

BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN

4.1 Alat

Penelitian ini menggunakan alat yaitu perlengkapan maserasi, timbangan analitik, kurs, hot plate, desikator, labu alas bulat, labu bersumbat, cawan dangkal beralas datar, inkubator lumpang alu, rotary evaporator, aluminium foil, corong pisah, autoklaf, cawan petri, erlenmeyer, kapas berlemak, jarum ose, vortex, tabung reaksi, jangka sorong, kertas cakram, Spektrofotometri Uv-Vis, sentrifugator, tabung eppendorf, Bio Safety Cabinet (BSC), water bath, mikropipet, beaker glass, well plate, spatel, pinset, chamber.

4.2 Bahan

Bahan yang digunakan berupa jamur kancing (*Agaricus bisporus*) Toluena, kloroform, n-heksana, etanol, HCl pekat, pita logam Mg, HCl 1%, pereaksi Mayer, HCl 2 M, aquadest, air, FeCl₃ 1%, asam asetat glasial, benzena, amonia, metanol, asam asetat anhidrat, H₂SO₄ pekat, etanol 96%, etil asetat, alkohol, Mueller Hinton Agar (MHA), Mueller Hinton Broth (MHB), McFarland, NaCl fisiologi 0,9%, pelarut Dimetil sulfoksida (DMSO), Tetrasiklin, spiritus, pereaksi Dragendorf, Bakteri uji yang dipakai yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

4.3 Pengumpulan Bahan dan Determinasi

Bahan yang digunakan pada penelitian kali ini adalah jamur kancing (*Agaricus bisporus*) yang diperoleh dari daerah kecamatan Bumiayu kabupaten Brebes Jawa Tengah. Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Tumbuhan Herbarium Bandungense SITH ITB. Determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa tanaman tersebut sudah sesuai dengan tanaman yang akan diteliti.

4.4 Pembuatan simplisia

Pembuatan simplisia dilakukan sebagai berikut :

4.4.1 Sortasi basah

Pada sortasi basah ini dilakukan dengan pemilihan bahan hasil pengumpulan jamur kancing (*Agaricus bisporus*). Dilakukan pemisahan dari tanaman uji dengan tanah, rumput-rumput atau bagian lain yang masih menempel pada tanaman.

4.4.2 Pencucian

Pada pencucian ini berfungsi untuk membersihkan tanaman dari pengotor yang masih melekat pada jamur kancing (*Agaricus bisporus*)

4.4.3 Perajangan

Perajangan atau pemotongan bahan uji dilakukan untuk mengubah bentuk dari tanaman uji ke bentuk yang lebih kecil dan tipis agar saat proses pengeringan lebih mudah.

4.4.4 Pengeringan

Proses pengeringan jamur kancing (*Agaricus bisporus*) dilakukan menggunakan sinar matahari dan juga menggunakan oven pada suhu 40-50°C.

4.4.5 Sortasi kering

Pada sortasi kering dilakukan pemilihan tanaman uji yang sudah dikeringkan dengan memisahkan bahan yang rusak, bahan tidak layak dan bahan gosong.

4.5 Penyimpanan

Simplisia yang sudah kering disimpan dalam wadah yang sesuai dengan sifat dari kandungan zat aktifnya agar tidak mempengaruhi atau menyebabkan perubahan kimia dan kualitas mutu dari senyawa aktif tersebut.

4.6 Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia yaitu uji subjektif yang menentukan kandungan metabolit jamur kancing. Pengujian dilakukan pada uji ekstrak meliputi uji alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, kuinon dan steroid/triterpenoid.

4.6.1 Uji Alkaloid

Ambil ekstrak jamur kancing dan tambahkan 5 mL amonia, lalu masukan ke dalam mortir gerus hingga tercampur. Kemudian tambahkan kloroform sebanyak 20 mL dan gerus kembali dalam mortar hingga tercampur rata. Kocok campuran tersebut kemudian saring. Filtrat dimasukkan dengan asam klorida 2 N (1:10 v/v) hingga terbentuk endapan. Ambil endapan lalu bagi menjadi dua bagian dengan masing-masing endapan diberi pereaksi dragendorff dan mayer. Positif alkaloid apabila pada pereaksi dragendorf menghasilkan endapan yang berwarna merah tua, sedangkan pada pereaksi mayer menghasilkan endapan putih (Depkes RI, 1995).

4.6.2 Uji Flavonoid

Didihkan air sebanyak 100 mL, tambahkan sedikit ekstrak jamur kancing, kemudian diamkan selama 5 menit lalu saring. Masukan filtrat sebanyak 5 mL ke dalam serbuk magnesium, tambahkan asam klorida sebanyak 1 mL lalu kocok dengan kuat. Adanya senyawa flavonoid jika terdapat warna kuning hingga jingga saat ditambahkan H₂SO₄ dan warna hijau kecoklatan jika ditambahkan FeCl₃ (Depkes RI, 1995).

4.6.3 Uji Tanin

Tambahkan 50 mL air pada sedikit ekstrak lalu dididihkan selama 15 menit, kemudian dinginkan dan saring menggunakan kertas saring, ambil filtrat lalu tambahkan 1-2 tetes FeCl_3 1% sampai terbentuk warna biru tua untuk tanin palsu dan hijau kehitaman untuk tanin katekat, hal ini menunjukkan bahwa adanya golongan tanin (Depkes RI, 1995).

4.6.4 Uji Saponin

Masukkan ekstrak jamur kancing ke dalam tabung reaksi, tambahkan air panas sebanyak 10 mL, lalu dinginkan dan kocok kuat selama 10 detik. Kemudian diketahui ada atau tidaknya buih, terbentuknya buih setinggi 3 cm, jika penambahan satu tetes asam klorida 2N buih tidak hilang maka menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1995).

4.6.5 Steroid/ Triterpenoid

Tambahkan sebanyak 5 mL etanol pada Ekstrak jamur kancing, kemudian panaskan selama 25 menit, saring ketika masih hangat dan uapkan filtrat dalam penangas air sampai kering, sisanya ditambahkan kloroform hingga terbentuk lapisan. Keringkan lapisan kloroform pada plat tetes, masukan reagen Lieberman Bouchardat dan tambahkan 2-3 tetes H_2SO_4 . Maka akan terbentuk terpen dengan warna hijau sampai biru, sedangkan steroid berwarna merah (Depkes RI, 1995).

4.7 Pembuatan Ekstrak Etanol Jamur Kancing

Simplisia jamur kancing di ekstrak menggunakan metode maserasi. Metode ini digunakan karena beberapa pertimbangan diantaranya mudah dan sederhana dalam pengerjaannya. Pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% di ekstraksi dengan perbandingan 1:10 sampai sampel terendam, alasan menggunakan pelarut etanol dikarenakan etanol termasuk kedalam senyawa polar (mudah menguap) yang dikatakan baik untuk ekstrak. Maserasi disimpan pada tempat gelap yang terlindung dari cahaya dan ditutup menggunakan aluminium foil dilakukan selama 3x24 jam sambil sesekali diaduk agar semua bahan dan penyari tercampur rata, saring dan ambil maserat setiap 24 jam sekali kemudian pelarut etanol di ganti dengan etanol yang baru. Kemudian pekatkan maserat yang didapat dengan alat rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental (Marliani dkk., 2021)

4.8 Pembuatan Fraksi Jamur Kancing

Metode yang digunakan untuk memisahkan ekstrak jamur kancing (*Agaricus bisporus*) yaitu Ekstraksi Cair-Cair (ECC) dengan menggunakan pelarut 3 jenis yang berbeda kepolarannya secara terus-menerus seperti pelarut metanol : air, n-heksan dan etil asetat. Timbang ekstrak jamur kancing sebanyak 10 gram, larutkan dengan 90 mL metanol : air (2:8), kemudian saring.

Filtrat dimasukkan ke dalam corong pisah dan tambahkan 30 mL pelarut (n-heksan), kocok perlahan biarkan fraksi n-heksan terpisah. Pisahkan bagian n-heksan dan ulangi 3 kali sampai larutan jernih. Distilasi fraksional yang selanjutnya menggunakan pelarut etil asetat dengan prosedur yang sama seperti n-heksan. Setelah semuanya selesai dipekatkan filtrat menggunakan alat rotary evaporator sehingga diperoleh fraksi kental dengan berat yang konstan (Wahyudi V.A dkk., 2020).

4.9 Pengujian aktivitas antibakteri

4.9.1 Sterilisasi alat dan bahan

Sterilkan alat dan bahan yang akan digunakan dengan cara sterilisasi yang terdiri dari sterilisasi kering dengan menggunakan api langsung seperti jarum ose yang akan digunakan dan sterilisasi basah seperti tabung reaksi, tip mikropipet, cawan petri, Media MHA, MHB dengan suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf.

4.9.2 Pembuatan Media MHA dan MHB

Media Mueller Hinton Agar (MHA) sebanyak 38 gram dan media Mueller Hinton Broth (MHB) sebanyak 21 gram kemudian masing-masing dilarutkan dengan menggunakan aquades sebanyak 1 liter dan diaduk sampai homogen sambil dipanaskan sampai mendidih, setelah itu media dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 200 mL dan ditutup menggunakan kapas berlemak dan aluminium foil, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C pada tekanan 2 atm (CLSI, 2018).

4.9.3 Pembuatan Inokulum Bakteri

Kultur bakteri murni diregenerasi pada media agar padat miring. Selanjutnya 1 ose koloni bakteri ditambahkan ke dalam tabung berisi media Mueller Hinton Broth (MHB), tabung divorteks hingga homogen dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Sukmawati dkk., 2019).

4.9.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

Ambil 1 mL inokulum bakteri uji, suspensikan dalam tabung reaksi yang mengandung NaCl fisiologis 0,9% aduk hingga merata, kemudian ukur kekeruhan dengan standar 0,5 McFarland (10^8 CFU/mL) atau lakukan pengenceran sampai menghasilkan 0,08-0,10 absorbansinya dengan spektrofotometri sinar tampak pada panjang gelombang 625 nm (CLSI, 2018).

4.9.5 Pengujian Aktivitas Antibakteri dan KHM Dengan Metode Cakram Kertas

Dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi jamur kancing terhadap beberapa bakteri patogen yaitu *E.coli*, *S.aureus* dan MRSA. Sebanyak 2000 mg ekstrak dan

fraksi jamur kancing dilarutkan menggunakan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) sebanyak 5% sehingga didapatkan larutan induk dengan konsentrasi 200.000 µg/mL yang kemudian diencerkan sesuai dengan konsentrasi yang akan digunakan, Tuangkan 100 µL suspensi bakteri kemudian tambahkan media MHA dalam cawan hingga menutupi permukaan cawan, homogenkan dan biarkan media memadat. selanjutnya sebanyak 20 µL konsentrasi ekstrak, fraksi dan pembanding tetrasiklin diteteskan diatas cakram kertas yang disimpan diatas media. Lalu Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Lakukan pengamatan dengan mengukur zona hambat menggunakan jangka sorong pada daerah jernih di sekitar cakram kertas (CLSI, 2018).

4.9.6 Uji Bioautografi

Pada uji bioautografi dengan menggunakan hasil terbaik pada uji KHM sebagai sampel dicampurkan 15 ml medium Mueller Hinton Agar (MHA) dan 100 µL bakteri uji, lalu plat KLT ditotolkan ekstrak dan fraksi terbaik kemudian di elusi dalam chamber, plat KLT diletakkan pada cawan petri yang berisi media MHA dan bakteri uji diamkan selama 30 menit. Selanjutnya plat diangkat kembali dan cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengujian KLT-bioautografi dengan spot/noda akan membentuk zona bening pada lapisan luar media. Amati dengan menggunakan UV 254 nm dan 366 nm, ukur nilai Rf. Uji bioautografi dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa apa yang paling kuat pada aktivitas antibakteri (Sulistyani dan Narwanti, 2015).