

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian dengan jenis deskriptif kualitatif karena hanya diamati aktivitas antibakteri saja tanpa menentukan besarnya konsentrasi, penelitian ini dilakukan meliputi tahapan awal, tahapan pelaksanaan dan tahapan akhir. Tahapan awal meliputi persiapan bahan berupa simplisia jamur dewa, reagen-reagen pereaksi, eluen, pembiakan bakteri uji dan sterilisasi alat beserta media yang digunakan untuk pengujian.

Tahap pelaksanaan meliputi proses ekstraksi jamur dewa menggunakan pelarut n-heksan, pengujian organoleptis dari ekstrak yang dihasilkan yaitu mulai dari warna, bau, bentuk dan tekstur. Selanjutnya memasuki proses skrining fitokimia menggunakan reagen yang dapat memberikan perubahan warna sesuai dengan spesifikasinya, dari hasil skrinning selanjutnya adalah proses identifikasi senyawa terduga menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Pelaksanaan terakhir yaitu menguji aktivitas Antibakteri dari ekstrak n-heksan jamur dewa terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif dan bakteri *Eschericia coli* sebagai bakteri gram negatif menggunakan metode difusi cakram dengan menghitung diameter zona hambat disekitar kertas cakram (*paper disk*).

Tahap akhir yaitu analisa data dengan menjabarkan hasil yang diperoleh dan membandingkan dengan literatur. Kemudian, dapat ditarik suatu kesimpulan dan hasil akhir yaitu apakah ekstrak n-heksan jamur dewa memiliki aktivitas antibakteriterhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif dan bakteri *Eschericia coli* sebagai bakteri gram negatif.

3.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah ekstrak jamur dewa dan yang berfungsi sebagai sampel adalah aktivitas ekstrak n-heksan jamur dewa terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Maret 2019 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Farmakognosi Putra Indonesia Malang.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksan jamur dewa terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif dan bakteri *Eschericia coli* sebagai bakteri gram negatif.

Tabel 3.1 Definisi Operasional

Variabel Penelitian	Definisi	Hasil Ukur	Alat Ukur	Skala Ukur
Aktivitas Antibakteri dari ekstrak n-heksan jamur dewa terhadap bakteri <i>S. aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i>	Kemampuan menghambat atau membunuh bakteri melalui konsentrasi suatu senyawa yang dapat memberikan efek bagi bakteri seperti terhadap bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .	Diameter zona hambat atau zona jernih yang terbentuk pada daerah sekitar kertas cakram (<i>paper disk</i>).	Jangka sorong	Nominal

3.5 Pengumpulan Data

Metode pengumpulan data berdasarkan hasil penelitian secara langsung. Jenis data yang diperoleh berupa data primer hasil dari penelitian laboratorium dan data sekunder yang didapatkan dari berbagai sumber mulai dari jurnal, penelitian dan artikel *offline* hingga *online* yang memuat, menjelaskan, meneliti dan merangkum tentang segala hal mengenai kandungan serta pemanfaatan jamur dewa, pengujian reaksi tabung, metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan metode pengujian aktivitas antibakteri ekstrak jamur dewa.

3.5.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, cawan penguap, reflux, heating mantel, kaki tiga, kasa asbes, pembakar spirtus, batang pengaduk, chamber, gelas ukur, oven, loyang, penggaris, pipet, pipa kapiler, spray, cawan petri, kuvet, spektrofotometer, blue tip, jangka sorong, beaker glass, erlenmeyer, kawat ose, timbangan analitik, autoclave dan botol semprot.

3.5.2 Bahan

Ekstrak jamur dewa, kalium hidroksida (KOH) 0,3 N, asam klorida pekat HCl_(p), natrium hidroksida (NaOH) 0,1N, pereaksi Liebermann-Burchard, asetat anhidrat, asam sulfat pekat (H₂SO₄), kloroform, etanol, fase diam berupa plat KLT silica gel 60 F₂₅₄, fase gerak berupa n-heksana dan etil asetat, reagen penampak noda spesifik Liebermann-burchard, alkohol 70%, dimetil sulfoksida (DMSO),

natrium klorida fisiologis (NaCl) 0,9%, media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), media *Manitol Salt Agar* (MSA), bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

3.5.3 Prosedur Kerja

3.5.3.1 Prosedur Ekstraksi

Prosedur ekstraksi yang digunakan menggunakan metode maserasi dengan prosedur sebagai berikut (Muharni, 2017).

1. Memasukkan 250 gram simplisia jamur dewa dalam botol coklat, ditambahkan dengan pelarut n-heksan dengan perbandingan 1:4. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dan sesekali diaduk.
2. Memekatkan ekstrak yang didapatkan menggunakan *rotary evaporator*.
3. Mengering anginkan ekstrak pekat yang diperoleh pada suhu ruangan sampai diperoleh ekstrak kental.

3.5.3.2 Prosedur Pengujian Reaksi Tabung

Mekukan pengujian reaksi tabung menggunakan metode reaksi warna dengan prosedur sebagai berikut (Putu, et al 2017).

A. Triterpenoid atau Steroid

1. Menguapkan sebanyak 2 mL larutan uji dalam cawan penguap.
2. Melarutkan residu dengan 0,5 mL kloroform, dipindahkan ke tabung reaksi.
3. Ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung.
4. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya **triterpenoid**, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya **steroid**.

B. Antrakuinon

1. Memasukkan 2 mL larutan uji ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 sebagai kontrol dan tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N tanda positif **antrakuinon** terbentuk larutan berwarna merah.

C. Saponin

1. Menambahkan 5 mL aquadest padan 2 mL larutan uji, kocok, lihat adanya busa yang stabil, berarti positif mengandung **saponin**.

3.5.3.3 Prosedur Identifikasi Senyawa Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Proses identifikasi senyawa terpenoid dengan prosedur sebagai berikut (Dwisari, 2016).

1. Menyapkan fase diam berupa plat KLT silica gel 60 F₂₅₄, dipotong sesuai dengan kebutuhan.
2. Meletakkan plat pada loyang dan di oven dengan suhu 105⁰C selama 30 menit.
3. Menyiapkan dua jenis fase gerak atau eluen yang berbeda. Eluen pertama yaitu n-heksan dan etil asetat dengan perbandingan (2:8). Eluen kedua yaitu kloroform : methanol dengan perbandingan (9:1).
4. Menjenuhkan eluen dalam chamber menggunakan kertas saring.
5. Menotolksn ekstrak pada plat dan ditunggu hingga kering.
6. Memasukkan plat dalam chamber yang telah berisi eluen jenuh dan dilakukan proses eluasi hingga batas atas.
7. Mengangkat plat dan dikeringkan.
8. Menyemprot plat dengan reagen penampak noda spesifik Asam sulfat- vanillin dan Liebermann Burchard.
9. Mengamati plat dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan 365 nm.

3.5.3.4 Prosedur Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak N-Heksan Jamur Dewa Dengan Metode Difusi Cakram

A. Pembuatan Media

1. Menimbang media EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*) dan MSA (*Manitol Salt Agar*) sesuai dengan etiket yang tertera dan dilarutkan dalam akuades, campuran dipanaskan hingga larut sempurna, lalu disterilkan dengan autoklaf.

B. Peremajaan Bakteri Uji

1. Meremajakan bakteri uji pada media miring EMBA dan MRSA. Bakteri uji diinokulasikan sebanyak satu ose kedalam media dan diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Peremajaan dilakukan dalam kondisi steril didalam *Laminar Air Flow (LAF)*.

C. Pembuatan Suspensi Bakteri

1. Mengambil satu ose bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* yang telah diremajakan kemudian disuspensikan kedalam larutan NaCl fisiologis 0,9%, setelah itu dihomogenkan. Keduanya dilakukan dalam dua erlenemyer yang berbeda.
2. Mengukur suspensi yang telah dibuat dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm hingga didapat %T 25, sesuai dengan standart *Mc Farland*.

D. Pembuatan Larutan Induk Uji Ekstrak N-heksan Jamur Dewa.

1. Menimbang sebanyak 0,02 gram ekstrak n-heksan jamur dewa.
2. Melarutkan dalam 0.1 mL DMSO (Dimetil Sulfoksida).

E. Pengujian Aktivitas Antibakteri Dari Ekstrak N-Heksan Jamur Dewa.

1. Menuang media EMBA dan MSA secara aseptis sebanyak 15 mL kedalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Dichelupkan kapas lidi steril kedalam suspensi bakteri uji, kemudian dioleskan ke permukaan medium sampai rata.
2. Meletakkan secara aseptis kertas cakram (*paper disk*) yang telah dicelupkandengan larutan induk uji ekstrak pada permukaan medium).
3. Menginkubasi pada suhu 37⁰C selama 18-24 jam.
4. Melakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona hambat disekitar kertas cakram (*paper disk*) menggunakan jangka sorong.

3.5 Analisis Data

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh data primer berupa nilai SD dan KV dari hasil perhitungan diameter zona hambat yang terbentuk serta data sekunder berupadata pengujian organoleptis berupa warna, bau bentuk dan tekstur dari ekstrak yang dihasilkan. Selanjutnya data akan disajikan dalam bentuk table beserta keterangan gambar.