

### III. METODE PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan Desember 2011 di Laboratorium Biomasa Universitas Lampung.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah inkubator CO<sub>2</sub> *Memmert-Germany/INC-02*, *orbital shaker Wiggen Hauser/OS150*, *autoclave kleinfield-Germany/HV-L25*, *centrifuge Hitachi/CF-16RX II*, *laminar air flow ESCO/AVC4A1*, mikroskop *Illuminating System Zeiss Axio A10*, jarum ose, pinset, kaca preparat, *cover-slip*, lampu spritus, mikropipet, oven, timbangan, penguap putar vakum *Buchii/R205*, *multivapor Buchii P-12*, lampu UV *kohler/SN402006*, seperangkat alat KLT dan kromatografi kolom, KCKT *Varian 940-LC* dengan kolom C<sub>18</sub>, Spektroskopi FT-IR *Varian-2000/Scimitar Series*, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium meliputi gelas piala, labu Erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, dan corong pisah.

Bahan-bahan yang digunakan adalah sampel isolat *actinomycetes* koleksi Laboratorium Biomasa Universitas Lampung, air laut, akuades, DPPH, bismut nitrat, kalium iodida, asam tartarat, serum sulfat, asam sulfat, ninhidrin,

etanol, pepton, dekstrosa, *Tryptic Soy Broth* (TSB), ekstrak malt, ekstrak ragi, agar, pati, sikloheksimida, asam nalidiksamat, diklorometana, metanol, *trifluoro acetic acid* (TFA), asetonitril, kloroform, resin Amberlit XAD-4, C<sub>18</sub> granulat, plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, dan plat KLT C<sub>18</sub>.

## C. Prosedur penelitian

### 1. Identifikasi Isolat *Actinomyces*

Isolat *actinomyces* diamati secara makroskopik dan mikroskopik. Secara makroskopik, pengamatan dilakukan terhadap keberadaan miselium substrat dan udara, warna isolat, dan bentuk permukaan isolat di media agar. Untuk pengamatan secara mikroskopik, preparasi dilakukan dengan cara menanamkan *cover-slip* pada media (*International Streptomyces Project-2*) (ISP-2), dengan kemiringan 45°, yang sudah ditumbuhi isolat *actinomyces* (Williams *et al.*, 1989). setelah ditanam selama 3 hari, *cover-slip* diambil dan diamati menggunakan mikroskop.

### 2. Kultivasi dan Ekstraksi

Metode kultivasi yang digunakan mengacu pada metode kultivasi Magarvey *et al.* (2004). Isolat *actinomyces* dibiakkan dalam 5 mL media TSB. Biakan tersebut diinkubasi sambil diguncang menggunakan *orbital shaker* pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari. Bibit kultur tersebut kemudian dibiakkan dalam 100 mL media M1 dan diinkubasi sambil diguncang kembali pada *orbital shaker* selama 21 hari. Biakan hasil inkubasi tersebut diekstraksi dengan 200 mL campuran pelarut diklorometana-metanol

(DCM-MeOH) (1:2) sebanyak dua kali. Hasil ekstraksi kemudian dipekatkan menggunakan penguap putar vakum. Ekstrak kasar tersebut digunakan untuk analisis dereplikasi isolat *actinomycetes* dan penapisan antioksidan.

### **3. Uji Dereplikasi Isolat *Actinomycetes***

Analisis dereplikasi isolat *actinomycetes* dilakukan dengan menggunakan spektroskopi FTIR dengan membandingkan karakteristik serapan tiap isolat di daerah sidik jari (Zhao *et al.*, 2004).

### **4. Penapisan Antioksidan**

Penapisan antioksidan dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang digunakan Mohammad *et al.* (2004). Penapisan antioksidan dilakukan secara kualitatif menggunakan Uji KLT. Sampel dielusi dengan menggunakan fasa diam silika dan fasa gerak campuran pelarut diklorometana-metanol. Hasil elusi divisualisasi dengan pereaksi DPPH. Identifikasi golongan senyawa antioksidan dilakukan dengan menggunakan pereaksi Dragendorff, ninhidrin, dan serium sulfat. Pereaksi Dragendorff dan ninhidrin digunakan untuk mengidentifikasi alkaloid, sedangkan serium sulfat untuk mengidentifikasi senyawa organik secara umum.

Uji aktivitas antioksidan juga dilakukan secara kuantitatif menggunakan *microplate reader*. Ekstrak kasar isolat *actinomycetes* kering ( $\pm 2$  mg) dilarutkan dalam metanol sehingga diperoleh kadar 2000 ppm. Sampel dimasukkan ke dalam *plate 96-well* sebanyak 100  $\mu$ l dan ditambah dengan 100  $\mu$ l larutan DPPH 0,2 mM dalam metanol. Blanko yang digunakan adalah

metanol. Sampel dan blanko yang sudah ditambahkan larutan DPPH diinkubasi di ruang gelap pada suhu kamar selama 30 menit lalu diukur pada panjang gelombang 492 nm menggunakan *microplate reader*. Reaksi positif akan memberikan perubahan warna DPPH dari ungu menjadi kuning. Persentasi peredaman radikal DPPH oleh senyawa antioksidan dihitung berdasarkan persamaan

$$\% \text{ Peredaman} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{test}}}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

Di mana  $A_{\text{blank}}$  merupakan absorbansi blanko dan  $A_{\text{test}}$  merupakan absorbansi ekstrak sampel (Prakash, *et. al.*, 2001).

## 5. Pengkayaan Isolat *Actinomyces* dan Ekstraksi

Isolat yang memiliki aktivitas antioksidan paling besar dikultivasi dalam skala yang lebih besar menggunakan 12 L media M1. Endapan hasil kultivasi kemudian diekstraksi dengan pelarut methanol, sedangkan filtrat dilewatkan pada kolom menggunakan resin XAD-4 kemudian dielusi dengan metanol. Masing-masing ekstrak dari endapan dan filtrat dipekatkan menggunakan penguap putar vakum. Kedua ekstrak kasar tersebut diuji menggunakan DPPH untuk membandingkan aktivitas antioksidan kedua ekstrak. Ekstrak dengan aktivitas antioksidan lebih besar digunakan dalam tahap pemurnian senyawa antioksidan selanjutnya.

## **6. Pemurnian Senyawa Antioksidan**

Proses pemurnian senyawa antioksidan target meliputi beberapa teknik kromatografi, yaitu kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, dan kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Komposisi fasa gerak yang memberikan hasil pemisahan terbaik dari hasil KLT digunakan untuk pemisahan menggunakan kromatografi kolom. Fraksi-fraksi hasil pemisahan ini dimurnikan lebih lanjut menggunakan KCKT dengan detektor *photodiode array* (PDA).

## **7. Karakterisasi Senyawa Antioksidan**

Senyawa antioksidan yang telah dimurnikan selanjutnya dikarakterisasi dengan metode spektroskopi FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam senyawa.