

## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biokimia dan Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, selama lebih kurang empat bulan.

### 3.2 Alat dan Bahan Penelitian

#### 3.2.1 Alat – alat yang digunakan

Alat – alat yang akan digunakan yakni *Autoclave All America* model 1925/KY-23D, Spektrofotometer Genesis II Keluaran Milton Roy Co; USA (No. Catalog 4001/4), *vortex mixer* Genuie 2™ cat No. 12-82, *Laminar Air Flow* (ESCO Micro PTE Ltd), *Rotary Evaporator* Heidolph WB 2000, *Hot plate*, neraca analisis, oven dan alat-alat standar lainnya yang digunakan di laboratorium sesuai dengan prosedur kerja.

#### 3.2.2 Bahan – bahan yang digunakan

Bahan – bahan yang akan digunakan dalam penelitian ialah  $\alpha$ -aminoisobutirat (Aib), 4-metoksibenzaldehid, *Malt Extract Agar* (MEA), *Nutrient Broth* (NB), *Nutrient Agar* (NA), *Potato Dextro Agar* (PDA), aseton, glukosa, agar, asam sulfat, natrium sulfat anhidrat, natrium hidoksida, etil asetat, metanol, butanol, asam asetat glasial, plat KLT SiO<sub>2</sub> (porositas 60 Å, ukuran partikel 10-12µm), alkohol 70%, kertas cakram dan bahan kimia lain adalah proanalisis atau bahan preparatif sesuai prosedur kerja.

#### 3.2.3 Bahan – bahan hidup yang digunakan

Kultur *Gliocladium sp.* T.N.C73 (No. Koleksi LBKUR CC 3) koleksi Laboratorium Biokimia FMIPA Universitas Riau, bakteri gram negatif (*Pseudomonas syringae* Koleksi LIPI dan *Escherichia coli* No. Koleksi LBKUR CC 11), dan bakteri gram positif (*Bacillus subtilis* No. Koleksi LBKUR CC 10).

### 3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian aktivitas antibakteri peptaibol produksi *Gliocladium sp.* T.N.C73 merupakan penelitian laboratorium yang diusulkan sebagai penelitian dalam jangka waktu lebih kurang 3 bulan. Secara garis besar bagan alir penelitian ini digambarkan pada **Lampiran 1**.

Tahap pertama dari penelitian ini, yakni penentuan waktu produksi maksimum peptaibol dari *Gliocladium sp.* T.N.C73 pada sebuah media *Malt Extract Agar* (MEA) dengan atau tanpa penambahan  $\alpha$ -aminoisobutirat (Aib). Pengamatan waktu produksi peptaibol pada media dengan atau tanpa penambahan aib akan digunakan sebagai kontrol kedua produksi, selain identifikasi menggunakan reagen pendeteksi peptaibol. Pada produksi peptaibol dari *Gliocladium sp.* T.N.C73 diperoleh suatu ekstrak kasar. Ekstrak kasar ini diperoleh melalui ekstraksi dengan etil asetat, pengeringan dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat serta pelarutan kembali dengan metanol. Ekstrak dianalisis secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan menyemprotkan hasil KLT dengan reagen pendeteksi peptaibol yaitu larutan 0,5% 4-metoksibenzaldehid. Luas noda menjadi indikasi kuantitas peptaibol yang dihasilkan sehingga diperoleh waktu produksi maksimum.

Tahap kedua dilakukan dengan memproduksi peptaibol skala yang lebih besar pada waktu produksi maksimum yang telah diperoleh. Tahap ini dilakukan dengan mengisolasi peptaibol menggunakan KLT preparatif mengikuti metode yang dideskripsikan oleh Chuttrakul *et al.* (2008). Produksi dilakukan minimum sepuluh cawan petri untuk setiap produksi. Tahapan ekstraksi dengan etil asetat, pengeringan dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidrat serta pelarutan kembali dengan metanol untuk memperoleh ekstrak kasar dilakukan sama seperti tahap sebelumnya. Pada KLT preparatif, spot yang telah diidentifikasi mengandung peptaibol dikerik dan dilarutkan dengan metanol.

Tahap ketiga menjadi tahap terakhir dari penelitian ini, yakni menguji kemampuan menghambat peptaibol terhadap pertumbuhan bakteri. Metode yang digunakan yakni metode difusi agar terhadap bakteri gram positif (*Bacillus subtilis*), bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas syringae*).



### 3.4 Prosedur kerja

#### 3.4.1 Produksi peptaibol

##### 3.4.1.1 Persiapan dan peremajaan *Gliocladium sp. T.N.C73* pada media PDA

Prosedur pembuatan media *Potato Dextro Agar* (PDA) yakni kentang dikupas lalu dicuci dan diiris kecil – kecil lalu ditimbang sebanyak 40 gr. Rebus dengan menambahkan akuades sebanyak 100 ml selama 20 menit. Saring kentang lalu ambilnya filtratnya. Timbang agar batang sebanyak 3,4 gr dan glukosa sebanyak 4 gr. Masukkan agar dan glukosa kedalam filtrat. Tambahkan aquades hingga volume 200 ml. Panaskan filtrat hingga agar batang larut. Setelah larut, sterilisasi PDA dengan menggunakan *autoclave* selama 20 menit, tekanan 15 lb dan suhu 121<sup>0</sup>C. Setelah suhu PDA sekitar 25<sup>0</sup>C tambahkan asam sitrat 10% hingga membuat pH 5,5 – 6 atau konsentrasi asam sitrat menjadi 0,05%. Masukkan PDA ke dalam tabung reaksi sebanyak ±5 ml/tabung dan PDA dapat digunakan setelah 3 hari atau tidak terdapat kontaminasi.

Miselia jamur diambil dari biakan murni dengan menggunakan jarum ose yang telah disterilisasi dengan api dari lampu bunsen. Miselia dari jamur yang terdapat diujung jarum ose diinokulasi ke atas medium agar miring PDA. Penggoresan dilakukan sedemikian rupa, sehingga ujung ose hanya menyentuh tanpa melukai permukaan medium. Inokulasi dilakukan dalam ruang *laminar* untuk menghindari kontaminasi oleh bakteri atau mikroorganisme lainnya. Media yang sudah ditanami tersebut, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 5 hari.

##### 3.4.1.2 Persiapan media *Malt Extract Agar* (MEA)

Susunan nutrisi dari media produksi peptaibol dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. *Malt Extract Agar*

Bahan	Berat atau Volume
Akuades	100 ml
<i>Malt extract</i>	3 gr
Agar batang	2 gr
Pepton	0,3 gr
pH diatur menjadi 6,5 dengan 0,1N NaOH	6,5

---

Untuk media dengan Aib,  
ditambahkan Aib

---

5 mg

Pembuatan MEA dilakukan dengan mencampurkan akuades, *malt extract*, dan agar batang, sebelum memasukkan agar batang, atur pH hingga 6,5 dengan penambahan NaOH 0,1N. Setelah pH 6,5, baru campuran ditambahkan agar batang dan dipanaskan hingga agar batang larut. Campuran disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 20 menit pada tekanan 15 lb dan suhu 121<sup>0</sup>C. Media agar ini setelah *autoclave* didinginkan selama 1 jam dalam *water bath* bersuhu 50<sup>0</sup>C. Setelah dingin, tuang dalam kondisi steril ke cawan-cawan petri. 1 buah cawan petri memuat sekitar 30 mL media. Agar dibiarkan membeku di cawan petri, dan cawan petri dibalik, dibungkus kertas, dan dibiarkan selama 3 hari. Apabila setelah 3 hari agar di cawan petri masih jernih, media tersebut dinyatakan bebas kontaminasi, dan dapat digunakan.

#### 3.4.1.3 Inokulasi jamur pada media produksi peptaibol

Koloni *Gliocladium sp.* T.N.C73 yang tumbuh pada agar miring dibilas dengan akuades steril lalu digerus dengan jarum ose. Suspensi jamur disaring dengan *glass woll* yang telah disterilkan dalam wadah steril. Sebagian suspensi disimpan di kulkas suhu 8<sup>0</sup>C dan sebagian lagi diukur OD<sub>660nm</sub> untuk menentukan konsentrasi spora/ml. Suspensi jamur kemudian diinokulasi dengan metode penyebaran ke dalam masing-masing media MEA di cawan petri dengan atau tanpa asam amino isobutirat (aib) dengan volume sedemikian rupa sehingga jumlah spora setara dengan  $\sim 1 \times 10^8$ . Volume spora yang ditambahkan disetarakan untuk semua pengulangan. Sebar inokulum menggunakan batang L steril.

#### 3.4.1.4 Produksi peptaibol pada media produksi dengan atau tanpa asam amino isobutirat (aib)

Sebanyak  $1 \times 10^8$  spora disebar ke dalam 3% *Malt Extract Agar* (MEA) dengan atau tanpa penambahan 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$   $\alpha$ -aminoisobutirat (Aib), kemudian diinkubasi pada suhu kamar. Selama 21 hari miselia yang tumbuh dari satu cawan petri dipanen dengan interval 3 hari. Miselia dari jamur *Gliocladium sp.* T.N.C73

diekstraksi untuk memperoleh peptaibol dengan penambahan etil asetat dingin (5 mL/g basah miselia) dan di *shaker* selama 1 jam.

Proses pengocokkan diharapkan mempercepat proses ekstraksi, selanjutnya miselia disentrifugasi untuk memisahkan filtrat dari ekstraknya. Filtrat dikeringkan dengan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrat dan dievaporasi pada suhu kamar. Residu yang diperoleh dari proses evaporasi dilarutkan kembali dengan 1x berat basah miselia (mL/g) dalam metanol. Ekstrak kasar ini dapat disimpan pada suhu -20°C sebelum dipergunakan.

#### 3.4.1.5 Deteksi peptaibol dengan KLT

Ekstrak kasar dari miselia jamur *Gliocladium sp.* T.N.C73 dalam metanol dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada plat KLT SiO<sub>2</sub> dan digunakan butanol/asam asetat/air 60:20:20 (v/v/v) sebagai eluen. Ekstrak diambil secukupnya kemudian ditotolkan lebih kurang 1 cm dari bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler. Kemudian dibiarkan beberapa saat hingga pelarutnya menguap dan dimasukkan kedalam bejana pengembang (*chamber*). Setelah eluen naik sampai batas garis atas, plat dikeluarkan dan dikeringkan. Noda dideteksi dengan penyemprotan reagensia yakni larutan 0,5% 4-metoksibenzaldehid dalam larutan metanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/asam asetat 90:5:5 (v/v/v) dan dikeringkan pada suhu 110°C selama 20 menit. Indikator memperlihatkan keberadaan peptaibol dari ekstrak tersebut yakni dengan adanya noda berwarna merah terang kemudian dihitung nilai R<sub>f</sub> dari peptaibol tersebut. Pemaparan dengan sinar UV (254 nm) akan meningkatkan visualitas. Luas noda menjadi indikasi kwantitas peptaibol yang dihasilkan. Berdasarkan percobaan ini akan diperoleh hari optimum untuk produksi peptaibol, dan waktu terbaik untuk panen miselia guna peptaibol lebih lanjut.

#### 3.4.1.6 Isolasi peptaibol dengan KLT preparatif

Isolasi peptaibol dengan KLT preparatif dilakukan untuk memperoleh peptaibol yang bisa dianalisis lebih lanjut. Pada tahap isolasi, miselia jamur *Gliocladium sp.* T.N.C73 ditumbuhkan pada 3% *Malt Extract Agar* dengan penambahan 50 µg mL<sup>-1</sup> α-aminoisobutirat (Aib) serta dipanen pada waktu produksi maksimum. Panen dilakukan minimum sepuluh cawan petri untuk setiap produksi. Tahapan ekstraksi dengan etil asetat, pengeringan dengan Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> serta

pelarutan kembali dengan metanol untuk memperoleh ekstrak kasar dilakukan sama seperti tahap sebelumnya.

Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ditotolkan pada KLT  $\text{SiO}_2$  preparatif ukuran 20x20 cm, eluen yang digunakan butanol/asam asetat/air 60:20:20 (v/v/v). Noda pada pelat diperoleh dengan menyemprotkan reagensia 0,5% 4-metoksibenzaldehid dalam larutan metanol/ $\text{H}_2\text{SO}_4$ /asam asetat 90:5:5 (v/v/v) dan dikeringkan pada suhu  $110^\circ\text{C}$  selama 20 menit. Noda yang berwarna merah terang dicatat Rf nya. Lakukan penotolan lagi pada plat yang baru dan tanpa disemprot, kemudian daerah yang Rf nya sama dipisahkan dari KLT preparatif. Selanjutnya peptaibol dari  $\text{SiO}_2$  dielusi dengan 300  $\mu\text{L}$  metanol dan di *shaker* selama 1 jam pada suhu kamar. Filtrat dipisahkan dengan sentrifugasi selama 15 menit dan dapat disimpan pada suhu  $-20^\circ\text{C}$  sampai sebelum digunakan.

### 3.4.2 Tahap uji aktivitas antimikroba

#### 3.4.2.1 Persiapan dan peremajaan bakteri

Peremajaan bakteri bertujuan untuk meremajakan kembali bakteri dari agar miring ke dalam larutan *Nutrient Broth* (NB) untuk bakteri. Media NB yang telah dibuat sebanyak 30 ml diinokulasi 1 ose bakteri uji dalam kondisi aseptik dan *vortex* suspensi hingga homogen. Inokulasi selama 24 jam pada suhu  $\pm 37^\circ\text{C}$  untuk bakteri.

#### 3.4.2.2 Uji aktivitas antimikrobal dengan metode cakram

Isolat peptaibol yang telah diperoleh kemudian di uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar. Bakteri yang digunakan adalah *Bacillus subtilis* (bakteri gram positif) dan bakteri gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas syringae*). Semua perlakuan diulang sebanyak 3x dan hasil uji direkam dengan fotografi digital.

Uji aktivitas antibakteri dari isolat peptaibol yang terlarut dalam metanol dilakukan dengan volume 20 hingga 100  $\mu\text{L}$  pada kertas cakram 3 mm dan ditunggu hingga pelarutnya menguap. Pada uji ini yang bertindak sebagai kontrol adalah 100  $\mu\text{L}$  metanol. Kertas cakram yang pelarutnya telah menguap diletakkan pada cawan petri (volume media 20 ml) yang sudah diinokulasi bakteri uji. Selanjutnya, cawan disimpan selama semalam di lemari es untuk memberi

kesempatan peptaibol menyerap dalam agar. Cawan kemudian diinkubasi selama 1 hari pada suhu 37°C dalam inkubator dengan membalikkan cawan petri. Diameter daerah hambatan pertumbuhan bakteri (zona bening) diukur setelah diinkubasi selama 24 jam.

### 3.4.3 Analisis data

Data yang diperoleh di uji secara statistik menggunakan analisis *Uji Jarak Duncan* untuk mengetahui senyawa dan konsentrasi yang memberikan aktivitas terbaik. Data yang diperoleh dari uji parameter non spesifik akan disajikan secara deskriptif dalam bentuk tabel dan gambar.