

BAB IV. PROSEDUR PENELITIAN

4.1. Alat dan Bahan

4.1.1. Alat

Seperangkat alat refluks, *Rotary evaporator*, seperangkat alat ECC (corong pemisah, statif) , beaker glass, tabung reaksi, pipet, mikropipet, botol kaca, botol gelap, gelas ukur, batang pengaduk, spatel, erlenmeyer,tip mikro,bunsen. Peralatan lain yang digunakan yaitu plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, chamber, pipa kapiler, Autoklaf, grinder simplisia, inkubator, kawat ose, alumunium foil, vortex, kertas saring, pinset, cawan petri, Spektrofotometri UV-Vis.

4.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu sampel simplisia rambut jagung, bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*. Bahan lainnya n-heksan, etil asetat, etanol, HCl, Bismuth subnitrat, HgCl₂, KI, amil alkohol, NaOH, FeCl₃, Formaldehid, HCl, Asam sulfat pekat, Asam asetat anhidrat, Cakram kertas, Mueller Hinton Agar (MHA), Nutrient Agar (NA), NaCl 0,9%, larutan Mc Farland, klindamisin, DMSO, Pembanding kuersetin, AlCl₃, metanol.

4.2. Prosedur

4.2.1. Pengumpulan Bahan Rambut Jagung dan Determinasi

Rambut jagung diambil dari daerah Cibiru Hilir perkebunan jagung milik warga. Dengan kisaran rambut jagung yang berwarna kuning hingga kecoklatan dengan umur 2 - 3 bulan. Lalu dilakukan determinasi di Herbarium Bandungense (FIPIA) SITH ITB.

4.2.2. Pembuatan Simplisia Rambut Jagung

Dilakukan sortasi basah, yaitu menghilangkan kotoran - kotoran yang menempel pada rambut jagung seperti tanah dan kotoran lainnya. setelah itu dilakukan pencucian rambut jagung menggunakan air bersih yang mengalir. Rambut jagung tidak dilakukan perajangan karena bentuk rambut jagung yang berbentuk tipis dan memanjang. Setelah ditiriskan, rambut jagung dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 2x24 jam. Setelah kering, dilakukan sortasi kering agar rambut jagung benar – benar bebas dari kotoran. Lalu sampel simplisia rambut jagung dihaluskan dengan grinder simplisia.

4.2.3. Karakterisasi Simplisia

Adapun karakterisasi simplisia yang dilakukan yaitu makroskopik, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, susut pengeringan.

4.2.3.1. Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode azeotrop (Destilasi Toluena). Masukan 200mL toluen serta 2 mL air kedalam labu alas bulat lalu pasang rangkaian alat yaitu penampung dan pendingin, lalu masukan sampel sebanyak 2 g simplisia dan panaskan labu selama 15 menit. Atur penyulingan dengan kecepatan 2 tetes tiap detik hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikan kecepatan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluen jenuh air, lalu lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Lalu dinginkan tabung hingga suhu nya mencapai suhu ruang, baca volume air setelah air dan toluen memisah sempurna. Kadar air dihitung dalam % v/b (Farmakope Herbal Indonesia,2017).

4.2.3.2. Kadar Abu Total

Timbang 2 g - 3 g rambut jagung yang telah dihaluskan dan masukan ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan di tara, pijarkan perlahan hingga arang habis, dinginkan lalu timbang. Jika arang tidak kunjung habis, tambahkan air panas, aduk, saring menggunakan kertas saring bebas abu. Pijarkan kertas saring beserta sisa penyaringan dalam krus yang sama. Masukan filtrat ke dalam krus, uapkan dan pijarkan hingga bobot tetap. Kadar abu total dihitung terhadap berat bahan uji, dinyatakan dalam % b/b (Farmakope Indonesia Herbal, 2017)

4.2.3.3. Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh dari penetapan kadar abu total dididihkan dengan 25 mL asam klorida LP selama 5 menit kemudian saring dengan kertas saring bebas abu, dan cuci dengan air panas lalu dipijarkan di dalam krus hingga bobot yang tetap pada suhu 800 °C. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap berat bahan uji, dan dinyatakan dalam % b/b (Farmakope Indonesia Herbal, 2017).

4.2.3.4. Kadar Sari Larut Air

Timbang kurang lebih 5 g sampel rambut jagung, masukan ke dalam wadah bersumbat lalu tambahkan 100 mL air jenuh kloroform, kocok berkali – kali selama 6 jam, dan biarkan selama 18 jam. Lalu saring dan uapkan sebanyak 20 mL filtrat di cawan dangkal yang telah dipanaskan pada suhu 105 °C dan di tara, panaskan hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % larut air. (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

4.2.3.5. Kadar Sari Larut Etanol

Timbang kurang lebih 5 g serbuk yang telah dikeringkan di udara. Masukan ke dalam labu bersumbat, tambahkan 100 mL etanol P, kocok berkali-kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring cepat untuk menghindarkan penguapan etanol, uapkan 20 mL filtrat hingga kering dalam cawan penguap yang telah dipanaskan 105 °C dan di tara, panaskan sisa pada suhu 105 °C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam % sari larut etanol (Farmakope Herbal Indonesia, 2017).

4.2.3.6. Susut Pengeringan

Timbang sebanyak 2 g simplisia rambut jagung, masukan ke dalam alat *moisture balance*, lalu set waktu otomatis. Pengukuran dilakukan hingga hasil tertera pada layar, kemudian baca dan catat hasil yang didapatkan (Agoes,2012).

4.2.4. Penapisan Fitokimia

Adapun penapisan fitokimia yang dilakukan yaitu identifikasi golongan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin, steroid/triterpenoid.

4.2.4.1. Identifikasi Golongan Alkaloid

Simplisia rambut jagung sebanyak 0,5 g ditambahkan 5 mL amonia 25 % dan 20 mL kloroform lalu digerus di dalam mortir, setelah itu disaring dan filtrat dibagi dua. Filtrat pertama diberi 2 tetes pereaksi dragendorff , hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan orange-coklat. Filtrat kedua diberi 2 tetes pereaksi mayer yang berisi KI dan HgCl₃, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan putih yang jika ditambahkan dengan alkohol endapan akan larut (Farnsworth,1966).

4.2.4.2. Identifikasi Golongan Flavonoid

Satu gram sampel rambut jagung dipanaskan selama 5 menit dengan menambahkan 100 mL air panas, lalu disaring dan diambil filtratnya. Ambil 5 mL filtrat lalu ditambahkan dengan serbuk magnesium, dan 2 ml HCl dan alkohol (1:1) , lalu ditambahkan 10 mL amil alkohol. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna jingga, merah, kuning pada lapisan amil alkohol (Farnsworth, 1966).

4.2.4.3. Identifikasi Golongan Saponin

Simplisia rambut jagung sebanyak 0,5 g ditambahkan 10 mL air panas, dan biarkan dingin. Lalu kocok selama 10 detik, jika terbentuk busa yang stabil selama 10 menit >1 cm dan setelah

ditambahkan 1 tetes HCl 2N busanya tidak hilang, berarti positif adanya senyawa saponin (Farnsworth,1966).

4.2.4.4. Identifikasi Golongan Kuinon

Serbuk rambut jagung sebanyak 1 g, ditambahkan 100 mL air lalu dipanaskan selama 5 menit, saring dan diambil filtratnya. 5 mL filtrat ditambahkan dengan NaOH, hasil positif ditandai dengan perubahan warna menjadi merah (Djamil&Anelia,2009).

4.2.4.5. Identifikasi Golongan Tanin

Sebanyak 1 g sampel rambut jagung ditambahkan 100 ml air lalu dipanaskan selama 5 menit, saring lalu ambil filtratnya. Ambil filtrat dan masukan ke dalam 3 tabung reaksi dengan volume masing-masing 5 mL. Tabung pertama ditambahkan FeCl₃, hasil positif ditandai dengan terbentuknya perubahan warna menjadi hijau sampai hitam. Tabung kedua ditambahkan larutan gelatin, terbentuknya endapan putih menunjukkan hasil positif mengandung tanin. Pada tabung ketiga ditambahkan pereaksi steasny yang berisi (Formaldehid-HCL (1:2)), lalu dipanaskan di penangas air. Lalu saring untuk memisahkan endapan. Filtrat yang diperoleh kemudian dijenuhkan dengan natrium asetat dan ditambahkan beberapa tetes FeCl₃. Terbentuknya warna biru tua menunjukkan bahwa hasil positif adanya tanin galat (Farnsworth,1966).

4.2.4.6. Identifikasi Golongan Steroid/Triterpenoid

Sampel rambut jagung sebanyak 1 g dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, lalu disaring dan diambil filtratnya. Filtrat diambil sebanyak 5 mL lalu diuapkan, lalu residu ditambahkan dengan pereaksi *Lieberman-Burchard* (Asam asetat anhidrat:Asam sulfat pekat (2:1)). Jika terjadi perubahan warna dari merah hingga ungu berarti positif adanya triterpenoid, jika terjadi perubahan warna dari biru hingga hijau berarti positif adanya steroid (Djamil&Anelia,2009).

4.2.5. Ekstraksi dan Fraksinasi Rambut Jagung

Ekstraksi menggunakan metode refluks menggunakan pelarut etanol 96%. Sebanyak 200 g serbuk simplisia rambut jagung direfluks selama 2 jam sebanyak 3 kali menggunakan pelarut etanol 96%. Filtrat yang didapatkan di saring menggunakan kertas saring dan corong. Filtrat yang didapatkan kemudian dikentalkan menggunakan *rotary evaporator*. Lalu dilakukan fraksinasi dengan metode ECC (Ekstraksi Cair-Cair) menggunakan pelarut n-heksan, etil asetat, dan etanol. Sehingga akan didapatkan tiga fraksi yaitu fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi metanol air. Ketiga fraksi tersebut kemudian dipekatkan kemudian ekstrak dan fraksi pekat digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri.

4.2.6. Pemantauan Ekstrak dan Fraksi

Ekstrak dan fraksi rambut jagung yang didapat dipantau dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase diam silika gel 60 F₂₅₄, dengan fase gerak n-heksan : P-etil asetat (4:1). Ekstrak dan fraksi ditotolkan pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Lalu masukan plat KLT ke dalam chamber yang sebelumnya sudah dijenuhkan. Digunakan penampak bercak yang sesuai, dan diamati dibawah sinar ultraviolet (UV) dengan panjang gelombang (λ) 254 nm dan 366 nm (Farmakope Herbal Indonesia,2017).

4.2.7. Pembuatan Media

4.2.7.1. Mueller Hinton Agar

38 gram MHA dilarutkan dengan 1 liter aquades lalu dipanaskan hingga terbentuk larutan berwarna kekuningan dan jernih, setelah semuanya larut, media disterilkan menggunakan metode panas basah dengan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Hudaya dkk.,2014).

4.2.7.2. Nutrient Agar

23 gram NA dilarutkan dengan 1 liter aquades kemudian dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Kemudian media disterilkan menggunakan alat autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Hudaya dkk.,2014).

4.2.8. Peremajaan Kultur Murni Bakteri

Kultur murni dari bakteri *Propionibacterium acnes* dan *Staphylococcus epidermidis*, diinokulasikan pada media agar miring pada tabung reaksi, bakteri sebanyak 1 ose digoreskan secara aseptik, lalu inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Misna&Diana,2016).

4.2.9. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Mencampurkan NaCl fisiologis 0,9% dengan beberapa koloni bakteri yang diambil menggunakan ose steril lalu di homogenkan menggunakan vortex. Jumlah bakteri yang digunakan dan di campur dengan NaCl fisiologis 0,9% , kekeruhannya dibandingkan dengan larutan *Mc Farland* 0,5 yaitu sebanding dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL konsentrasi bakteri atau pengukuran menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm dengan absorbansi 0,08-0,13 (CLSI,2012).

4.2.10. Sterilisasi

Semua alat dan bahan yang digunakan untuk uji antibakteri disterilkan menggunakan metode panas basah yaitu dengan alat autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Untuk mensterilkan jarum ose, sterilisasi dapat dilakukan menggunakan api bunsen dengan cara melewatkkan alat pada api bunsen. Untuk alat lain yang tidak tahan panas dapat disterilkan dengan menyemprotkan alkohol 70% untuk mencegah adanya mikroorganisme asing (Misna&Diana,2016).

4.2.11. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Cakram Kertas

Suspensi bakteri uji yang sudah dibuat dituangkan kedalam cawan petri steril sebanyak 100-200 μL lalu ratakan, kemudian tuangkan media MHA kemudian ratakan hingga media dan suspensi bakteri menjadi homogen. Kemudian cakram kertas direndam pada larutan uji ekstrak dan fraksi rambut jagung yang telah dibuat dalam konsentrasi 20%, 15%, 10%, 5% dan pada kontrol positif dan negatif selama 15 menit. Setelah itu cakram kertas diletakan pada media MHA menggunakan pinset steril dan pastikan sudah tidak ada cairan yang menetes dari cakram kertas, lalu cakram kertas di tekan-tekan sedikit agar melekat. Kemudian inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Savitri dkk.,2018)

4.2.12. KLT Bioautografi

Dari ekstrak dan fraksi yang digunakan, sampel yang dipilih adalah sampel yang memiliki aktivitas antibakteri yang paling baik. Pengujian dilakukan dengan metode bioautografi kontak. Plat KLT hasil sampel yang terpilih di letakan diatas media yang telah memadat yang berasal dari 10 mL MHA dicampur dengan suspensi bakteri (*Mc Farland*) sebanyak 100 μL . Plat KLT diletakan selama 30 menit, hingga senyawa dalam sampel rambut jagung berdifusi ke dalam media agar. Setelah 30 menit, plat KLT diambil dari media dengan hati-hati, dan cawan petri ditutup kembali dengan rapat. Setelah itu diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37 °C selama 24 jam. Terdapat zona bening yang terbentuk pada letak bercak kromatogram, menunjukan adanya dugaan senyawa antibakteri. Setelah itu dilakukan pemantauan untuk mengetahui senyawa apakah yang terdapat pada kromatogram yang memiliki aktivitas antibakteri, menggunakan penampak bercak yang sesuai kemudian diamati dibawah sinar lampu UV 254 nm dan 366 nm (Effendi dan Hertiani,2012).

4.2.13. Penetapan Kadar Senyawa Flavonoid

4.2.13.1. Pembuatan Kurva Standar Kuersetin

25 mg baku standar kuersetin dilarutkan dalam 25 mL etanol. Larutan standar kuersetin dibuat beberapa konsentrasi yaitu 10 bpj, 20 bpj, 30 bpj, 40 bpj, dan 50 bpj. Pipet 1 mL dari tiap konsentrasi larutan kuersetin, lalu ditambahkan dengan AlCl_3 2% 1 mL. Lalu inkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. setelah satu jam ditentukan absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm (Aminah dkk.,2017).

4.2.13.2. Penetapan Kadar Flavonoid Dari Fraksi Rambut Jagung

Ekstrak dan fraksi rambut jagung sebanyak 5 mg, dilarutkan dengan 10 mL metanol. Di pipet 1 mL dari larutan tersebut dan ditambahkan dengan larutan AlCl_3 2% sebanyak 1 mL. Kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu kamar. Kemudian mengukur absorbansi dengan spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 420 nm. Dilakukan 3 kali replikasi untuk setiap analisis sehingga diperoleh nilai rata rata absorbansi (Ordon *et al.*, 2006)