

III. METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan Februari 2011 sampai bulan November 2011 di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung. Analisis struktur dengan spektrofotometri *Fourier Transform Infra Red* dilakukan di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung.

B. Alat dan Bahan

1. Alat-alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah: alat-alat gelas, pengguncang orbital (*orbital shaker*) Wiggen Houser 05-150, jarum ose, pinset, pipet Ependrof, inkubator CO₂ Memmert-Germany, otoklaf Hitachi CF 16RX II, alat *laminar air flow* ESCO/AVC4A1, alat sentrifugasi Hitachi/CF-46RX, penguap putar vakum Buchii/R205, lampu UV kohler/SN402006, seperangkat alat kromatografi lapis tipis, seperangkat alat kromatografi kolom, seperangkat alat Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) Varian 940-LC dengan Detektor ELS Varian 385-LC, spektrofotometer *fourier transform infrared* (FTIR) Varian/Scimittar 2000.

2. Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah: isolat murni *actinomyces* AnLd-2b-3 yang terdapat di Laboratorium Biomassa Universitas Lampung, ekstrak ragi, bubuk agar, tepung pati, *Tryptic Soy Broth* (TSB), *nutrient agar* (NA), pepton, dektrosa, kloramfenikol, sikloheksamida, asam nalidixat, bismut nitrat, asam tartarat, kalium iodida, pereaksi serium sulfat, natrium hidroksida, asam klorida, berbagai macam pelarut p.a yang berasal dari J.T Beaker antarlain: etanol, n-heksana, diklorometana, metanol, silika gel 60 Merck(0,063-0,200 mm), plat KLT silika gel 60 F₂₅₄, bakteri gram negatif (*Escherichia coli*), dan bakteri gram positif (*Staphylococcus aureus*).

C. Prosedur Penelitian

1. Pembuatan media perkembangbiakan *Actinomyces*

i. Pembuatan media *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Tiga puluh sembilan gram TSB dilarutkan dalam 1 L air laut steril kemudian di sterilkan. Campuran yang dihasilkan disebut media TSB (Magarvey *et al.*, 2004).

ii. Pembuatan media M1

Sepuluh gram pati, 4 gram ekstrak ragi, 2 gram pepton dilarutkan dalam 1 L air laut steril kemudian di sterilkan. Campuran yang dihasilkan disebut media M1 (Magarvey *et al.*, 2004).

2. Produksi senyawa metabolit sekunder (Magarvey *et al.*, 2004)

Isolat murni *actinomycetes* AnLd-2b-3 telah dibiakkan di dalam tabung gelas yang berisi 175 mL media TSB sambil diguncang dengan pengguncang orbital pada suhu 25⁰C dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari. Hasil inkubasi dipindahkan ke dalam botol yang berisi 5 L media M1 dan diinkubasi kembali selama 21 hari. Biakan yang dihasilkan dipisahkan dengan menggunakan alat sentrifugasi pada suhu 4⁰C, kecepatan 6500 rpm, selama 15 menit hingga diperoleh filtrat dan biomasnya. Masing-masing filtrat dan biomass ini dimaserasi selama 1 hari dengan pelarut DCM:MeOH (1:1). Maserat diekstraksi dengan menggunakan corong pisah. Maserat dari keduanya masing-masing diuji dengan metode KLT untuk melihat pola kromatogramnya apabila menunjukkan pola yang sama maka kedua maserat digabung dan selanjutnya maserat tersebut kemudian diuapkan dengan menggunakan penguap putar vakum. Ekstrak pekat ini dianalisis menggunakan metode KLT menggunakan larutan pengembang DCM:MeOH dengan berbagai perbandingan, hingga diperoleh komposisi eluen terbaik yaitu yang memberikan pola pemisahan terbaik. Komposisi larutan ini akan digunakan sebagai eluen dalam pemurnian ekstrak dengan metode kromatografi kolom. Kromatogram hasil KLT yang dihasilkan diamati dengan lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, diidentifikasi menggunakan pereaksi CeSO₄ untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang ada pada ekstrak pekat tersebut dan pereaksi Dragendroff untuk mengetahui keberadaan senyawa alkaloid.

3. Fraksinasi senyawa metabolit sekunder menggunakan metode kromatografi kolom

Fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom bertujuan untuk mendapatkan senyawa alkaloid murni dari ekstrak hasil maserasi. Ekstrak DCM:MeOH pekat diimpregnasi menggunakan pelarut metanol ke dalam silika impreg dengan perbandingan sampel:silika yaitu 1:2 dan elusi dilakukan secara elusi landaian menggunakan pelarut yang tepat menghasilkan fraksi-fraksi. Fraksi-fraksi hasil pemisahan dianalisis kembali dengan metode KLT menggunakan pereaksi CeSO_4 dan Dragendoff. Fraksi yang memiliki kromatogram sama digabung menjadi satu dan selanjutnya direfraksinasi sampai diperoleh komponen yang murni.

4. Analisis dengan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT)

Kromatografi cair kinerja tinggi pada penelitian ini digunakan untuk mengetahui tingkat kemurnian dari fraksi yang mengandung alkaloid hasil pemisahan kolom kromatografi. Sampel sebanyak 5 μL dimasukkan ke dalam botol vial kemudian diletakkan dalam rak yang selanjutnya akan diinjeksi. Fasa diam yang digunakan adalah kolom C_{18} dengan panjang 125 mm yang berdiameter 4,6 mm dan fasa gerak yang dipakai adalah metanol-air (90:10). Detektor yang digunakan adalah *Evaporative Light Scatter Detector* (ELSD) yang merupakan detektor universal dengan suhu evaporasi 30 $^{\circ}\text{C}$, suhu nebulizer 40 $^{\circ}\text{C}$, laju alir sebesar 1,0 mL/menit, laju gas nitrogen 1,6 L/menit.

5. Identifikasi senyawa menggunakan spektroskopi *Frouier Transform Infra Red* (FTIR)

Analisis FTIR bertujuan untuk memperhatikan karakteristik serapan gugus fungsi dari fraksi murni yang mengandung senyawa alkaloid. Caranya, senyawa digerus bersama KBr hingga homogen, kemudian dikempa hingga menjadi pelet KBr. Pelet tersebut diidentifikasi menggunakan spektrofotometer FTIR

6. Pengujian antibakteri

Uji antibakteri senyawa isolate dilakukan terhadap pertumbuhan bakteri (*S. aureus* dan *E. coli*) dengan teknik difusi yaitu dengan meletakkan silinder (cincin) besi tahan karat berukuran diameter 6 mm pada medium NA yang telah diinokulasikan bakteri (*S. aureus* dan *E. coli*). Caranya 10 mL media NA dituang ke dalam cawan petri yang sudah disterilkan, lalu dipadatkan sebagai lapisan pertama. Kemudian media NA cair yang telah diinokulasi bakteri uji dituang di atas media NA yang telah padat, lalu diratakan dan dibiarkan memadat, kemudian diletakkan silinder (cincin) besi tahan karat yang telah steril. Ekstrak senyawa alkaloid dengan konsentrasi 5000 bpj, kloramfenikol (kontrol positif) dengan konsentrasi 100 bpj dan metanol (kontrol negatifnya) dimasukkan ke dalam cincin yang berbeda sebanyak 50 μ L. Inkubasi dilakukan selama \pm 24 jam dan diamati diameter zona hambat yang dihasilkan dari senyawa alkaloid, kloramfenikol dan metanol.