

BAB 4. METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksploratif untuk mencari kandungan eponemycin pada isolat bakteri *Streptomyces hygroscopicus*, sehingga dapat mengetahui berapa konsentrasi senyawa eponemycin dalam isolat bakteri *Streptomyces hygroscopicus*.

4.2 Lokasi Penelitian

Pengembangan kultur dan identifikasi isolat bakteri *S.hygroscopicus*, dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB sedangkan ekstraksi bakteri *S.hygroscopicus* dilakukan di Laboratorium Farmakologi FKUB dan untuk melakukan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) guna identifikasi senyawa eponemycin dalam isolat *S.hygroscopicus* secara kualitatif dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Muhammadiyah Malang. *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)* guna mengetahui konsentrasi senyawa eponemycin dalam isolat bakteri *S.hygroscopicus* dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gajah Mada.

4.3 Waktu Penelitian

Waktu yang di butuhkan dalam penelitian ini untuk selama 3 bulan.

4.4 Bahan dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

4.4.1.1 Kultur Bakteri *S.hygroscopicus subspecies hygroscopicus*

Pengadaan Isolat Bakteri:

Isolat bakteri *S.hygroscopicus* subspecies *hygroscopicus* didapat dari bagian Mikrobiologi LIPI (LIPI-MC) Cibinong.

Pembuatan Medium Pertumbuhan Bakteri:

Untuk pembuatan 1 liter medium *International Streptomyces Project* (ISP) 4 dibutuhkan *soluble starch* 10g, K_2HPO_4 1g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, NaCl 1g, $(NH_4)_2SO_4$ 2g, $CaCO_3$ 2g, *trace salt solution* ($Fe_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0,1g, *distilled water*) 1ml, Agar 20g, *distilled water* 1 liter, dan penyesuain medium pada pH 7,0 - 7,4. Medium dibagi ke dalam gelas erlenmeyer sejumlah 50 ml dan 100 ml, kemudian dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit (Shepherd *et al*, 2010).

4.4.1.2 Ekstraksi bakteri *S.hygroscopicus* subspecies *hygroscopicus*

International Streptomyces Project (ISP) 4 starch, etil asetat 1 liter

4.4.1.3 Kromatografi Lapis Tipis

Methanol 50ml, anisaldehyde, eluent: Hexane : etil asetat (1:1), hexane : kloroform : methanol (5:5:2), kloroform : methanol (1:1), dan hexane : etil asetat (4:1).

4.4.1.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Standar *Dihydroepone mycin* 1 mg, Eluent : Dichloromethane : MeOH (98:2)

4.4.2 Instrumen Penelitian

4.4.2.1 Kultur Bakteri *S.hygroscopicus* subspecies *hygroscopicus*

Petridish, tabung erlen meiyer (50ml, 250 ml, 500ml, 1000ml),

4.4.2.2 Ekstraksi bakteri *S.hygroscopicus* subspecies *hygroscopicus*

Erlen meiyer 1000ml, corong pisah, gelas ukur, water bath, petridish

4.4.2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Plate Gel Silica, Chamber, kertas saring, pipa kapiler 5 μ l, UV 254nm dan UV 365 nm.

4.4.2.4 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kolom Resolve 5 μ L Silica 15cm, labu ukur, millex 0,45 μ m, conical 15mL mesin HPLC (kolom Resolve 5 μ L Silica 15cm, flow: 1,0 ml/min, dan Panjang gelombang 245nm).

4.5 Definisi Operasional

1. Bakteri *S.hygroscopicus* didapatkan dari LIPI-MC (LIPI *Microbial Collection*) Cibinong yang telah diidentifikasi.
2. Ekstraksi bakteri menggunakan metode maserasi dengan menggunakan etil asetat.
3. *Ubiquitin proteasome system* (UPS) merupakan jalur yang bertanggung jawab terhadap degradasi protein.
4. *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi senyawa dalam suatu bahan, dalam hal ini untuk mengetahui konsentrasi senyawa *eponemycin* dalam isolat *S.hygroscopicus*.
5. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode yang digunakan untuk menentukan suatu senyawa dalam bahan secara kualitatif berdasarkan pada nilai *Retardation factor* (Rf) dan Eluen yang digunakan.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Ekstraksi Metabolit bakteri *S.hygroscopicus* subspecies *hygroscopicus*

Inokulasi

Sejumlah $25,8 \times 10^6$ (dihitung dengan menggunakan spektrofotometri) bakteri diinokulasi dalam Erlenmeyer berisi 50 ml medium ISP4 dan didiamkan selama 7 hari dalam *shaking incubator* pada suhu 28°C (Sharma dan Parihar, 2010).

Fermentasi

Sejumlah 2 ml cairan inokulasi yang mengandung koloni bakteri dimasukkan dalam Erlenmeyer 50 ml dan didiamkan selama 7 hari dalam *shaking incubator* pada suhu 28°C (Sharma dan Parihar, 2010).

Ekstraksi Metabolit

Hasil fermentasi dicampur dengan etilasetat 1:5 (v/v) dan dikocok selama 1 jam, kemudian dibiarkan mengendap selama 4 jam dalam corong pisah. Metabolit bakteri akan terbawa pelarut ke atas pada fase etilasetat. Setelah itu, fase air dibuang dan ase pelarut (etilasetat). Ditampung. Selanjutnya, fase pelarut tersebut diuapkan dengan *waterbath* $80 - 90^{\circ}\text{C}$ sampai metabolit yang terbawa mengering dan berbentuk serbuk (Sharma dan Parihar, 2010).

4.6.2 Kromatografi Lapis Tipis Hasil Ekstraksi Metabolit

Hasil ekstraksi yang berupa serbuk dilarutkan dalam methanol. *Chamber* KLT dilapisi kertas saring pada sisi – sisinya. *Plate silica* dipotong 2×10 cm. Sampel yang digunakan ditotolkan pada kertas silica sebanyak $30 \mu\text{l}$ dengan pipa kapiler. Pengecekan kecukupan sampel dilakukan dengan melihat penampakan noda dibawah sinar UV 254 nm. *Eluent* yang dipilih dimasukkan ke dalam *chamber* lalu dimasukkan *plate silica* dengan keadaan tegak. Ditunggu sampai *eluent* tersebut terserap sampai batas atas. Dilakukan pembacaan di bawah sinar UV 254 nm. Untuk mendeteksi senyawa yang diinginkan dilakukan

penyemprotan dengan anisaldehyde lalu dipanaskan supaya tampak warnanya.

Pembacaan selanjutnya dilakukan dibawah sinar UV 365 nm (Sin *et al*, 1998).

4.6.3 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Kondisi HPLC

Kolom yang digunakan adalah kolom Resolve 5 μ L Silica 15 cm dengan eluen (dichloromethane : Methanol (MeOH) = 98:2) (v/v) dengan aliran 1,0 ml/menit dan panjang gelombang 245 nm.

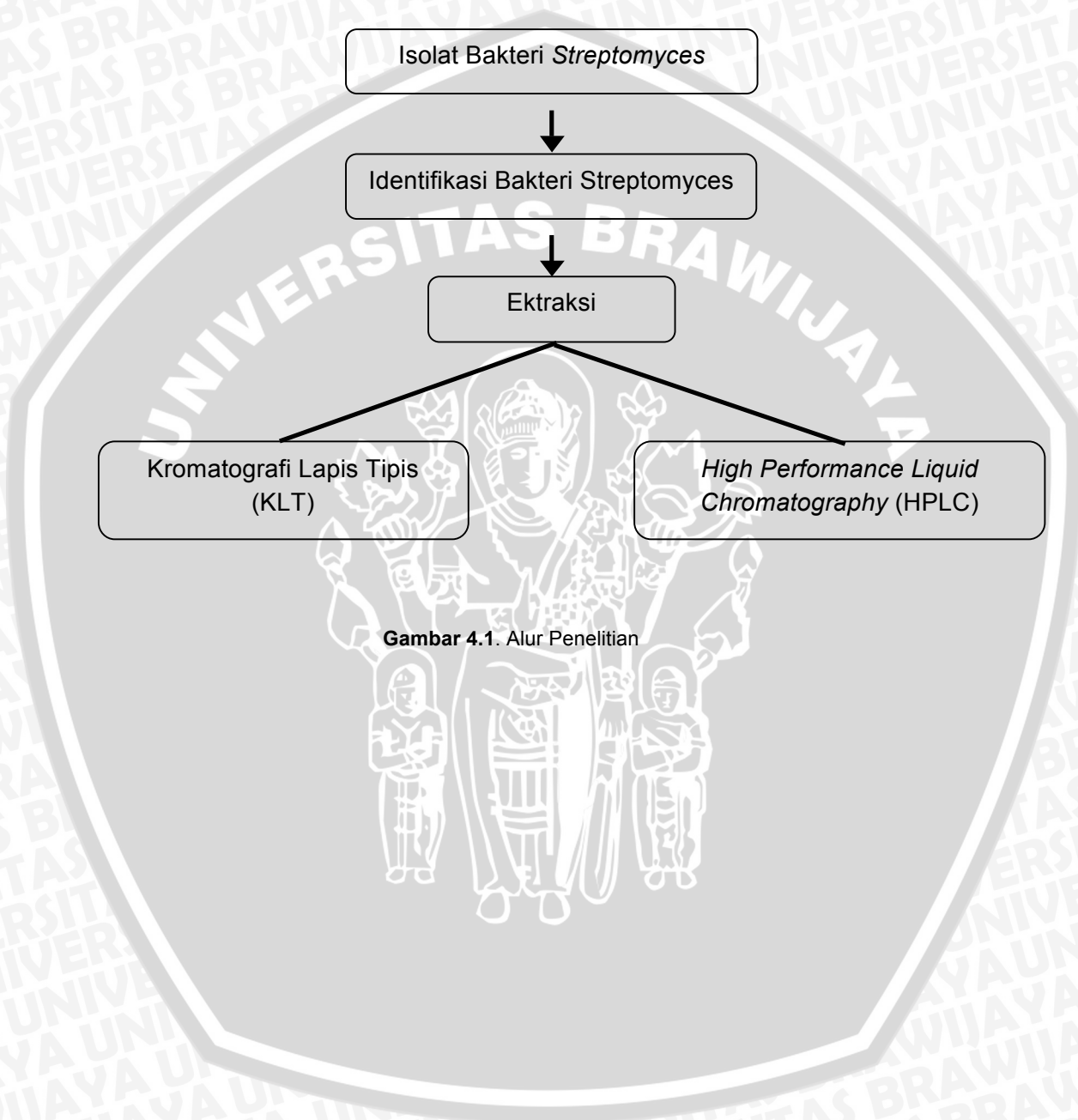
Preparasi Sampel

Sampel ekstraksi yang telah disiapkan ditimbang sejumlah 2,5 mg dan kemudian sampel yang telah ditimbang dimasukkan kedalam conical 15 mL. Tiga mL eluen yang telah disiapkan sebelumnya (dichloromethan : methanol = 98:2) (v/v) dtambahkan dan kemudian di ultrasonik selama 5 menit. Sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL dan kemudian di goyang hingga homogen, setelah homogen sampel yang telah dicampur dengan eluen di saring menggunakan millex 0,45 μ m dan kemudian diinjeksikan 20 μ L ke HPLC.

Preparasi Standar

Sejumlah 1 mg standar *dihydroeponemycin* ditimbang lalu dilarutkan dalam labu takar 5 mL dengan eluen 200ppm, dibuat larutan standar (diencerkan) dengan konsentrasi *dihydroeponemycin* : 6,25 ; 12,5 ; dan 25 ppm, setelah standar di encerkan dan di campurkan, kemudian diinjeksikan 20 μ L ke HPLC.

4.7 Alur Penelitian



Gambar 4.1. Alur Penelitian