

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan pada penelitian ini *Penicillium sp.* yang merupakan isolat dari daun mangrove hasil isolasi dari penelitian Firdaus *et. al.*, (2010), yang belum diuji secara biokimiawi. Isolat murni *Penicillium sp.* (ATCC 28089) berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang digunakan sebagai pembanding. Biakan murni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* berasal dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan untuk media pertumbuhan jamur adalah PDA (*Potatoes Dekstrose Agar*). Media yang digunakan pada proses fermentasi antara lain PDB (*Potatoes Dekstrose Broth*). Sedangkan untuk uji cakram bahan yang digunakan adalah media MHA (*Muller Hinton Agar*). Bahan pembantu yang digunakan antara lain kertas cakram (*paper disc*), *cotton swap*, kapas, tali, *cling wrap*, kertas label, tissue, aquades, etil asetat, spirtus, tusuk gigi,

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan pada tahap isolasi *Penicillium sp.* dan *Penicillium notatum* (ATCC 28089) antara lain silet, pisau, talenan, dan cawan petri. Pada saat pembuatan media dan proses sterilisasi digunakan autoklaf, cawan petri, spatula, gelas ukur, timbangan digital. Pada tahap ekstraksi alat yang digunakan yaitu cawan porselen, botol vial, beaker glass, erlenmeyer, cawan petri. Pada tahap fermentasi alat yang digunakan antara lain *waterbath shaker* merk inert, Erlenmeyer 250 ml. Pada tahap uji cakram alat yang digunakan anatara lain inkubator merk inert, jangka sorong.

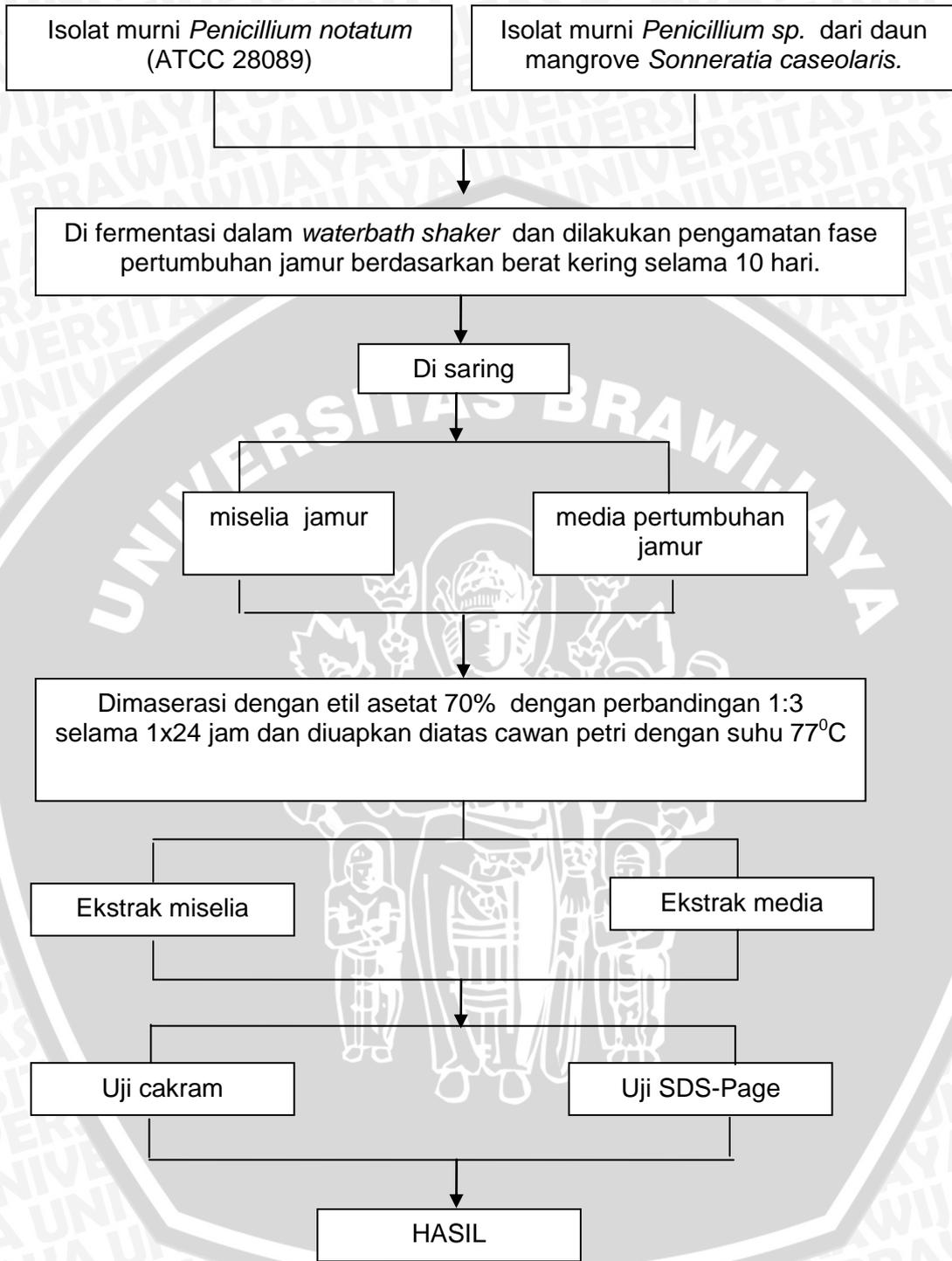
### 3.2 Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini menggunakan metode deskriptif untuk mencapai tujuan yang utama yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri jamur *Penicillium sp.* Isolat dari daun mangrove *Sonneratia caseolaris* dan Isolat murni *Penicillium notatum* (ATCC 28089). Metode deskriptif yaitu metode yang menggambarkan suatu keadaan atau kejadian. Dalam penggunaan metode ini memusatkan perhatian pada pemecahan masalah yang ada sekarang dengan jalan mengumpulkan data, menyusun, menganalisa dan menginterpretasikannya (Surakhmad, 1989). Tujuan dari penelitian deskriptif adalah untuk memberikan gambaran atau diskripsi yang sistematis, aktual dan akurat mengenai fakta, sifat serta hubungan antar fenomena yang diselidiki (Nasir, 1989).

### 3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian tentang aktivitas antibakteri *Penicillium sp.* isolat dari daun mangrove *S. caseolaris* terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* melalui beberapa tahapan antara lain:

- persiapan sampel
- proses Isolasi jamur *Penicillium sp.*
- proses fermentasi
- proses ekstraksi
- uji aktivitas antibakteri serta
- Uji SDS-Page. Diagram alur proses penelitian dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram Alur Kerangka Konsep Penelitian.

### 3.3.1 Persiapan sampel

Penelitian ini menggunakan sampel jamur endofit *Penicillium sp.* yang merupakan isolat hasil isolasi dari penelitian Firdaus *et. al.*, (2010). Adapun proses persiapan sampel adalah:

- a. Jamur hasil isolasi dari penelitian Firdaus *et. al.*, (2010). yang tumbuh pada media PDA menghasilkan berbagai jenis koloni jamur. Koloni-koloni jamur yang terbentuk dimurnikan lagi pada media PDA baru. Setelah proses pemurnian dilanjutkan dengan pengamatan koloni jamur yang terbentuk secara makroskopis dan mikroskopis.
- b. Pengamatan secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati warna, dan bentuk koloni. Sedangkan pengamatan mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop binokuler. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan setiap hari sampai tampak adanya konidia. Pembuatan preparat untuk pengamatan yang menggunakan mikroskop binokuler adalah sebagai berikut:
  - Media PDA yang baru dan dipotong menggunakan pisau yang steril
  - Dipotong media sebesar 1,5 cmx1,5cm dan diletakkan di atas obyek glass
  - Diambil Konidia atau spora dari biakan murni jamur menggunakan jamur ose
  - Inokulum jamur diletakkan di atas potongan media pada obyek glass
  - Cover glass ditutup dan diletakkan secara perlahan-lahan
  - Preparat tersebut diletakkan di atas tissue basah yang diletakkan di atas cawan petri dan di inkubasi selama 3-4 hari
  - Diamati morfologi jamur (bentuk dan ukuran hifa, konidia, spora) yang terbentuk diamati dengan menggunakan mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x

- Preparat jamur yang telah diidentifikasi dengan menggunakan buku identifikasi jamur.

Setelah dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis menggunakan mikroskop binokuler, diketahui terdapat beberapa jenis koloni jamur. Dari berbagai jenis koloni, diambil jamur jenis *Penicillium sp.* dan ditumbuhkan kembali pada media PDA baru dan di inkubasi selama 4 hari pada suhu 32°C yang bertujuan untuk mendapat koloni jamur yang murni. Isolat *Penicillium sp.* yang telah murni ditanam pada media miring 45° dan digunakan sebagai stok.

*Penicillium notatum* (ATCC 28089) isolat koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang di murnikan pada media PDA dalam cawan petri selama 5 hari pada suhu 32°C, bertujuan untuk menghasilkan koloni yang besar yang akan digunakan pada proses fermentasi.

### 3.3.2 Proses Fermentasi (Prihatiningtyas *et. al.*, 2006).

Pada proses fermentasi Isolat murni *Penicillium notatum* (ATCC 28089) dan *Penicillium sp.* isolat dari *Sonneratia caseolaris* dilakukan berdasarkan penelitian Prihatiningtyas *et. al.*,(2006). Isolat murni *P. notatum* (ATCC 28089) dan *Penicillium sp.* isolat dari *Sonneratia caseolaris* ditumbuhkan dalam media PDB (*Potatoes Dekstrose Broth*). Koloni jamur yang tumbuh pada medium PDA (*Potatoes Dekstrose Agar*), dipotong dengan ukuran 1,5x1,5 cm menggunakan pisau yang telah disteril menggunakan alkohol dan diinokulasikan dalam medium PDB (100ml) dalam erlenmeyer 250 ml yang telah ditutup dengan kapas agar medium tidak terkontaminasi. Selanjutnya medium fermentasi diinkubasi pada suhu 32°C dalam *waterbath shaker* 130 rpm bertujuan untuk meratakan pertumbuhan jamur dan dilakukan selama 10 hari. Selanjutnya setiap 24 jam

media PDB diambil 1 ml dan dimasukkan dalam tabung eppendorf ukuran 1,5 ml, dan disentrifuse dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu kamar ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dibuang, dan diambil adalah miselia fungi. Miselia yang didapatkan ditambahkan akuades 1 ml dan dilakukan sentrifuge kembali dengan kecepatan 6000 rpm pada suhu kamar ( $\pm 27^{\circ}\text{C}$ ) selama 10 menit untuk memisahkan miselia dengan supernatan. Adapun tujuan perlakuan ini adalah memisahkan media dan miselia yang kemungkinan masih tertinggal, yang kemungkinan mempengaruhi berat sel kering pada saat proses pengovenan.

Miselial jamur yang telah didapatkan, dioven selama 24 jam pada suhu  $100^{\circ}\text{C}$  untuk memperoleh berat sel kering. Penambahan berat kering miselia selama proses fermentasi menunjukkan pertumbuhan jamur, sehingga dapat dibuat kurva pertumbuhan jamur.

### **3.3.3 Proses Ekstraksi (Pambayun *et. al.*, 2009; Prihatiningtyas *et. al.*, 2006).**

Media fermentasi jamur yang telah diinkubasi selama 10 hari dilakukan proses penyaringan antara media pertumbuhan jamur dan miselia jamur menggunakan kertas saring. Media pertumbuhan jamur dan miselia yang dimaserasi dengan etil asetat (teknis) dengan perbandingan 1:3. Maserasi merupakan proses perendaman dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruang. Setelah larutan tercampur, kemudian didiamkan dalam suhu ruang selama 24 jam untuk melepaskan senyawa bioaktif terbebas dari miselia dan media. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat ditampung dalam Erlenmeyer 100 ml. Ampas hasil penyaringan dimaserasi ulang selama 24 jam lagi dan disaring dengan kertas saring, ulangan dilakukan sampai tiga kali.

Ekstrak etil asetat yang didapatkan dihilangkan pelarut etil asetat pada saat proses maserasi dengan cara penguapan dalam cawan petri pada suhu ruang selama 2 hari. Ekstrak miselia dan media pertumbuhan dipergunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

### 3.3.4 Uji Aktivitas Antibakteri

#### 3.3.4.1 Preparasi Bakteri

Biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri yang akan digunakan untuk setiap kali uji antibakteri harus diregenerasi terlebih dahulu. Langkah pertama yang dilakukan pada saat preparasi bakteri adalah membuat biakan pada agar miring dengan cara menggoreskan biakan dari stok bakteri ke media *Nutrient Agar* (NA) yang masih baru dengan kemiringan media 45°. Bakteri yang telah digoreskan pada media *Nutrient Agar* (NA), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Langkah selanjutnya adalah membuat suspensi biakan uji dengan cara mengambil 2-3 ose biakan murni dan dimasukkan dalam Na-fis steril, kemudian divortex selama 5 menit. Suspensi biakan diukur dengan kepadatan bakteri sebesar 10<sup>8</sup> dengan menggunakan standart Mc.Farland. Kepadatan bakteri sebesar 10<sup>8</sup> merupakan jumlah minimum bakteri yang dapat dihambat oleh suatu bioaktif.

#### 3.3.4.2 Uji cakram (Kirby-Bauer, 1966)

Ekstrak jamur endofit selanjutnya digunakan sebagai sampel untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer (1966). Pengertian metode ini adalah pengujian antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang

sudah mengandung bahan antibakteri dari suatu sampel sesuai dengan konsentrasi perlakuan.

Pengujian ini dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif dan *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif. Tahap-tahap uji cakram menggunakan metode Kirby-Bauer (1966) adalah proses sterilisasi alat, pembuatan media dan pelaksanaan uji cakram. Tahapan pertama pada proses uji cakram adalah dilakukan proses sterilisasi alat pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15-20 menit dengan menggunakan autoklaf. Media yang digunakan untuk pertumbuhan mikroba antara lain *Potatoes Dekstrose Agar* (PDA), *Potatoes Dekstrose Broth* (PDB) dan *Muller Hilton Agar* (MHA). Komposisi media dan prosedur pembuatan sebagai berikut:

a. **PDA (*Potatoes Dekstrose Agar*) (Haniah, 2008).**

**Tabel 2. Komposisi media PDA**

Komposisi	Jumlah (gr)
Ekstrak kentang	4
Glukosa	20
Agar	15

**Sumber: Label media PDA**

**Prosedur pembuatan:**

- Ditimbang 39 gram media PDA dan dimasukkan Erlenmeyer
- Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 L dalam erlenmeyer.
- Dimasukkan erlenmeyer yang berisi media dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit.
- Erlenmeyer yang berisi media sesekali digoyang untuk membantu agar larutan menjadi homogen selama pemanasan dalam waterbath
- Media PDA yang digunakan pada proses pemurnian ditambahkan 250 mg Streptomycin yang dilarutkan dalam 10 ml Na-fis.

- Media PDA yang sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer, selanjutnya media tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media yang telah di sterilkan dituang dalam cawan petri dan diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media.
- Media yang melewati uji sterilisasi media sudah siap untuk digunakan.

**b. PDB (*Potatoes Dekstrose Broth*) (Haniah, 2008).**

**Tabel 3. Komposisi media PDB**

Komposisi	Jumlah (gr)
Ekstrak kentang	4
Dextrosa	20

**Sumber: Label media PDB**

**Prosedur pembuatan:**

- Ditimbang 24 gram media PDB dan dimasukkan erlenmeyer
- Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 L dalam erlenmeyer.
- Dimasukkan erlenmeyer yang berisi media dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit.
- Erlenmeyer yang berisi media sesekali digoyang untuk membantu agar larutan menjadi homogen selama pemanasan dalam waterbath
- Media yang sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer, selanjutnya media tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media yang telah di sterilkan dituang dalam erlenmeyer 250 ml dan diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media
- Media yang melewati uji sterilisasi media sudah siap untuk digunakan.

c. **Muller Hilton Agar (MHA) (Haniah, 2008)**

**Tabel 5. Komposisi media MHA**

Komposisi	Jumlah (gr)
Casein hidrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	13
Infusion from meat	2,0

**Sumber: Label media MHA**

**Cara Pembuatan:**

- Ditimbang 34 gram media MHA dan dimasukkan erlenmeyer
- Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 L
- Dimasukkan dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit.
- Erlenmeyer sesekali digoyang untuk membantu agar larutan menjadi homogen selama pemanasan dalam waterbath.
- Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer, media tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media yang sudah steril diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media.
- Media yang melewati uji sterilisasi media sudah siap untuk digunakan.

Tahap pelaksanaan uji cakram metode Kirby-Bauer (1966) adalah sebagai berikut:

- Lempeng agar MHA pada cawan petri ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji.
- Kapas Lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji dengan kepadatan  $10^8$ , kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung. Tujuan dari perlakuan ini agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.

- Mikroorganisme yang akan diuji disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Kapas lidi dioleskan secara mendatar. Tujuan dari perlakuan ini untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata. Lempeng agar diputar  $90^{\circ}$  dan dibuat olesan kedua dengan memutar lempeng agar sebesar  $45^{\circ}$ , selanjutnya dibuat olesan ketiga pada lempeng agar.
- Lempeng agar dibiarkan mengering selama  $\pm 5$  menit, kemudian kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel, ditempelkan pada permukaan lempeng agar.
- Dalam 1 lempeng 3 macam ulangan dan 1 kontrol, jarak antara kertas cakram harus cukup luas. Tujuan dari perlakuan ini agar wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat.
- Kertas cakram ditekan menggunakan pinset, tidak terlalu keras dikarenakan akan merusak permukaan agar.
- Lempeng yang sudah ditempel kertas cakram diinkubasi pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  agar dapat ditumbuhi bakteri yang sedang diujikan.
- Bakteri uji yang tumbuh merata, akan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar dan dilakukan pengukuran diameter luas zona jernih menggunakan jangka sorong.

Dari hasil pengukuran zona bening yang tampak disekitar kertas cakram inilah yang selanjutnya dapat diketahui apakah ekstrak miselia dan media pertumbuhan jamur efektif, intermediet atau tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

### 3.3.5 Uji SDS-Page (Bradford, 1976).

Protein dapat dipisahkan dari satu gugus dari gugus yang lain oleh elektroforesis berdasarkan tanda dan jumlah muatan listrik pada gugus R dan gugus termal asam amino dan terminal karboksil yang bermuatan. Seperti peptida sederhana, rantai polipeptida protein mempunyai titik isoelektrik yang khas, yang akan mencerminkan jumlah relatif gugus R asam dan basa (Lehninger, 1982). Kecepatan migrasi protein dalam medan listrik tergantung pada kekuatan medan listrik, muatan protein, dan koefisien gesekan (Stryer, 2000).

Tujuan dari pengujian SDS-Page ini berdasarkan penelitian Sugito *et al.* (1997), bahwa mikroorganisme dapat bersifat antagonis terhadap mikroorganisme lain karena menghasilkan antibiotik, bakteriosin, siderofor, lisozim, protease, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atau asam organik sehingga pH pada media tumbuh tersebut berubah. Pengujian SDS-PAGE bertujuan untuk mengetahui berat molekul dari ekstrak miselia dan ekstrak media *Penicillium sp.* isolat dari *S. Caseolaris* serta ekstrak miselia dan ekstrak media *Penicillium notatum* (ATCC 28089). Dari sampel-sampel tersebut, dilakukan pengujian dari keseluruhan berat molekul protein sampel. Berat molekul yang telah diketahui dicocokkan dengan berat molekul senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif inilah yang selanjutnya diduga sebagai senyawa yang mengandung komponen bioaktif dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Prosedur pengujian analisa elektroforesis SDS Page adalah sebagai berikut:

- Dibuat 2 jenis lapis gel. Lapisan gel pertama yaitu media pemisah protein (*separating gel* 3%) dan gel kedua digunakan sebagai pengumpul sampel (*stacking gel*) dengan prosentase bahan 12,5%.
- Dituang *separating gel* ke dalam *plate* yang terbuat dari kaca, dan pembentukan gel menggunakan pipet (dijaga jangan sampai terbentuk

gelembung udara) sampai tiga perempat tinggi *plate*. Air dituangkan secara perlahan di atas larutan gel. Adapaun tujuan dari penuangan ini adalah agar permukaan gel tidak bergelombang.

- Ditunggu hingga 30 menit dan gel akan memadat dan air yang menutup *separating gel* dibuang. Selanjutnya dilakukan proses pembuatan *stacking gel*. Bahan yang telah disiapkan dimasukkan dalam erlenmeyer. Selanjutnya, dituangkan larutan kedalam *plate* pembentuk gel menggunakan pipet sampai *plate* penuh.
- Diselipkan secara perlahan sisir pembentuk sumur sampel kedalam *stacking gel* setelah proses penuangan. Setelah 30 menit, gel akan memadat dan dilanjutkan proses pengangkatan sisir .
- Sampel ekstrak dari miselia dan ekstrak media *Penicillium sp.* isolat dari *S. Caseolaris* serta ekstrak miselia dan ekstrak media *Penicillium notatum* (ATCC 28089) dipanaskan 100°C selama 5 menit.
- Dimasukkan sampel dalam sumuran gel yang telah disiapkan sebelumnya, menggunakan pipet ukuran per sumuran adalah 18µL. Voltase yang digunakan pada saat *running* 120 V, dengan waktu selama 90 menit.
- Diwarnai sumuran dengan menggunakan bahan RSB dengan perbandingan 1:1, sedangkan *Marker* yang digunakan adalah *marker pro-stain* Gel diangkat dari chamber.
- Di rendam dalam *staining solution* selama 30 menit dan *dishaker*, setelah proses perendaman gel diangkat dihentikan pewarnaan dengan *staining solution*.

Dari hasil pewarnaan akan terdapat pita-pita protein yang muncul. Selanjutnya dilakukan penghitungan band yang muncul. Pita-pita protein yang tampak diukur jarak pergerakan masing-masing protein standar (*marker*)

menggunakan penggaris ukuran 30 cm. Selanjutnya dicatat nilai  $R_f$ -nya. Nilai  $R_f$  merupakan perbandingan antara jarak pergerakan pita dari tempat awal dengan jarak pergerakan warna dari tempat warna. Dilanjutkan dengan proses pembuatan kurva kalibrasi berat molekul, nilai  $R_f$  yang ditempatkan sebagai sumbu Y dan berat molekul yang biasanya dinyatakan sebagai fungsi dari log berat molekul ditempatkan sebagai sumbu X. Grafik yang didapatkan berupa grafik linier dengan persamaan garis  $y=a+bx$ . Dari rumus di atas maka dapat dihitung berat molekul ekstrak miselia dan ekstrak media *Penicillium sp* dan *Penicillium notatum*.

