

## BAB IV

### METODOLOGI PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian : Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Biologi, FMIPA,

Universitas Diponegoro Semarang

Laboratorium Kimia, Jurusan Kimia, FMIPA,

Universitas Diponegoro Semarang

Waktu penelitian : Mei - Agustus 1997

#### B. Bahan dan Alat

##### B.1. Bahan :

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah biakan murni *A. flavus* hasil isolasi, daun tapak dara (*C. roseus*), media taoge ekstrak cair, media taoge ekstrak agar, media agar Czapek Dox (Merck), HCl 0,1 N, NaOH 0,1 N, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, pelarut heksan teknis, asam asetat 5 % (CH<sub>3</sub>COOH), amonium hidroksida 96 % (NH<sub>4</sub>OH), reagen Dragendorff, reagen Mayer, kloroform teknis dan p.a., eter teknis, metanol teknis, etanol p.a., 100 ppm chloramfenicol, silika gel F 254, aquades, laktofenol, aluminium foil, larutan tween 80.

## B.2. Alat-alat :

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian adalah erlenmeyer, tabung reaksi dan rak tabung, lumpang porselin, timbangan analitik, timbangan Sartorius, mikrometer okuler dan obyektif, inkubator, autoklaf, haemositometer, pipet tetes, pipet ukur, gelas ukur, gelas beker, perkolator, "rotary evaporator", corong pisah, kertas saring, kapas, corong, oven, "colony counter", pembakar bunsen, kertas pH, enkas.

## C. Cara Kerja :

### C.1. Pembuatan Media Taoge Ekstrak Cair dan Agar

Seratus gram taoge direbus dengan aquades sebanyak 1000 ml sampai mendidih selama  $\pm$  2 jam rebusan taoge kemudian disaring dan ditambah dengan gula pasir atau sukrosa sebanyak 60 gram. Selanjutnya rebusan taoge tadi direbus kembali sehingga semua gula larut sedangkan aquades yang hilang karena pemanasan supaya diganti sehingga volumenya kembali seperti semula. Kemudian media yang telah jadi dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 1 atm (suhu 121 °C) selama 15 menit. Dilakukan pengukuran pH sehingga didapatkan pH asam (5 - 6). Untuk pembuatan media taoge ekstrak agar dengan menambahkan agar sebanyak 15 - 20 gram dalam setiap 1000 ml media taoge ekstrak cair. (Sriani dkk, 1991)

## C.2. Pembuatan Media Agar Czapek Dox

Agar Czapek Dox sebanyak 48 gr dilarutkan dalam 1000 ml aquades, dididihkan sampai semua bahan larut. Disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Diukur pHnya sampai dengan 7 (Anonim,1994).

## C.3. Pembuatan Reagen Penguji Alkaloid

### 1. Reagen Mayer

Dalam erlenmeyer 100 ml dilarutkan raksa (II) klorida sebanyak 1,36 gr dan pada erlenmeyer lainnya dilarutkan 5 gr kalium iodida (KI) dalam aquades sebanyak 10 ml. Setelah kedua larutan tersebut dicampur, kemudian diencerkan dengan aquades sampai volumenya menjadi 100 ml . Kemudian reagen ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat (Harborne, 1987).

### 2. Reagen Dragendorff

Dalam erlenmeyer 100 ml dilarutkan 0,6 gr bismutsubnitrat dalam 2 ml HCl pekat dan aquades sebanyak 10 ml. Pada erlenmeyer lainnya dilarutkan kalium iodida (KI) sebanyak 6 gr dalam 10 ml aquades. Kedua larutan ini dicampur dengan 7 ml HCl pekat dan 15 ml aquades. Kemudian reagen ini disimpan dalam botol yang berwarna coklat (Harborne, 1987)

#### C.4. Pembuatan Ekstrak Alkaloid Daun Tapak Dara (*C. roseus*) Dan Pengujian Adanya Alkaoid

##### 1. Pembuatan Ekstrak Alkaloid Daun Tapak Dara (*C. roseus*)

Daun tapak dara dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil, dikeringanginkan lalu ditumbuk halus, dikeringkan kembali sampai berat serbuk relatif tidak berubah. Kemudian serbuk dimasukkan ke dalam perkolator dan direndam dengan pelarut heksan selama 3 x 24 jam selanjutnya perkolat diturunkan melalui kran perkolator. Perkolasi dihentikan bila perkolat terakhir tidak berwarna, ekstrak heksan digabung lalu diuapkan pelarutnya dengan menggunakan "rotary evaporator". Residu dari hasil ekstraksi dengan pelarut heksan selanjutnya diperkolasi dengan metanol selama 3 x 24 jam sampai perkolat terakhir memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid. Perkolat digabung dan diuapkan dengan memakai "rotary evaporator" hingga dihasilkan cairan kental. Ekstrak metanol kental dimasukkan ke dalam gelas beker 1 liter, sambil diaduk ditambahkan asam asetat 5% hingga pH larutan mencapai pH 3 - 4. Penambahan larutan asam diulangi beberapa kali sampai larutan memberikan hasil negatif terhadap reagen penguji alkaloid. Lapisan asam yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong pisah, dikocok dengan eter beberapa kali hingga fraksi eter yang terakhir tidak berwarna (fraksi non alkaloid). Selanjutnya lapisan asam dibasakan dengan amonium hidroksida 96%,

sambil dikocok berulang-ulang dengan kloroform sampai lapisan kloroform memberikan hasil negatif terhadap uji alkaloid. Lapisan kloroform yang diperoleh digabung dan dicuci berkali-kali dengan air sampai air cucian terakhir bersifat netral terhadap kertas lakmus, lalu lapisan kloroform tersebut dikeringkan dengan magnesium sulfat anhidrat, disaring dan filtrat yang diperoleh diuapkan pelarutnya dengan menggunakan "rotary evaporator" (Sivakumaran dan Gopinath, 1976).

## 2. Pengujian Adanya Alkaloid

Ke dalam cairan hasil perkolasi (fraksi heksan, metanol dan kloroform) sebanyak 10 ml ditambahkan asam sulfat 2 N sebanyak 10 tetes dan dikocok secara teratur. Cairan bagian atas (asam sulfat + alkaloid) yang terbentuk dipipet dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi dan ditambahkan reagen Mayer dan Dragendorff. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih pada penambahan reagen Mayer dan endapan merah jingga pada penambahan reagen Dragendorff (Suzery, 1985; Harborne, 1987).

### C.5. Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Ekstrak Alkaloid Daun Tapak Dara (*C. roseus* (L.) G. Don)

Pemeriksaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bertujuan untuk mengetahui zat-zat yang terkandung dalam ekstrak alkaloid daun tapak dara (*C. roseus*). Ekstrak alkaloid daun tapak dara dilarutkan dalam kloroform, sedang pelarut yang digunakan adalah benzena, etanol, metanol, aseton dan kloroform. Ekstrak alkaloid daun tapak dara (*C. roseus*) ditotolkan 1 cm

dari bagian bawah pelat KLT dengan menggunakan pipet mikro dan dibiarkan kering, kemudian dimasukkan ke dalam bejana dan disandarkan sehingga berdiri agak miring dan ditutup. Elusi dihentikan pada jarak pelarut teratas tinggal  $\frac{1}{2}$  cm dari ujung atas pelat KLT. Pelat KLT dikeluarkan dari bejana dan dikeringkan, noda-noda dilihat dengan lampu UV.

#### C.6. Isolasi dan Identifikasi *A. flavus*

Kacang tanah yang kondisinya rusak dan telah dikuliti diletakkan dalam cawan petri pada kondisi lembab, ditutup dan didiamkan pada suhu kamar selama 3 hari. Setelah kapang terlihat tumbuh pada kacang tanah kemudian ditanam pada media agar Czapek Dox pada cawan petri yang ditambah chloramfenicol 100 ppm dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 - 72 jam. Kemudian koloni kapang yang tumbuh diisolasi dengan cara ditumbuhkan pada media agar Czapek Dox dalam tabung dan pada cawan petri. Setelah tumbuh kemudian diambil dengan ose secara aseptik dan diamati di bawah mikroskop dan dirunut dengan buku identifikasi kapang (Raper dan Fennell, 1965; Samson *et al.*, 1984).

#### C.7. Peremajaan Biakan Murni *A. flavus*

Biakan murni *A. flavus* diambil secara aseptik dari stok murni dengan jarum ose kemudian diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi media taoge ekstrak agar (TEA) miring steril dan diinkubasi pada suhu kamar selama 3 x 24 jam.

### C. 8. Persiapan Inokulum

#### Pembuatan Suspensi Konidia

Biakan murni *A. flavus* dari tabung agar miring dikocok dengan aquades kemudian diambil 5 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 45 ml aquades yang merupakan pengenceran dengan konsentrasi  $10^{-1}$ , selanjutnya dilakukan pengenceran sampai diperoleh konsentrasi yang berisi  $10^6 - 10^7$  konidia/ml.

### C. 9. Inokulasi Biakan Murni *A. flavus*

Media taoge ekstrak cair yang masing-masing sebanyak 100 ml dan berisi ekstrak alkaloid daun tapak dara (*C. roseus*) dengan konsentrasi 0% (b/v); 0,2% (b/v); 0,4% (b/v) dan 0,6% (b/v) yang telah dilarutkan dalam larutan tween 80 sebanyak 2 tetes diinokulasi dengan biakan murni *A. flavus* dari erlenmeyer yang berisi  $10^6 - 10^7$  konidia/ml. Setiap perlakuan dibuat ulangnya sebanyak 3 kali dan diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari di dalam enkas.

### C.10. Pengamatan Terhadap Berat Kering *A. flavus*

Pengamatan terhadap berat kering kapang dilakukan pada hari ke-7, dengan cara :

Kapang dituang ke dalam kertas saring. Kertas saring sebelumnya ditimbang dahulu sebagai timbangan I. Miselia yang tertinggal dalam kertas saring dimasukkan ke dalam oven pada suhu  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  sampai berat

konstan dan ditimbang sebagai timbangan II. Timbangan II dikurangi timbangan I merupakan berat kering kapang (*Sugiarso, 1983*).

#### D. Parameter Yang Diukur

Parameter yang diukur adalah berat kering kapang *A. flavus* setelah 7 hari perlakuan. Data sekunder diperoleh dari pemeriksaan kromatografi lapis tipis terhadap hasil ekstraksi alkaloid yang bertujuan untuk mengetahui zat-zat yang terkandung dalam ekstrak alkaloid daun tapak dara (*C. roseus*).

#### E. Model Analisis Data

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini dari metode percobaan eksperimental dengan rancangan dasar Rancangan Acak Lengkap (RAL).

##### Perlakuan

Perlakuan K : ekstrak alkaloid daun tapak dara (*C. roseus*) dengan 4 macam konsentrasi yaitu:

K<sub>1</sub> : konsentrasi ekstrak alkaloid daun tapak dara 0% (b/v)

K<sub>2</sub> : konsentrasi ekstrak alkaloid daun tapak dara 0,2% (b/v)

K<sub>3</sub> : konsentrasi ekstrak alkaloid daun tapak dara 0,4% (b/v)

K<sub>4</sub> : konsentrasi ekstrak alkaloid daun tapak dara 0,6% (b/v)



Data yang diperoleh dianalisis dengan sidik ragam (uji F). Jika terdapat perbedaan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dengan menggunakan tingkat signifikan 1 %. Selanjutnya dilakukan analisis regresi untuk mengetahui hubungan antara peubah bebas (konsentrasi ekstrak alkaloid) dengan peubah tak bebas (berat kering kapang) dan besarnya hubungan antara 2 peubah dinyatakan dengan koefisien korelasi ( $r$ ).

