

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian kuantitatif dengan desain penelitian *true-experiment*. Jumlah perlakuan konsentrasi ekstrak daun jambu biji sebanyak 10 perlakuan dengan 3 kali pengulangan. Variabel bebas adalah ekstrak etanol daun jambu biji (*Syzygium guajava* L.) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%. Variabel terikat adalah zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

B. Lokasi dan Waktu Penelitian

1. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang. Proses determinasi atau identifikasi daun jambu biji dilakukan di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Ekstrak dibuat di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.

2. Waktu penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Mei 2023.

C. Subyek Penelitian

Subyek penelitian ini yaitu daun jambu biji putih yang diperoleh di daerah Bumimas, Batanghari, Lampung Timur. Kriteria daun jambu biji yang digunakan adalah daun yang masih segar, tidak rusak secara fisik, dan tidak keriting, daun helai kelima dari pucuk berukuran panjang 11,3-13,6 cm dengan lebar 5,0-6,9 cm. Daun jambu biji diekstraksi dengan pelarut etanol 70%, dibuat pengenceran dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% yang digunakan sebagai larutan uji. Bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh dari Universitas Indonesia.

D. Variabel dan Definisi Operasional

Tabel 3.1. Variabel dan Definisi Operasional

No	Variabel penelitian	Definisi	Cara ukur	Alat ukur	Hasil ukur	Skala Ukur
Variabel Bebas						
1	Ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Syzygium guajava</i> L.)	Daun jambu biji yang telah diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%	Menimbang berat ekstrak kental daun jambu biji	Neraca Analitik	Ekstrak kental daun jambu biji (gram)	Rasio
2	Larutan uji ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Syzygium guajava</i> L.)	Ekstrak daun jambu biji yang telah diencerkan menggunakan aquadest steril	Pengenceran dengan rumus: $\% = \frac{b}{v} \times$ Volume larutan	Neraca Analitik	Ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%.	Interval
Variabel Terikat						
3	Zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Shigella dysenteriae</i>	Zona jernih yang terbentuk setelah dihambat oleh ekstrak etanol daun jambu biji (<i>Syzygium guajava</i> L.)	Mengukur diameter zona hambat	Jangka sorong	Diameter zona hambat (mm)	Ordinal

E. Pengumpulan Data

Pada proses pengumpulan data terdapat beberapa tahap, yaitu:

1. Tahap Pengumpulan Data

a. Pra Analitik

1) Determinasi daun jambu biji.

Daun jambu biji dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung bertujuan untuk menentukan nama/jenis tanaman secara spesifik dan mengetahui kebenaran identitas tanaman, apakah tanaman tersebut benar-benar tanaman yang diinginkan.

2) Pembuatan simplisia daun jambu biji.

Pembuatan simplisia dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis.

3) Ekstraksi daun jambu biji menggunakan pelarut etanol 70%.

Ekstraksi dilakukan dengan ekstraksi secara dingin menggunakan metode maserasi. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis dan tahap evaporasi dilakukan di Laboratorium Farmakognosi Jurusan Farmasi Poltekkes Tanjungkarang.

4) Identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* (Lampiran 3).

Bakteri diperoleh dari Universitas Indonesia. Identifikasi bakteri dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.

5) Pembuatan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae*

Pembuatan suspensi dilakukan menggunakan alat Turbidimeter dan dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.

6) Pembuatan larutan uji.

Pembuatan larutan uji yaitu dengan dilakukannya pengenceran ekstrak daun jambu biji dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% (Lampiran 2).

b. Analitik

Pengujian ekstrak daun jambu biji terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dan pengukuran zona hambat. Pengujian ekstrak etanol daun jambu biji akan menggunakan metode difusi cakram disk, kemudian diameter zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Pengujian dilakukan di Laboratorium Bakteriologi Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Tanjungkarang.

c. Pasca Analitik

1) Analisis data

Analisis data dilakukan menggunakan *One Way ANOVA* dan dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) menggunakan IBM SPSS 26. Sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan

homogenitas untuk memastikan bahwa data yang akan dianalisis terdistribusi secara normal atau menilai sebaran data pada konsentrasi, serta uji homogenitas menunjukkan bahwa kelompok konsentrasi memiliki variasi yang sama

2) Penarikan kesimpulan

Kesimpulan diambil berdasarkan hasil diameter zona hambat yang terbentuk dan kemudian dibandingkan dengan antibiotik kloramfenikol 30 μg untuk mengetahui konsentrasi efektif.

2. Metode Pemeriksaan

Pada penelitian ini, metode pemeriksaan uji daya hambat yang digunakan yaitu cara difusi cakram disk metode *Kirby Bauer*.

3. Alat dan Bahan

a. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu, erlenmeyer, kaca arloji, pipet ukur, gelas ukur, beaker glass, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, pinset, batang pengaduk, lampu spiritus, disk cakram, jangka sorong, vacuum pump, ose, neraca analitik, vortex, autoclave, oven, inkubator, dan hot plate.

b. Bahan

Bahan yang digunakan adalah swab steril, *disk blank*, kertas kopi, korek api kayu, NaCl 0,85%, aquadest, antibiotik kloramfenikol 30 μg

c. Media

Media yang digunakan adalah Salmonella Shigella Agar (SSA), Endo Agar, Eosin Methylene Blue (EMB), Mac Concey (MC), Mueller Hinton Agar (MHA), Brain Heart Infusion Broth (BHI), Triple Sugar Iron Agar (TSIA), Urea, Simmons Citrate (SC), Sulfur Indole Motility (SIM), Mr Vp broth, dan media seri gula-gula (Glukosa, Laktosa, Maltosa, Mannitol, dan Sukrosa).

d. Sampel

Sampel yang digunakan adalah larutan ekstrak etanol daun jambu biji dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%, dan stok bakteri *Shigella dysenteriae*.

4. Cara Kerja

a. Persiapan dan Determinasi Daun Jambu Biji

Daun jambu biji berasal dari daerah desa Bumimas, Batanghari, Lampung Timur. Daun jambu biji selanjutnya dideterminasi di Laboratorium Botani Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Lampung untuk memastikan kebenaran dari tanaman yang digunakan.

b. Pembuatan Simplisia

- 1) Pohon jambu biji yang digunakan sebanyak 15 pohon. Daun jambu biji dipetik pada kondisi yang masih segar, dengan kriteria daun dari kelima dari ujung tangkai daun muda berukuran panjang 11,3-13,6 cm dengan lebar 5,0-6,9 cm (Pengulangan 1 sebanyak 3,2 kg daun jambu biji, Pengulangan 2 sebanyak 3,2 kg daun jambu biji, Pengulangan 3 sebanyak 3,4 kg daun jambu biji)
- 2) Daun jambu biji dicuci dibawah air mengalir kemudian dipotong kecil-kecil.
- 3) Daun yang sudah dipotong selanjutnya dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C selama 24 jam (Pengulangan 1 sebanyak 1,2 kg daun jambu biji kering, Pengulangan 2 sebanyak 1,3 kg daun jambu biji kering, Pengulangan 3 sebanyak 1,4 kg daun jambu biji kering)
- 4) Daun jambu biji yang telah kering kemudian dihaluskan dan diayak supaya mendapatkan serbuk yang halus (saringan 80 mesh)
- 5) Serbuk daun jambu biji disimpan pada wadah yang tertutup rapat juga kering (kantong plastik dan ditempatkan pada toples)
- 6) Didapatkan serbuk simplisia pada pengulangan 1 sebanyak 550 gram, pengulangan 2 sebanyak 550 gram, dan pengulangan 3 sebanyak 550 gram.

c. Proses Pembuatan Ekstrak Menggunakan Metode Maserasi

- 1) Ditimbang serbuk daun jambu biji sebanyak 510 gram, dimasukkan ke dalam wadah maserasi.
- 2) Kemudian ditambahkan 4.438 ml etanol 70% sampai semua serbuk daun jambu biji terendam larutan etanol. Sehingga didapatkan perbandingan 1 : 7
- 3) Didiamkan selama 3 x 24 jam dan diaduk setiap harinya (Pukul 08.00 WIB, 12.00 WIB, dan 15.00 WIB)

- 4) Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring whatman 42 untuk memisahkan cairan etanol dengan ampasnya dan dihasilkan ekstrak cair.
 - 5) Hasil penyaringan ekstrak daun jambu biji kemudian menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental (Marjoni, 2016).
 - 6) Didapatkan hasil ekstrak kental pada pengulangan 1 sebanyak 18,879 gram, pengulangan 2 sebanyak 18,921 gram, dan pengulangan 3 sebanyak 19,060 gram.
- d. Sterilisasi Alat.
- Alat gelas yang digunakan dicuci dan dikeringkan sebelum dibungkus dengan kertas kopi. Disterilkan dengan panas kering dalam oven pada suhu 170°C selama 40 menit (Soemarno, 2000).
- e. Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA)
- Media Mueller Hinton Agar ditimbang sebanyak 14,25 gram (15 plate) dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dilarutkan menggunakan aquades sebanyak 375 ml, ditutup menggunakan kapas yang dilapisi dengan aluminium foil kemudian dipanaskan dengan hot plate sampai larut dengan ciri larutan menjadi jernih. Setelah media larut dilakukan sterilisasi media menggunakan autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atmosfer (Soemarno, 2000). Kemudian media MHA dituang ke dalam cawan petri yang sudah disterilkan dengan cara aseptik, dihomogenkan dengan membentuk angka delapan, dan didiamkan sampai media memadat. Jika media belum digunakan maka disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 2°-8°C.
- Dilakukan uji sterilitas media pada media yang digunakan dengan cara mengambil 5% batch media dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 2 hari. Jika lebih dari 2 koloni bakteri per cawan tumbuh dalam satu cawan atau lebih, seluruh batch media tidak boleh digunakan. (Siregar, 2018). Pada uji sterilitas, media ditumbuhi hanya 1 koloni yang artinya batch media dapat digunakan untuk uji daya hambat.
- f. Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*
- 1) Hari Pertama
- Dilakukan pengecatan Gram pada sampel bakteri *Shigella dysenteriae* didapatkan hasil bentuk basil berwarna merah susunan menyebar bersifat

gram negatif. Kemudian bakteri *Shigella dysenteriae* ditanam pada media SS agar, Mac Concey, EMB agar, dan Endo agar. Diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C (Lampiran 3).

2) Hari Kedua

Diamati pertumbuhan koloni bakteri tersangka (terpisah dan dalam goresan) pada media SS agar, Mac Concey, EMB agar, dan Endo agar. Dari koloni tersangka pada media SSA dilakukan pengecatan Gram didapatkan hasil bentuk basil berwarna merah susunan menyebar bersifat gram negatif. Kemudian ditanam pada media biokimia (TSIA, SC, Urea, SIM, MrVp) dan gula-gula (Glukosa, Laktosa, Maltosa, Mannitol, Sukrosa). Diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C (Lampiran 3).

3) Hari Ketiga

Diamati pertumbuhan bakteri yang telah tumbuh pada penanaman dihari kedua pada media biokimia (TSIA, SC, Urea, SIM, MrVp) dan gula-gula (Glukosa, Laktosa, Maltosa, Mannitol, Sukrosa). Dicocokkan hasil pengamatan dengan ciri identifikasi dari *Shigella dysenteriae* (Lampiran 3).

g. Pembuatan Suspensi Bakteri *Shigella dysentriae*.

Koloni bakteri disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 2 ml BHI cair, diinkubasi pada suhu 37°C selama 4 jam. Kemudian diukur tingkat kekeruhannya menggunakan alat turbidimeter. Apabila suspensi terlalu keruh maka ditambahkan dengan larutan NaCl 0,85% steril atau jika suspensi terlalu jernih maka ditambahkan dengan menggunakan koloni (Soemarno, 2020).

h. Pembuatan Larutan Uji

Tabel 3.2. Konsentrasi Pengenceran Ekstrak Daun Jambu Biji

Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Jambu Biji (%)	Berat ekstrak etanol daun jambu biji (gram)	Volume aquadest steril (ml)
10	0,2	2,0
20	0,4	2,0
30	0,6	2,0
40	0,8	2,0
50	1,0	2,0
60	1,2	2,0
70	1,4	2,0
80	1,6	2,0
90	1,8	2,0
100	2,0	2,0

i. Uji Daya Hambat

Menggunakan cara difusi cakram metode *Kirby Bauer*.

- 1) Menyiapkan media MHA yang sudah memadat.
- 2) Memasukkan swab steril kedalam suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* yang kekeruhannya telah diukur menggunakan turbidimeter. Kemudian diangkat lidi kapas dan diperas dengan menekan pada dinding tabung bagian dalam sambil memutar lidi kapas.
- 3) Kemudian dipulaskan pada permukaan media MHA hingga rata. Dibiarkan media yang sudah dipulas selama 5 menit agar suspensi meresap ke dalam media MHA.
- 4) Merendam *disk blank* pada tiap konsentrasi ekstrak etanol daun jambu biji selama 15 menit, kemudian diambil dengan pinset steril dan direkatkan dipermukaan media MHA dan jarak antar disk adalah 20 mm. Menggunakan pinset steril untuk menekan cakram sehingga cakram bersentuhan dengan permukaan media dengan baik.
- 5) Media MHA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Diameter zona hambat yang diukur dengan jangka sorong adalah daerah bening (tidak ada pertumbuhan bakteri) disekitar cakram.
- 7) Diameter zona hambat yang terbentuk merupakan kemampuan ekstrak daun jambu biji dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* (Soemarno, 2000). Dilakukan pada tiap pengulangan 1, 2, dan 3.

F. Pengolahan dan Analisis Data

1. Pengolahan Data

Data diperoleh dengan cara:

- a. Melakukan pengujian ekstrak etanol daun jambu biji (*Syzygium guajava* L.) pada konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.
- b. Data diameter zona hambat yang diperoleh disajikan dalam bentuk tabel.

2. Analisis Data

Setelah didapatkan data diameter zona hambat ekstrak etanol daun jambu biji (*Syzygium guajava* L.), dilakukan analisis data menggunakan *One Way ANOVA* pada aplikasi IBM SPSS 26. Uji *One Way ANOVA* dilakukan dengan tingkat

kepercayaan 95%, $\alpha = 0,05$ yang artinya jika nilai $p\text{-value} \leq 0,05$ maka setiap kelompok perlakuan memiliki hasil yang berbeda nyata secara statistik. Hasil uji *One Way ANOVA* disajikan dalam bentuk tabel. Setelah dilakukan analisis *One Way ANOVA*, apabila didapat hasil $p\text{-value} \leq 0,05$ maka analisis statistika dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) dan disajikan dalam bentuk tabel.