Mahardika et al., 2014)

Disiapkan alat dan bahan kulit buah jambu biji dibersihkan dari kotoran ,dicuci menggunakan air bersih kemudian ditiriskan. Dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 60°C dan dihaluskan dengan blender hingga membentuk serbuk. Dimasukkan serbuk kulit buah jambu biji ke dalam botol tutup dengan alumunium foil.

3.6.3 Prosedur Ekstraksi (Aponno, 2014)

Serbuk kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*) 200 gram direndam ke dalam etanol 96% sebanyak 2000 mL, ditutup dengan alumunium foil dan dibiarkan selama 3 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 3 hari, sampel yang direndam tersebut disaring menggunakan kertas saring. Filtrat yang didapat diuapkan dengan *rotaryevaporaotor* pada suhu 70°C kemudian di waterbath didapat ekstrak kental kulit buah jambu biji (*Psidium guajava L.*).

3.6.4 Prosedur Pembuatan Suspensi Ekstrak Kulit buah jambu biji(*Psidium guajava L.*)

Ektrak kulit buah jambu biji ditambahkan larutan aquades sterilsebanyak 5 mL volume ekstraknya sebanyak 5 ml menggunakan perbandingan 1:1 (Ariyani et al., 2018).

3.6.5 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri harus disterilisasi terlebih dahulu untuk mencegah terjadinya kontaminasi

mikroorganisme. Alat dan Bahan yang akan digunakan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.6 Prosedur Skrining Fitokimia

1. Identifikasi senyawa Tanin

Identifikasi tanin dilakukan dengan cara, ekstrak simplisia kulit buah jambu biji ditambahkan dengan 1-2 tetes pereaksi FeCl_3 1%, kemudian diamati dinyatakan positif senyawa tanin apabila berwarna hijau gelap atau hijau kebiruan.

2. Identifikasi senyawa Flavonoid

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara, ekstrak simplisia kulit buah jambu biji ditambahkan serbuk magnesium + 1 mL asam klorida pekat dan alkohol, dikocok kemudian dibiarkan. Adanya flavonoid ditandai dengan munculnya warna merah oranye, atau hijau. Tergantung pada struktur dari flavonoid terkandung dalam sampel.

3.6.7 Prosedur Pembuatan Media MHA

Media yang digunakan yaitu Mueller Hinton agar (MHA) cara pembuatannya. Ditimbang media MHA sebanyak 4 gram, dimasukkan 4 gram media MHA ke dalam erlenmeyer di larutkan dengan 200 mL aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih dan homogen, kemudian dimasukkan ke dalam tabung atau botol yang steril, Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.6.8 Prosedur Pembuatan Peremajaan Bakteri

Diambil 1 ose bakteri *Streptococcus pyogenes* pada biakan murni, Dipindahkan ke dalam 10 tabung reaksi yang telah berisi media miring yaitu Media Blood Agar, kemudian ditutup dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas coklat, diinkubasi di Inkubator pada suhu 37°C selama 1 × 24 jam.

3.6.9 Prosedur pembuatan suspensi bakteri (Masayu Azizah,2017)

Koloni diambil dari media selektif menggunakan jarum ose, lalu disuspensikan ke dalam pelarut NaCl 0.9 % sebanyak 5 ml dan kocok homogen dalam tabung reaksi. Kekeruhan suspensi mikroba uji diukur dengan alat spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 580 nm dengan transmittan 25%.

3.6.10 Pembuatan kontrol media

Disiapkan kontrol media, dimasukkan suspensi bakteri sebanyak 1 mL dengan menggunakan mikropipet masukkan kedalam cawan petri, dimasukkan media MHA sebanyak 15 mL kedalam cawan petri yang berisi bakteri uji kemudian dilakukan gerak pour plate di atas meja Tunggu memadat, selanjutnya dibungkus dengan kertas coklat dan diinkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37°C.

3.6.11 Uji Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri 1 mL ditumbuhkan pada media Mueller Hinton Agar dengan metode pour plate, media yang sudah terisi suspensi bakteri dilubangi dengan bor diameter 5 mm dan kedalaman 4 mm dan diisi ekstrak kulit buah jambu

biji, dilakukan sebanyak 3 kali, diinkubasi selama 24 jam, diamati dan diukur diameter zona hambat.

3.6 Analisis Data

Data yang dianalisis diambil dari hasil pengukuran zona hambat yang terbentuk pada sekitar area sumuran uji dengan menggunakan jangka sorong dan dianalisis secara deskriptif , karena penelitian ini mengamati aktivitas dari ekstrak kulit buah jambu biji terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes*.