

**UJI ANTIBAKTERI DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK KASAR TEH RUMPUT  
LAUT COKLAT *Sargassum cristaefolium* DENGAN PELARUT METANOL**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :  
**KAMA YUDA FEBY PRATAMA**  
**NIM. 105080301111057**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

**UJI ANTIBAKTERI DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK KASAR TEH RUMPUT  
LAUT COKLAT *Sargassum cristaefolium* DENGAN PELARUT METANOL**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan di  
Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**KAMA YUDA FEBY PRATAMA  
NIM. 105080301111057**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2016**

SKRIPSI

UJI ANTIBAKTERI DAN UJI TOKSISITAS EKSTRAK KASAR TEH RUMPUT  
LAUT COKLAT *Sargassum cristaefolium* DENGAN PELARUT METANOL

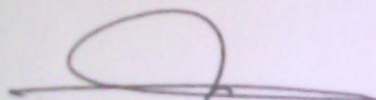
Oleh:

Kama Yuda Feby Pratama

NIM. 105080301111057

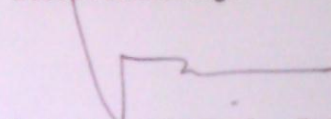
Telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 5 April 2016  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I



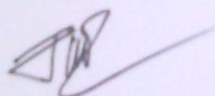
Dr. Ir. Happy Nursyam, MS  
NIP. 19600322 198601 1 001  
Tanggal :

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



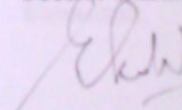
Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si  
NIP. 19640726 198903 2 004  
Tanggal :

Dosen Penguji II



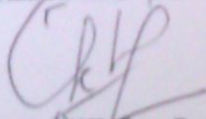
Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS  
NIP. 19550503 198503 2 001  
Tanggal :

Dosen Pembimbing II



Eko Waluyo, S.PI, M.Sc  
NIP. 19800424 2005001 1 001  
Tanggal :

Mengetahui  
Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. Arning Widhieng E., MS  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal :

## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, April 2016  
Mahasiswa,

Kama Yuda Feby Pratama  
NIM. 105080301111057

## UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah *subhanahu wa ta'ala* sebagai Tuhan Yang Maha Esa atas segala rahmat dan ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan segala kelebihan dan keterbatasannya. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibunda Ratu Sрни Nurhayati dan Ayahanda Raja Djumadi, Adik Pertama Kama Jaya Bahtera Segara, Si Adik Kembar Kama Sena Candra Bawana dan Kama Saka Cakra Abhirawa, Mamak Suripah, Kakek Bambang, Nenek Laniyem, Keluarga Om Khairul, Keluarga Pakde Mislan, Keluarga Om Nik dan beserta seluruh keluarga besar tercinta yang telah memberikan doa dan dukungan yang begitu besar.
2. Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak memberikan bimbingan selama menyusun skripsi ini, membantu biaya penelitian saya dan memberikan nasihat serta motivasi yang sangat membantu dalam penelitian saya.
3. Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc selaku Dosen Pembimbing II yang telah memberikan pengetahuan dan membimbing saya dengan sabar hingga saya dapat memahami materi penelitian saya.
4. Dr. Ir. Happy Nursyam, MS dan Dr. Ir. Kartini Zaelanie, MS selaku Dosen Penguji yang telah banyak memberikan ilmu, kritik dan saran dalam penyusunan skripsi ini.
5. Tim Penelitian dan The Hartati CS yang terdiri dari Fajar, Masrukhin, Sigit, Nita, Gaura, Erlin dan Mbak Mega yang selalu bekerja sama dan saling membantu dalam penelitian serta pengerjaan skripsi ini.

6. Teman baik terkasih Dewi Mandasari, adik baik Diana, Mbak Dwi, Om Jun yang menjadi keluarga baru saya di Malang, terima kasih atas perhatian dan keramahannya.
7. Para Serigala yang beranggotakan Nandar, Vedo, Amik, Lyu, Dio, Ryo, Dani, Hafid, Dika dan Ridwan yang selalu memberikan semangat canda tawa, cacian, kritik dan saran, serta selalu setia menemani bermain game maupun nongkrong.
8. Sobat saya Menyun, Hosnatus, Fransiska, Daus dan Ined yang meskipun sibuk aktifitas masing-masing namun tetap menjaga hubungan dan selalu memberikan dukungan semangat tanpa akhir.
9. Teman-Teman THP 2010 yang telah memberikan motivasi selama ini.
10. Pihak lain yang namanya tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang telah memberikan bantuan, doa dan semangat selama penulis menyelesaikan skripsi ini.

Malang, April 2016

Penulis

## RINGKASAN

**KAMA YUDA FEBY PRATAMA.** Uji Antibakteri dan Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Teh Rumput Laut Coklat *Sargassum cristaefolium* dengan Pelarut Metanol (dibawah bimbingan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, M.Si** dan **Eko Waluyo, S.Pi, M.Sc**).

Teh merupakan minuman yang sudah dikenal luas di Indonesia dan di dunia, mengandung zat bioaktif yang memiliki banyak manfaat dan berguna bagi kesehatan seperti polifenol, flavonoid, tanin, vitamin C dan E, *catechin*, serta sejumlah mineral seperti Zn, Se, Mo, Ge, Mg. Salah satu sumber teh yang telah banyak dimanfaatkan masyarakat Cabiya, kabupaten Sumenep adalah alga coklat jenis *Sargassum cristaefolium*. Senyawa bioaktif yang dihasilkan telah banyak diketahui manfaatnya antara lain sebagai antioksidan, antibakteri, antitumor, antikanker dan menghambat aktivitas enzim.

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode kertas cakram. Bakteri indikator yang digunakan adalah *Aeromonas salmonicida* sebagai bakteri gram negatif dan *Streptococcus pyogenes* sebagai bakteri gram positif. Pengujian toksisitas terhadap *Artemia salina* Leach. dikenal dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Metode ini merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk pencarian senyawa bioaktif antibakteri, antioksidan, dan antikanker baru yang berasal dari tanaman.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Desember 2015 di Laboratorium Reproduksi Ikan, Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang. Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi antibakteri terbaik dari ekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Serta untuk mendapatkan nilai LC<sub>50</sub> ekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach.

Metode dalam uji daya hambat / uji cakram adalah metode eksperimen. Metode eksperimen ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak kasar teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap pertumbuhan bakteri uji *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Metode dalam uji toksisitas juga merupakan metode eksperimen, yaitu dilakukan dengan cara membuat beberapa konsentrasi dari suatu ekstrak kasar teh rumput laut *Sargassum cristaefolium* yang diujikan terhadap sejumlah larva udang *Artemia salina* Leach. berumur 48 jam kemudian dihitung jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati untuk memperoleh nilai LC<sub>50</sub>.

Hasil penelitian yaitu konsentrasi ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* adalah pada konsentrasi 30% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 4,48 mm. Sedangkan untuk menghambat *Aeromonas salmonicida* adalah pada konsentrasi 30% juga, yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 3,866 mm. Hasil uji toksisitas nilai LC<sub>50</sub> ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. didapatkan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 321,2485 ppm.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah. Segala puji dan syukur kami panjatkan kepada Allah SWT atas segala berkah, rahmat serta karunia-Nya yang tiada terkira sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul “Uji Antibakteri dan Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Teh Rumput Laut Coklat *Sargassum cristaefolium* dengan Pelarut Metanol”. Dalam penyusunannya, penulis banyak mengambil literatur-literatur yang bersumber dari *text book*, artikel, jurnal, maupun prosiding seminar untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung pembuatan laporan Skripsi tersebut. Selain itu, penulis juga memperoleh banyak bantuan dari berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, sehingga segala informasi, ilmu dan materi terkait bahasan laporan Skripsi dapat dengan mudah diperoleh.

Penulis menyadari dalam laporan Skripsi ini tentunya masih banyak terdapat kekurangan dan kesalahan, baik dari materi maupun teknik penyajian mengingat kurangnya pengetahuan dan pengalaman penulis. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya, terutama para Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, April 2016

Penyusun



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>JUDUL</b> .....	i
<b>PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	iii
<b>UCAPAN TERIMA KASIH</b> .....	iv
<b>RINGKASAN</b> .....	vi
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	x
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xi
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xii
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Kegunaan Penelitian.....	4
1.5 Waktu dan Tempat.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	6
2.2 Pelarut.....	8
2.3 Ekstraksi.....	9
2.4 Antibakteri.....	10
2.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram).....	11
2.4.2 Bakteri Uji.....	12
2.4.2.1 <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	13
2.4.2.2 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	14
2.5 Toksisitas.....	16
2.5.1 Uji Toksisitas LC <sub>50</sub> Dengan Analisis Probit.....	17
2.5.2 <i>Artemia salina</i> Leach.....	18
2.6 Uji LC-MS.....	20
<b>BAB III METODE PENELITIAN</b>	
3.1 Materi Penelitian.....	22
3.1.1 Bahan Penelitian.....	22
3.1.2 Alat Penelitian.....	22
3.2 Metode Penelitian.....	23
3.2.1 Metode Eksperimen.....	23
3.2.2 Variabel Penelitian.....	24
3.2.3 Rancangan Penelitian.....	24
3.2.4 Parameter Uji.....	25
3.2.5 Analisis Data.....	26
3.3 Prosedur Penelitian.....	26
3.3.1 Pembuatan Ekstrak Teh <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	26
3.3.2 Uji Cakram.....	27
3.3.3 Uji Toksisitas.....	28
3.3.4 LC-MS.....	29

**BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

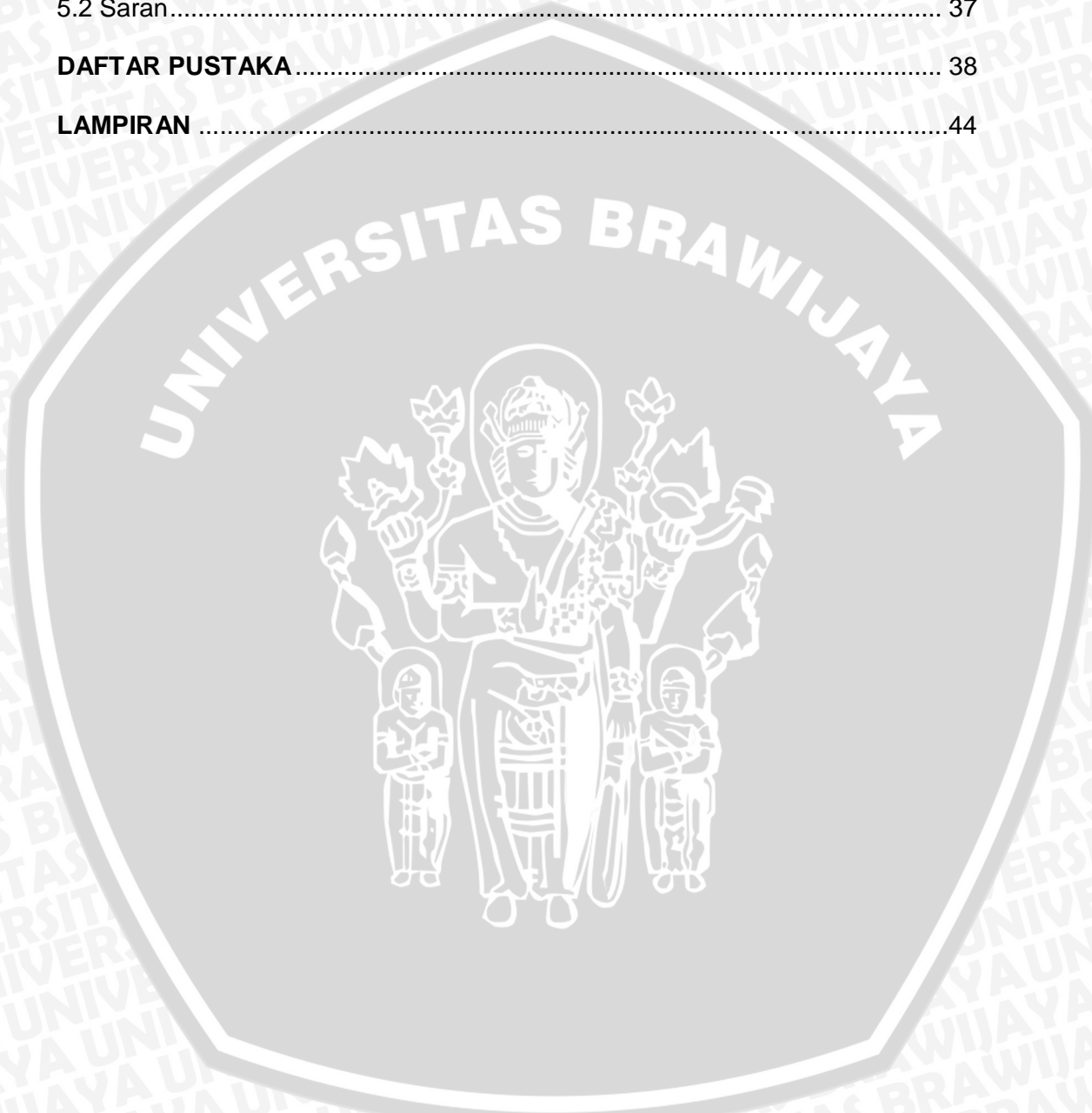
4.1 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram)..... 31  
4.2 Uji Toksisitas ..... 33  
4.3 Identifikasi Senyawa Bioaktif (LC-MS) ..... 35

**BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

5.1 Kesimpulan ..... 37  
5.2 Saran..... 37

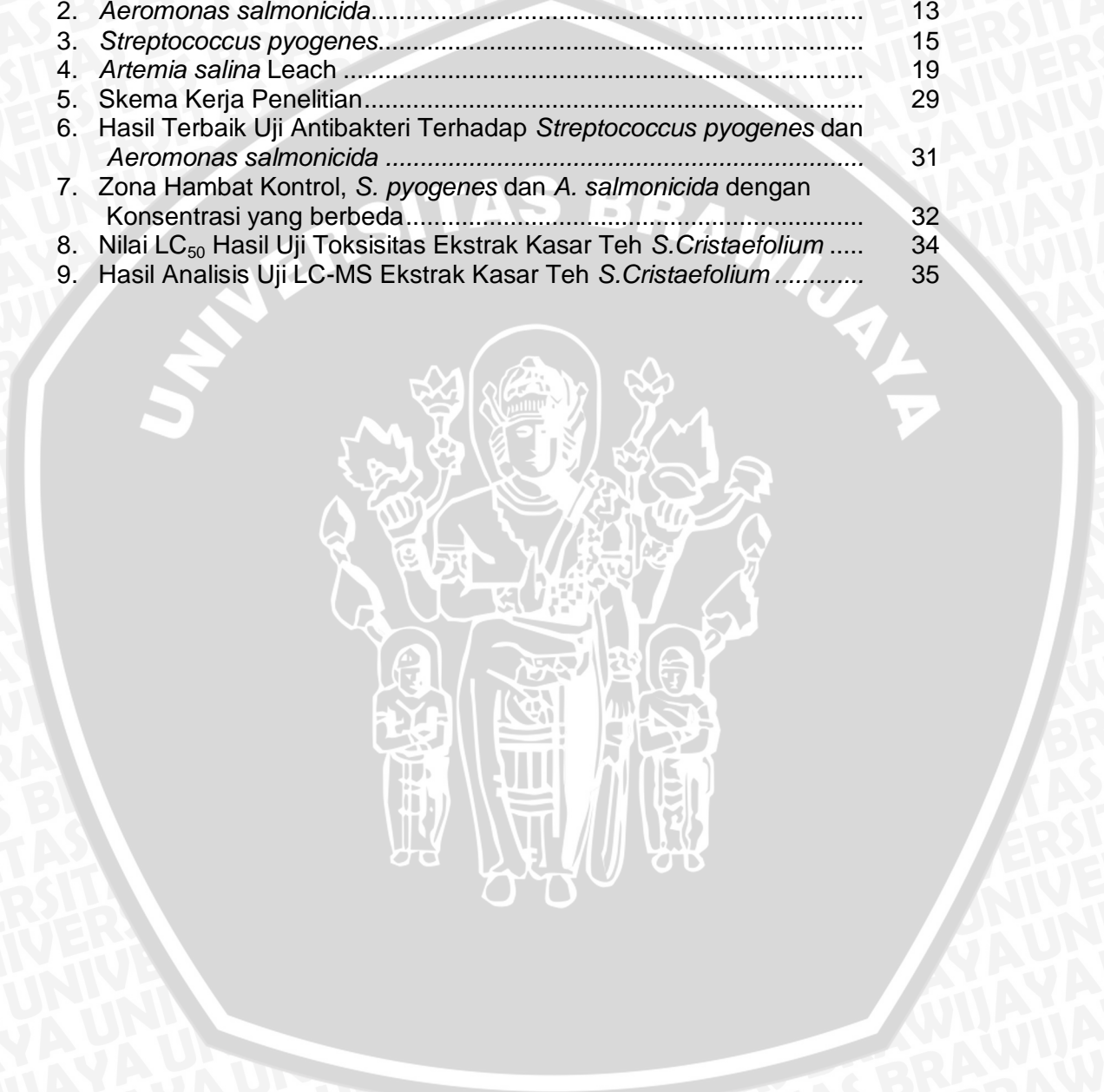
**DAFTAR PUSTAKA**..... 38

**LAMPIRAN** .....44



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	7
2. <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	13
3. <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	15
4. <i>Artemia salina</i> Leach .....	19
5. Skema Kerja Penelitian.....	29
6. Hasil Terbaik Uji Antibakteri Terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i> dan <i>Aeromonas salmonicida</i> .....	31
7. Zona Hambat Kontrol, <i>S. pyogenes</i> dan <i>A. salmonicida</i> dengan Konsentrasi yang berbeda.....	32
8. Nilai LC <sub>50</sub> Hasil Uji Toksisitas Ekstrak Kasar Teh <i>S.Cristaefolium</i> .....	34
9. Hasil Analisis Uji LC-MS Ekstrak Kasar Teh <i>S.Cristaefolium</i> .....	35



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat Fisika dan Kimia Metanol.....	9
2. Rancangan Penelitian Uji Daya Hambat.....	25
3. Pecahan Ion Molekul Senyawa Dugaan.....	36



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan Media TSA .....	45
2. Tahapan Pelaksanaan Uji Cakram Metode Kirby-Bauer.....	46
3. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram <i>S.pyogenes</i> .....	47
4. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram <i>A.salmonicida</i> .....	49
5. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji (Ekstrak Kasar) .....	51
6. Skema Uji Toksisitas Terhadap <i>Artemia salina</i> Leach .....	53
7. Pengolahan Data Hasil Uji Toksisitas .....	54
8. Hasil Uji LC-MS .....	59
9. Foto alur Penelitian .....	62



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Rumput laut (alga) secara tradisional telah lama digunakan sebagai bahan makanan dan obat-obatan, karena kaya akan mineral, elemen makro dan elemen mikro lainnya. Beberapa jenis rumput laut mengandung mineral penting yang berguna untuk metabolisme tubuh seperti iodin, kalsium dan selenium. Kandungan antioksidatif seperti polifenol dan tanin, dari hasil penelitian isolasi senyawa bioaktif dari rumput laut yang tergolong dalam rumput laut coklat diperoleh bermacam-macam senyawa antara lain *catechin*, *epicatechin*, *epigallocatechin*, *catechin gallate*, *epicatechin gallate*, *epigallocatechin gallate*, *rutin*, *quercitrin*, *hesperidin*, *myricetin*, *morin*, *luteolin*, *quercetin*, *apigeini*, *kaempferol*, dan *baicalein* (Suryaningrum, 2006). Di Vietnam bagian selatan hingga tengah seperti Khanh Hoa, Quang Nam, Quang Ngai, Binh Dinh, dan lain-lain orang telah memanfaatkan *Sargassum* dan *Porphyra* sebagai minuman teh yang berkhasiat medis. Pemanfaatan teh *Sargassum* oleh masyarakat Vietnam ini telah dilakukan sejak lama (Kartika, 2011).

Teh merupakan minuman yang sudah dikenal luas di Indonesia dan di dunia. Minuman berwarna coklat ini umum menjadi minuman penjamu tamu. Aromanya yang harum serta rasanya yang khas membuat minuman ini banyak dikonsumsi. Disamping itu terdapat banyak zat bioaktif yang memiliki banyak manfaat dan berguna bagi kesehatan seperti polifenol, flavonoid, tanin, vitamin C dan E, *catechin*, serta sejumlah mineral seperti Zn, Se, Mo, Ge, Mg (Misra *et al.*, 2008).

Salah satu sumber teh yang telah banyak dimanfaatkan masyarakat Cabiya, kabupaten Sumenep adalah alga coklat jenis *Sargassum cristaefolium*. Menurut Wakhidatur (2011), *Sargassum cristaefolium* termasuk jenis alga coklat

yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif sebagai metabolit sekundernya. Senyawa bioaktif yang dihasilkan telah banyak diketahui manfaatnya antara lain sebagai antioksidan, antibakteri, antitumor, antikanker dan menghambat aktivitas enzim. Senyawa bioaktif yang terdapat di dalamnya dapat diperoleh dengan cara ekstraksi. Metode ekstraksi yang tepat memerlukan adanya pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolarannya, sehingga nantinya dapat mengekstrak senyawa bioaktif yang terkandung dalam *Sargassum cristaefolium* yaitu seperti tanin dan polifenol yang bersifat polar. Oleh karena itu pelarut yang digunakan juga bersifat polar yaitu metanol.

Metanol merupakan pelarut yang bersifat polar, sehingga akan bekerja secara efektif dan optimal apabila digunakan sebagai ekstraksi dalam mendapatkan bioaktif polifenol dan tanin pada teh alga coklat *Sargassum cristaefolium*. Dalam penelitian Septiana (2012), tannin adalah senyawa yang cenderung polar sehingga ekstraksi dengan pelarut polar seperti methanol akan mengekstrak tanin secara optimal. Hal ini diduga karena besarnya konstanta dielektrik dari metanol tidak berbeda jauh.

Proses ekstraksi merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok. Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu dengan pelarut air (*aqueous phase*) dan pelarut organik (*organic phase*). Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harbone, 1978).

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran (Pharmacopeial, 1993). Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, ada 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan kertas cakram. Metode kertas cakram yaitu meletakkan kertas

cakram yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling kertas cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2006). Bakteri indikator yang digunakan adalah *Aeromonas salmonicida* sebagai bakteri gram negatif dan *Streptococcus pyogenes* sebagai bakteri gram positif.

Senyawa bioaktif yang didapatkan dari hasil ekstrak seperti tanin dan turunannya merupakan bioaktif yang sudah diketahui sebagai antioksidan dan antibakteri. Sebelum digunakan sebagai obat, umumnya tahap awal dalam mengidentifikasi potensi bioaktif yaitu dengan uji toksisitas. Menurut Ibrahim *et al.*, (2012), terdapat dua unsur uji toksisitas yaitu uji toksisitas (*lethal dose*) LD<sub>50</sub> dan (*lethal concentration*) LC<sub>50</sub>.

Toksistas ini sangat beragam bagi berbagai organisme, tergantung dari berbagai faktor antara lain spesies uji, cara racun memasuki tubuh, frekuensi dan lamanya paparan, konsentrasi zat pemapar, bentuk sifat kimia atau fisika zat pencemar dan kerentanan berbagai spesies terhadap pencemar, semuanya akan menentukan efek yang akan terjadi (Soemirat, 2005). Dalam uji toksistas biasanya menggunakan hewan percobaan, salah satu hewan uji yang sering digunakan ialah larva udang *Artemia salina* Leach.

Pengujian toksistas terhadap *Artemia salina* Leach. dikenal dengan metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). Metode ini merupakan salah satu metode yang paling banyak digunakan untuk pencarian senyawa bioaktif antibakteri, antioksidan, dan antikanker baru yang berasal dari tanaman. Hasil uji toksistas dengan metode ini telah terbukti memiliki korelasi dengan daya sitotoksis sebagai senyawa bioaktif. Selain itu metode ini juga mudah dikerjakan, murah, cepat, dan cukup akurat (Meyer, 1982).



Penelitian ini secara umum bertujuan untuk diversifikasi pemanfaatan biota laut yang jenisnya sangat beragam di Indonesia melalui pengetahuan mengenai kandungan kimia dan metode ekstraksinya. Di masa depan, senyawa bioaktif alga coklat *Sargassum cristaefolium* diharapkan dapat menjadi obat antibakteri di bidang perikanan dan dapat diterapkan penggunaannya untuk bahan pangan.

### 1.2 Rumusan Masalah

Adapun perumusan masalah dari latar belakang di atas yaitu:

- Berapa konsentrasi ekstrak teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* yang dapat menghasilkan antibakteri terbaik terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*?
- Berapa besar nilai  $LC_{50}$  ekstrak teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach.?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mendapatkan konsentrasi antibakteri terbaik dari ekstrak teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Serta untuk mendapatkan nilai  $LC_{50}$  ekstrak teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach.

### 1.4 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini antara lain:

- Memberikan informasi kepada masyarakat umum dan lembaga lain mengenai manfaat dari teh alga coklat *Sargassum cristaefolium*.

- Masyarakat dapat memanfaatkan teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* sebagai antibakteri alami.
- Untuk mengetahui potensi ketoksikan dari teh alga coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap hewan uji *Artemia salina* Leach.

### 1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September – Desember 2015 di Laboratorium Reproduksi Ikan, Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, serta Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Sargassum cristaefolium*

Alga atau ganggang dikelompokkan menjadi empat kelas, yaitu alga hijau (*Chlorophyceae*), alga hijau biru (*Cyanophyceae*), alga coklat (*Phaeophyceae*), dan alga merah (*Rhodophyceae*) (Winarno, 1996). Pembagian ini berdasarkan pigmen yang dikandungnya. Jika dilihat dari ukurannya alga terdiri dari mikroskopik dan makroskopik. Alga makroskopik inilah yang dikenal sebagai rumput laut.

Beberapa jenis rumput laut yang memiliki nilai ekonomi tinggi adalah golongan alga merah (*Rhodophyceae*) dan alga coklat (*Phaeophyceae*). *Rhodophyceae* merupakan rumput laut penghasil agar-agar dan karaginan, sedangkan *Phaeophyceae* merupakan rumput laut yang belum dioptimalkan pemanfaatannya (Permana, 2008). Rumput laut coklat adalah kelompok alga yang secara umum berwarna coklat. Warna tersebut tidak berubah walaupun alga ini dalam kondisi mati atau kering. Namun pada beberapa jenis seperti *Sargassum sp.*, warnanya akan sedikit berubah menjadi hijau kebiru-biruan apabila mati kekeringan. Memiliki bentuk talus yang bervariasi dan dapat mencapai ukuran relatif besar. Beberapa jenis dari alga coklat ini memiliki talus lebih tinggi dari jenis alga merah dan alga hijau (Atmadja, 1996).

Menurut Aslan (1998), *Sargassum cristaefolium* adalah salah satu genus dari kelompok rumput laut coklat *Sargassum sp.* yang merupakan genera terbesar dari famili *Sargassaceae*. Memiliki ciri-ciri bentuk talus silindris atau gepeng, cabangnya rimbun, bentuk daun melebar, mempunyai gelembung udara yang umumnya soliter, panjangnya mencapai 7 meter. Klasifikasi *Sargassum cristaefolium* adalah sebagai berikut:

Divisi : Thallophyta  
Kelas : Phaeophyceae  
Ordo : Fucales  
Famili : Sargassaceae  
Genus : Sargassum  
Specific descriptor : cristaefolium – C. Agardh  
Scientific name : *Sargassum cristaefolium* – C. Agardh



(Googleimage<sup>a</sup>, 2015)

**Gambar 1. *Sargassum cristaefolium***

*Sargassum sp.* merupakan salah satu jenis rumput laut coklat yang potensial untuk dikembangkan. Angka dan Suhartono (2000), melaporkan bahwa ekstrak *Sargassum sp.* dapat dijadikan obat penurun kolesterol, zat anti bakteri, anti tumor dan anti kanker. Sedangkan menurut Yunizal (2004), *Sargassum sp.* dimanfaatkan sebagai bahan baku dalam bidang industri makanan, farmasi, kosmetika, pakan, pupuk, tekstil, kertas, dan lain-lain.

*Sargassum cristaefolium* dapat juga digunakan sebagai minuman teh karena dikenal mempunyai manfaat bagi kesehatan tubuh. Hasil penelitian para ahli menyebutkan senyawa bioaktif yang terdapat pada *Sargassum cristaefolium* seperti polifenol, tannin, katekin, epikatekin merupakan bioaktif terbesar di dalam teh. Seperti yang dilaporkan oleh Kadi (2005), bahwa *Sargassum cristaefolium* memiliki kandungan kimia utamanya yaitu alginate, serta mengandung protein, vitamin C, polifenol, tannin, katekin, epikatekin, iodium dan fenol.

## 2.2 Pelarut

Larutan adalah campuran homogen antara dua komponen / zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (solvent) dan zat terlarut (solute). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan (Rivai, 1995). Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non polar larut ke dalam pelarut non polar (Vogel, 1987).

Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metanol. Menurut Ayuningrat (2009), metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) merupakan pelarut polar, pelarut yang bersifat polar mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, polifenol, tannin, gula, asam amino dan glikosida. Metanol sebagai senyawa polar dapat disebut sebagai pelarut universal karena selain mampu mengekstrak komponen polar, dapat juga mengekstrak komponen non polar seperti lilin dan lemak. Sifat-sifat metanol dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1. Sifat Fisika dan Kimia Metanol**

No.	Karakteristik	Metanol
1.	Nama lain	Hidroksi metana, metil alkohol, metil hidrat, alkohol kayu dan karbinol
2.	Rumus bangun	$\text{CH}_3\text{OH}$ $\begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{H}-\text{C}-\text{O}-\text{H} \\   \\ \text{H} \end{array}$
3.	Sifat	Mudah terbakar, tidak berwarna
4.	Titik leleh	$-97\text{ }^\circ\text{C}$
5.	Titik didih	$64.7\text{ }^\circ\text{C}$
6.	Massa molar	32.04 g/mol
7.	Densitas	$0,7918\text{ g/cm}^3$ , cair
8.	Titik nyala	$11\text{ }^\circ\text{C}$
9.	Konstanta dielektrik	33

Sumber: Romiyanto (2014)

Metanol dahulu dibuat dari kayu melalui penyulingan dan kadang dinamakan alkohol kayu. Kata metal berasal dari bahasa latin (*methy* = anggur, *yle* = kayu). Tetapi sekarang metanol dibuat dari karbon monoksida dan oksigen. Metanol memiliki titik didih 65oC dan larut sempurna dalam air pada suhu 20oC (Hart, 1983). Metanol mudah menguap sehingga mudah dibebaskan dari ekstrak, selain itu metanol lebih murah dibandingkan dengan pelarut organik lainnya (Andayani *et al.*, 2008).

### 2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu cara untuk mendapatkan zat – zat berkhasiat atau zat – zat aktif dengan cara menariknya dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Ditjen POM, 1989). Sedangkan menurut Utami *et al.*, (2009), ekstraksi adalah proses penarikan komponen/zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu.

Ada beberapa cara ekstraksi diantaranya adalah ekstraksi secara refluks, ekstraksi secara sonikasi dan maserasi. Ekstraksi secara refluks membutuhkan peralatan khusus, waktu yang relatif lama, energi dan bahan kimia yang cukup banyak, sehingga diperlukan alternatif ekstraksi yang lebih sederhana, cepat, efisien dan tidak mahal, namun tetap memenuhi kaidah – kaidah analisis. Ekstraksi secara sonikasi sangat tepat diterapkan pada analisa dalam jumlah massif dengan waktu yang terbatas. Sedangkan maserasi merupakan cara yang sangat sederhana dan tidak membutuhkan peralatan khusus sehingga dapat diterapkan di semua laboratorium (Mujahid *et al.*, 2011).

Maserasi merupakan proses dimana simplisa yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan melarut (Ansel, 1989). Maserasi memiliki kekurangan yaitu pengerjaanya yang lama karena adanya penambahan pelarut untuk mendapatkan ekstrak pertama dan seterusnya. Penarikan terhadap kandungan senyawanya pun tidak sempurna karena prinsip kerjanya adalah pencapaian keseimbangan konsentrasi (Depkes RI, 2000).

#### 2.4 Antibakteri

Antibakteri adalah suatu senyawa yang mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri (Pelczar dan Chan, 1988). Definisi antibakteri berkembang bahwa antibakteri merupakan senyawa kimia yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh suatu mikroorganisme. Antimikroba yang ideal menunjukkan sifat toksisitas selektif, toksisitas yang selektif merupakan fungsi reseptor yang spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat atau karena hambatan biokimia yang terjadi bagi organisme namun tidak bagi inang (Ganiswara, 1995).

Penggunaan senyawa antibakteri khususnya yang alami, telah meningkat dari tahun ke tahun. Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba. Senyawa antibakteri yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak diketahui mampu menghambat beberapa jenis mikroba pathogen (Branen dan Davidson, 1993). Ditambahkan oleh Inayati (2007), bahwa antimikroba meliputi antibakteri, antifungi, antivirus dan antiprotozoa.

Antimikroba menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara bakteriostatik dan bakterisida. Hambatan ini terjadi sebagai akibat gangguan

reaksi yang esensial untuk pertumbuhan. Reaksi tersebut merupakan satu-satunya jalan untuk mensintesis makromolekul seperti protein atau asam nukleat, sintesis struktur sel seperti dinding sel atau membran sel (Suwandi, 1992). Mekanisme penghambatan antibakteri dapat dikelompokkan menjadi lima, yaitu menghambat sintesis dinding sel mikrobia, merusak keutuhan dinding sel mikrobia, menghambat sintesis protein sel mikrobia, menghambat sintesis asam nukleat, dan merusak asam nukleat sel mikrobia (Sulistyo, 1971).

#### **2.4.1 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram)**

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan kertas cakram. Metode pengenceran yaitu mengencerkan zat antibakteri dan dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi steril. Ke dalam masing-masing tabung itu ditambahkan sejumlah bakteri uji yang telah diketahui jumlahnya. Pada interval waktu tertentu dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung-tabung berisi media steril yang lalu diinkubasi dan diamati penghambatan pertumbuhan (Kusmiyati dan Agustin, 2006).

Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bahan antimikroba bersifat menghambat apabila digunakan dalam konsentrasi kecil, namun bila digunakan dalam konsentrasi tinggi dapat mematikan mikroorganisme. Salah satu cara untuk menguji bahan antimikroba dapat dilakukan dengan uji cakram. Uji cakram diperkenalkan oleh Willian Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).



Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer (1996) antara lain: (1) konsentrasi mikroba uji, (2) konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium (Jawetz *et al.*, 1995).

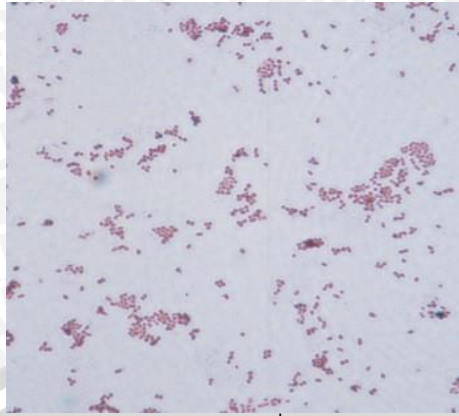
#### 2.4.2 Bakteri Uji

Menurut Dwidjoseputro (1998), berdasarkan perbedaannya dalam penyerapan warna, bakteri terbagi menjadi dua jenis golongan yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif menyerap zat warna pertama yaitu kristal violet yang menyebabkan bakteri tersebut berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif menyerap zat warna kedua yaitu safranin dan menyebabkan warna merah.

##### 2.4.2.1 *Aeromonas salmonicida*

*Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri gram negatif (Austin dan Austin, 2007). Secara taksonomi *Aeromonas salmonicida* dibagi menjadi 2 jenis yaitu *typical* dan *atypical*. Strain *typical* mempunyai inang dominan ikan-ikan salmonid dan menyebabkan penyakit *furunculosis* dengan gejala klinis yang khas, sedangkan strain *atypical* mempunyai karakteristik memiliki banyak variasi dari sifat fisiologi, biokimia dan serologi serta ketahanan terhadap antibiotik. Klasifikasi ilmiah *Aeromonas salmonicida* menurut Buchanan dan Gibbons (1974) adalah sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Proteobacteria
Filum	: Gammaproteobacteria
Kelas	: Aeromonadales
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Species	: <i>Aeromonas salmonicida</i>



(Googleimage<sup>b</sup>, 2015)

### Gambar 2. *Aeromonas salmonicida*

*Aeromonas sp.* merupakan bakteri heterotrophic unicellular, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan adanya membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran  $0,7-1,8 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$  dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel (Kabata, 1985). *Aeromonas sp.* bersifat motil dengan flagela tunggal di salah satu ujungnya. Bakteri ini berbentuk batang sampai dengan kokus dengan ujung membulat, bersifat mesofilik dan fakultatif anaerob dengan suhu optimum  $20 - 30^{\circ}\text{C}$  (Holt *et al.*, 1994).

*Aeromonas salmonicida* adalah bakteri obligat patogenik pada ikan yang dapat diisolasi dari ikan yang sakit ataupun ikan sehat yang bertindak sebagai *carrier* atau pembawa penyakit. Bakteri tersebut dapat hidup beberapa minggu di luar hospes, tergantung salinitas, pH, temperatur dan kualitas air (Puskari, 2007). Secara umum *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri penyebab utama penyakit infeksi pada ikan-ikan salmonid dengan penyakit yang dikenal dengan *furunculosis*, tapi sejumlah laporan juga menunjukkan insiden infeksi pada ikan non salmonid seperti ikan mas, koi, patin dan lele (Sumino *et al.*, 2013).

#### 2.4.2.1 *Streptococcus pyogenes*

Menurut DKP (2009), *Streptococcus spp.* Termasuk bakteri gram positif, berbentuk bulat (cocci), bergabung menyerupai rantai, dan bersifat non motil.

Target organ infeksi *Streptococcus spp.* banyak ditemukan di otak dan mata, sehingga disebut “*syndrome meningoenkephalitis* dan *panophthalmitis*”. Penyakit ini sering dilaporkan pada sistem budidaya intensif, lingkungan perairan tenang (stagnant) dan atau sistem resirkulasi. Klasifikasi *Streptococcus pyogenes* sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Ordo	: Lactobacillales
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Species	: <i>Streptococcus pyogenes</i>

*Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri gram positif, non-motil, tidak berspora, berbentuk kokus yang membentuk rantai, berdiameter 0,6-1,0 mikrometer dan anaerob fakultatif. Bakteri ini melakukan metabolisme secara fermentasi. *Streptococcus pyogenes* digolongkan ke dalam bakteri hemolitik- $\beta$ , sehingga membentuk zona terang bila ditumbuhkan dalam medium agar darah. *Streptococcus pyogenes* dapat menyebabkan penyakit seperti infeksi tulang, necrotizing fasciitis, radang otot, meningitis dan endokarditis (Cunningham, 2000).



(Googleimage<sup>o</sup>, 2015)

**Gambar 3. *Streptococcus pyogenes***

*Streptococcus pyogenes* adalah patogen yang hanya menginfeksi manusia. Untuk menjadi patogen *Streptococcus pyogenes* dilengkapi dengan faktor virulensi, baik berupa molekul permukaan maupun yang disekresikan. Faktor virulensi yang disekresikan mempunyai fungsi penting karena berinteraksi dengan komponen inang untuk menyebabkan infeksi dan penyakit pada manusia. Faktor virulensi tersebut mencakup sejumlah protease, DNase, superantigen, dan aktivator plasminogen (Abdullah dan Retnoningrum, 2009).

## 2.5 Toksisitas

Toksikologi adalah ilmu yang mempelajari efek merugikan dari zat-zat kimia terhadap organisme hidup. Selain itu toksikologi juga mempelajari kerusakan pada organisme yang diakibatkan oleh suatu materi substansi atau energi, mempelajari racun tidak hanya pada efeknya tetapi juga mekanisme terjadinya efek tersebut pada organisme dan mempelajari kerja kimia yang merugikan terhadap organisme, serta mempelajari secara kualitatif dan kuantitatif pengaruh yang merugikan dari zat kimiawi, fisis dan biologis terhadap suatu sistem biologis (Soemirat, 2005).

Toksisitas dapat diartikan sebagai kemampuan suatu zat untuk menimbulkan kerusakan. Uji toksisitas akut merupakan uji dengan pemberian suatu senyawa yang diberikan dengan dosis tunggal pada hewan uji tertentu dan dilakukan pengamatan selama 24 jam. Pengamatan aktivitas biologi uji toksisitas akut berupa pengamatan gejala klinis, kematian hewan uji atau pengamatan organ (Panjaitan, 2011).

Di dalam toksisitas terdapat taraf toksisitas, taraf toksisitas ini dapat digunakan untuk menilai taraf toksisitas suatu racun yang sedang diuji coba pada berbagai organisme. Ada 2 uji toksisitas, yaitu uji LD<sub>50</sub> (lethal dose) dan uji LC<sub>50</sub> (lethal concentration). Uji LD<sub>50</sub> adalah suatu pengujian untuk menetapkan potensi

toksistas akut, menilai berbagai gejala toksik, spektrum efek toksik, dan mekanisme kematian. Tujuannya adalah untuk mendeteksi adanya toksistas suatu zat, menentukan organ sasaran dan kepekaannya, memperoleh data bahayanya setelah pemberian suatu senyawa dan untuk memperoleh informasi awal yang dapat digunakan untuk menetapkan tingkat dosis yang diperlukan (Ibrahim *et al.*, 2012). Sedangkan uji  $LC_{50}$  adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk mematikan setengah dari populasi (50%) yang ada (Setianto, 2009). Faktor-faktor yang mempengaruhi toksistas antara lain komposisi dan jenis toksikan, konsentrasi toksikan, durasi dan frekuensi pemaparan, sifat lingkungan, dan spesies biota penerima. Toksikan merupakan zat yang dapat menghasilkan efek negatif bagi semua atau sebagian dari tingkat organisasi biologis (populasi, individu, organ, jaringan, sel, biomolekul) dalam bentuk merusak struktur maupun fungsi biologis. Efek tersebut dapat bersifat reversibel dan dapat pula bersifat irreversibel.

### 2.5.1 Uji Toksistas $LC_{50}$ Dengan Analisis Probit

Finney (1971) menjelaskan bahwa, *Lethal concentration* ( $LC_{50}$ ) adalah konsentrasi yang dibutuhkan untuk mematikan setengah dari populasi (50%) yang ada. Nilai  $LC_{50}$  tidak konstan, artinya nilainya berbeda antara spesies satu dengan yang lain karena adanya variasi antar spesies. Nilai  $LC_{50}$  merupakan bentuk statistika yang didesain untuk menggambarkan respon yang mematikan komponen dalam beberapa populasi dari suatu percobaan. Banyak faktor yang berpengaruh di dalamnya antara lain: umur, suhu, dan jumlah hewan uji.

Salah satu metode analisis statistika yang digunakan untuk menghitung besarnya  $LC_{50}$  adalah dengan menggunakan analisis probit. Metode regresi linear digunakan untuk mendapatkan grafik garis lurus apabila probit kematian ditransformasikan pada log konsentrasi. Konsentrasi yang dapat mengakibatkan 50% populasi hewan diperoleh dengan menarik garis dari 50% probit kematian.

Perbedaan konsentrasi pada setiap perlakuan secara jelas dapat mempermudah dalam menentukan konsentrasi letal. Kontrol dalam percobaan sangat penting dalam suatu perhitungan mortalitas alami. Jika terjadi kematian dari suatu kontrol perlu dilakukan koreksi terhadap analisis dengan persen kematian terkoreksi.

Berbagai macam pengujian dilakukan untuk menentukan tingkat toksisitas suatu senyawa, salah satunya dengan menggunakan larva udang (*Artemia salina* Leach.). Meyer et al., (1982) telah mengembangkan metode ini supaya dapat digunakan dalam menemukan senyawa bioaktif baru dari tumbuhan tingkat tinggi. Metode ini telah banyak digunakan untuk uji hayati dalam analisis residu pestisida, anestetika dan zat pencemar air. Keuntungan metode ini adalah cepat, murah dan mudah dilakukan. Metode ini sering digunakan untuk mendeteksi senyawa bioaktif yang memiliki komponen bioaktif dan efek farmakologi.

Penelitian mengenai  $LC_{50}$  yang telah dilakukan yaitu hasil  $LC_{50}$  dari uji toksisitas ekstrak pigmen kasar mikroalga *Spirulina platensis* dengan metode uji BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) menggunakan pelarut metanol didapatkan hasil  $LC_{50}$  yaitu 495,271 ppm (Agustian et al., 2013). Uji toksisitas ekstrak teripang *Holothuria scabra* terhadap *Artemia salina* Leach. dengan nilai  $LC_{50}$  sebesar 0,5886  $\mu\text{g/ml}$  (Aras, 2013). Namun untuk uji toksisitas ekstrak kasar teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* belum terdapat banyak data dari hasil penelitian, sehingga penelitian ini perlu dilakukan.

### 2.5.2 *Artemia salina* Leach.

*A. salina* Leach. atau sering disebut brine shrimp adalah sejenis udang-udangan primitif yang sudah dikenal cukup lama dan oleh Linnaeus pada tahun 1778 yang diberi nama *Cancer salinus*, kemudian oleh Leach diubah menjadi *Artemia salina* pada tahun 1819. Hewan ini hidup planktonik di perairan yang berkadar garam tinggi (antara 15-300 per mil). Suhu yang berkisar antara 25-30°C, oksigen terlarut sekitar 3 mg/L, dan pH antara 7,3– 8,4. Sebagai plankton,

*A. salina* Leach. tidak dapat mempertahankan diri terhadap musuh-musuhnya, karena tidak mempunyai cara maupun alat untuk mempertahankan diri. Satu-satunya kondisi yang menguntungkan dari alam adalah lingkungan hidup yang berkadar garam tinggi, karena pada kondisi tersebut pemangsanya pada umumnya sudah tidak dapat hidup lagi (Mudjiman, 1995).

Menurut Emslie (2003), *A. salina* Leach. dewasa memiliki panjang tubuh umumnya sekitar 8-10 mm bahkan mencapai 15 mm tergantung lingkungan. Tubuhnya memanjang terdiri sedikitnya 20 segmen dan dilengkapi kira-kira 10 pasang *phyllopodia* pipih, yaitu bagian tubuh yang menyerupai daun yang bergerak dengan ritme teratur. *A. salina* Leach. dewasa berwarna putih pucat, merah muda, hijau, atau transparan dan biasanya hanya hidup beberapa bulan. Memiliki mulut dan sepasang mata pada antenanya. Klasifikasi *A. salina* Leach menurut Mudjiman (1995) sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Arthropoda
Class	: Crustacea
Subclass	: Branchiopoda
Ordo	: Anostraca
Family	: Artemiidae
Genus	: <i>Artemia</i>
Spesies	: <i>A. salina</i> Leach.



(Googleimage<sup>d</sup>, 2015)

**Gambar 4. *Artemia salina* Leach.**

*A. salina* Leach. sering digunakan dalam uji coba toksisitas, sering dikenal dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Metode BSLT merupakan salah satu metode skrining bahan yang berpotensi sebagai tanaman berkhasiat. Bila bahan yang diuji memberikan efek toksik terhadap larva udang *A. salina* Leach. maka hal ini merupakan indikasi awal dari efek farmakologi yang terkandung dalam bahan tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *A. salina* Leach. memiliki korelasi positif terhadap ekstrak yang bersifat bioaktif. Metode ini juga banyak digunakan dalam berbagai analisis biosistem seperti analisis terhadap residu pestisida, toksin, polusi, senyawa turunan morfin, dan karsinogenik dari phorbol ester (Suhirman, 2006).

## 2.6 Uji LC-MS

*Liquid Chromatography-Mass Spectrofotometer* (LC-MS) adalah suatu metode pemisahan modern dalam analisa farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas dan uji kemurnian. Yang menjadi titik beratnya yaitu untuk menganalisa senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak dapat dianalisis dengan kromatografi gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisis menggunakan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul (Lindsay, 1992).

LC-MS digunakan fase gerak atau pelarut untuk membawa sampel melalui kolom yang berisi padatan pendukung yang dilapisi cairan sebagai fase diam. Selanjutnya analit dipartisikan di antara fase gerak dan fase diam tersebut, sehingga terjadi pemisahan karena adanya perbedaan koefisien partisi. Sampel yang telah dipisahkan dalam kolom diuapkan pada suhu tinggi, kemudian diionisasi. Ion yang terbentuk difragmentasi sesuai dengan rasio massa/muatan ( $m/z$ ), yang selanjutnya dideteksi secara elektrik menghasilkan spektra massa.



Spektra massa merupakan rangkaian puncak-puncak yang berbeda-beda tingginya (Khopkar, 2008).

Menurut Ginting (2008), LC-MS merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Kelebihan LC-MS antara lain : 1) hasil analisis yang khas dan spesifik, 2) aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis, mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi, 3) pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat, 4) kaya informasi, dimana sejumlah data kualitatif dan kuantitatif dapat diperoleh dikarenakan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama yaitu rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* dari perairan Kabupaten Sumenep, Madura, Jawa Timur. Baketri yang digunakan yaitu biakan murni *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan  $10^6$  koloni/mL yang diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Serta hewan uji coba *Artemia salina* Leach. yang didapatkan dari Laboratorium Reproduksi, Pemuliaan dan Pembenihan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Pada proses ekstraksi, bahan yang digunakan yaitu metanol teknis, aquades, kertas saring, kertas label, aluminium foil dan plastik wrap. Kemudian bahan untuk uji daya hambat / uji cakram yaitu kertas cakram (*paper disc*) yang masing-masing berdiameter 6 mm, cotton swap, media TSA (Trypton Soya Agar), *ampicilin*, alkohol, spirtus, kertas label dan plastik wrap. Sedangkan untuk uji toksisitas bahan yang digunakan yaitu air laut, tissue, dan starter indukan telur *Artemia salina* Leach.

##### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, uji daya hambat / uji cakram, uji toksisitas dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, nampan, blender, beaker glass 1000 ml, gelas ukur 250 ml, spatula, corong, sentrifuse, cuvet, pipet tetes, botol vial dan *rotary vacuum evaporator*. Peralatan untuk uji daya hambat / uji cakram antara lain autoklaf untuk sterilisasi alat, erlenmeyer

250 ml, cawan petri, jarum ose, triangle, jangka sorong, inkubator dan bunsen. Peralatan untuk uji toksisitas antara lain timbangan analitik, spatula, botol vial, beaker glass 1000 ml, aerator, lampu (sumber cahaya), pipet tetes dan cover glass. Sedangkan peralatan yang digunakan untuk analisa adalah LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) Hitachi L 6200 Mariner Biospectrometry dengan sistem ESI (*Electrospray Ionisation*) yang terdapat pada Laboratorium Pusat Penelitian Kimia LIPI, Serpong Tangerang Selatan.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Metode Eksperimen**

Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kasual antara variabel-variabel yang diselidiki (Suryasubrata, 1989). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir, 1989). Menurut Singarimbun dan Efendi (1983), penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen.

Metode dalam uji daya hambat / uji cakram adalah metode eksperimen. Metode eksperimen ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak kasar teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* terhadap pertumbuhan bakteri uji *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening pada setiap konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif daya antibakteri yang dihasilkan.

Metode dalam uji toksisitas juga merupakan metode eksperimen, yaitu dilakukan dengan cara membuat beberapa konsentrasi dari suatu ekstrak kasar

teh rumput laut *Sargassum cristaefolium* yang diujikan terhadap sejumlah larva udang *Artemia salina* Leach. berumur 48 jam kemudian dihitung jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati untuk memperoleh nilai  $LC_{50}$  (Mc Laughlin, 1991).

### 3.2.2 Variabel Penelitian

Menurut Surachmad (1994), ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas. Variabel bebas dalam penelitian uji daya hambat / uji cakram adalah metanol sebagai pelarut pengekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium*, sedangkan variabel terikatnya adalah perbedaan lebar diameter daerah hambatan antibakteri yang terlihat sebagai zona bening di sekitar kertas cakram dan dinyatakan dalam satuan mm. Variabel bebas dalam penelitian uji toksisitas sama seperti uji daya hambat / uji cakram yaitu metanol sebagai pengekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium*, sedangkan variabel terikatnya adalah jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati dan dinyatakan sebagai nilai  $LC_{50}$ .

### 3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam uji daya hambat / uji cakram yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 4 perlakuan yakni 3 perlakuan dengan menggunakan ekstrak teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* (10%, 20%, 30%) (b/v) dan 1 kontrol pembanding. Masing-masing perlakuan diuji daya hambatnya sebanyak 3 ulangan dengan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

Tabel 2. Rancangan Penelitian Uji Daya Hambat

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3

Perlakuan :

A : Kontrol

B : Ekstrak metanol 10%

C : Ekstrak metanol 20%

D : Ekstrak metanol 30%

Rancangan penelitian untuk uji toksisitas ekstrak kasar teh rumput laut coklat *Sargassum cristaefolium* dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. ini dilakukan dengan menggunakan lima taraf variasi konsentrasi larutan uji ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* mulai dari konsentrasi terendah sampai yang tertinggi yaitu 0 ppm (kontrol), 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan.

### 3.2.4 Parameter Uji

Parameter uji yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh. Untuk uji daya hambat / uji cakram parameternya berdasarkan luas zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing konsentrasi yang berbeda. Sedangkan untuk uji toksisitas parameternya berdasarkan jumlah *Artemia salina* Leach. yang mati pada tiap konsentrasi.

### 3.2.5 Analisis Data

Pada uji daya hambat /uji cakram untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1%, jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka

dilakukan uji BNJ pada taraf 5% untuk mengetahui perlakuan terbaik. Sedangkan pada uji toksisitas ditentukan berdasarkan analisis probit melalui tabel probit dan dibuat persamaan regresi linier :

$$y = bx + a$$

dimana : y = angka probit, dan x = log konsentrasi

Dari persamaan tersebut kemudian dihitung LC<sub>50</sub> dengan memasukkan nilai probit (50% kematian). Apabila pada kontrol ada larva yang mati, maka % kematian ditentukan dengan rumus Abbot (Meyer et al., 1982).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Pembuatan Ekstrak Teh *Sargassum cristaefolium*

Serbuk teh *Sargassum cristaefolium* kemudian dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol teknis (polar) dengan perbandingan 1:5 selama 2x24 jam. Maserasi dilakukan pada temperatur 40°C di dalam ruangan gelap sambil sesekali dilakukan pengocokan (penghomogenan). Ekstraksi ini menggunakan metode maserasi yaitu metode dengan merendam sampel dalam pelarut, dengan tujuan agar komponen bioaktif pada sampel *Sargassum cristaefolium* terlarut dalam pelarut metanol. Kemudian hasil maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring hingga diperoleh filtrat. Filtrat hasil maserasi dievaporasi dengan menggunakan *rotary vacum evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kasar *Sargassum cristaefolium*.

Proses pemisahan pelarut dilakukan dengan *rotary vacum evaporator* tujuannya agar pelarut dapat dipisahkan pada tekanan tinggi dan suhu yang lebih rendah daripada suhu titik didih pelarut yang digunakan sehingga senyawa dalam ekstrak tidak rusak (mendidih). Ekstrak hasil evaporasi ditampung dalam botol vial sehingga diperoleh ekstrak metanol yang bebas dari pelarut.

### 3.3.2 Uji Cakram

Menurut Wiyanto (2010), uji cakram yang distandarisasikan Kirby-Bauer (1966) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Langkah awal yang dilakukan pada uji cakram yaitu menyiapkan media pertumbuhan bakteri uji. Alur kerja pembuatan media dapat dilihat pada lampiran 1. Media yang digunakan yaitu TSA untuk menumbuhkan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Biakan murni bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan  $10^8$  koloni/mL koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Peremajaan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan cara menanam pada media TSA miring. Kemudian hasil penanamannya dipanen dan diambil menggunakan kawat ose lalu dimasukkan ke dalam NaFis 10%. Kemudian campuran bakteri tadi dihomogenkan dalam NaFis dan ditanam ke media TSA menggunakan pipet serologis sebanyak 0,1 ml. Setelah itu bakteri ditanam dengan metode tebar.

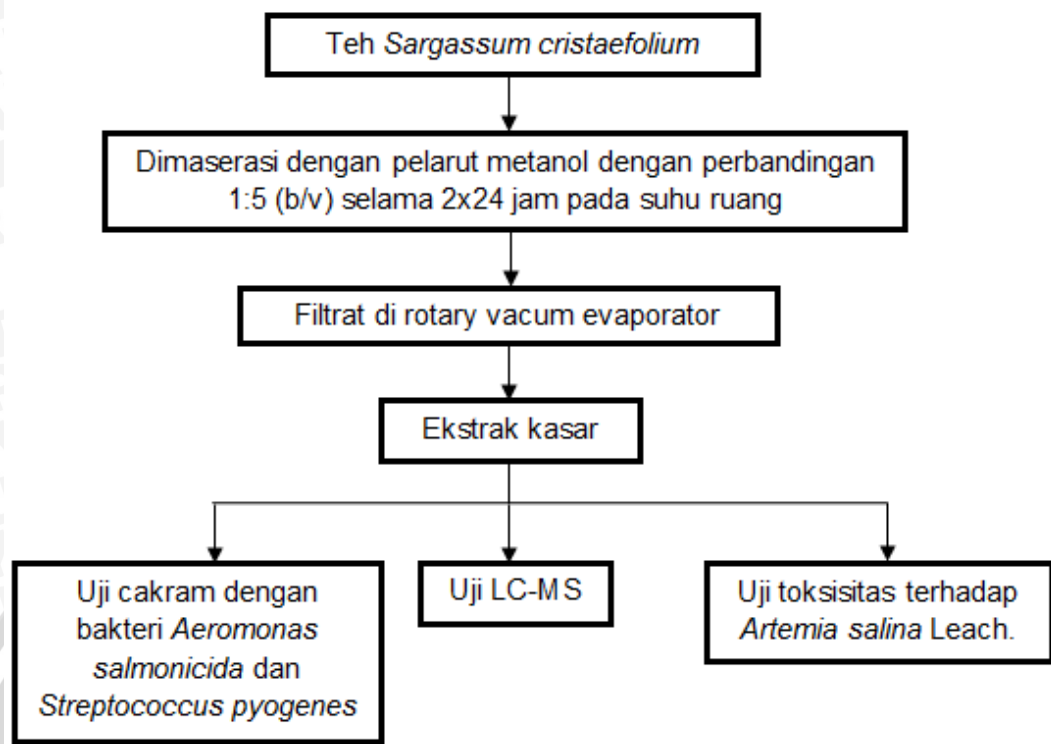
Kertas cakram direndam dalam ekstrak teh *Sargassum cristaefolium* dengan berbagai konsentrasi (10%, 20%, 30%) selama 15-30 menit. Kemudian kertas cakram tersebut ditempelkan pada TSA yang berisi bakteri dan diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Diamati dan diukur zona hambatan yang terdapat pada masing-masing cakram. Pengukuran zona hambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Alur kerja uji cakram menurut Kirby Bauer (1966) dapat dilihat pada lampiran 2. Penghambatan pertumbuhan bakteri penguji oleh ekstrak sampel yang memiliki kandungan antibakteri terlihat zona bening yang tidak ditumbuhi bakteri uji. Skema kerja penelitian dapat dilihat pada gambar 5.

### 3.3.3 Uji Toksisitas

Sebelum melakukan uji toksisitas terlebih dahulu menyiapkan hewan uji *Artemia salina* Leach. Penyiapan larva dilakukan dengan mengambil telur *Artemia salina* Leach. sebanyak 5 gram. Telur *Artemia salina* Leach. direndam di dalam air tawar selama 15-30 menit terlebih dahulu. Kemudian direndam dalam 10 liter air laut. Suhu penetasan adalah  $\pm 25-30^{\circ}\text{C}$  dan pH  $\pm 6-7$ . Telur akan menetas setelah 18-24 jam dan larvanya disebut nauplii. Nauplii siap untuk uji BST setelah larva ini berumur 48 jam (Awik, *et al.*, 2006).

Uji toksisitas pada *Artemia salina* Leach., larutan uji dengan konsentrasi 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dilakukan 3 kali pengulangan untuk setiap konsentrasi yang telah ditentukan pada masing-masing sampel dan dibandingkan dengan kontrol (0 ppm). Bejana uji yang digunakan adalah botol vial. 10 ekor *Artemia salina* Leach. dimasukkan ke dalam setiap botol vial yang sudah diberikan ekstrak larutan uji dengan konsentrasi yang berbeda. Pengamatan jumlah individu yang mati dilakukan selama 24 jam, dan pada akhir pengamatan dihitung jumlah total individu *Artemia salina* Leach. yang mati (Muadja, *et al.*, 2013).





Gambar 5. Skema Kerja Penelitian

### 3.3.4 LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry)

Pengujian LC-MS dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Kimia LIPI Serpong Tangerang Selatan. Uji LC-MS dilakukan untuk mengetahui senyawa daya antibakteri dari ekstrak terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

Pada uji LC-MS menurut Kazakevich dan Lubritto (2007), pemisahan sampel dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen-komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yaitu pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis

massa (memisahkan ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan tadi.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (ion source) yang akan menghasilkan ion dan analisa massa (mass analyzer) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis ion source dan mass analyzer yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing ion source dan mass analyzer memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Agilent, 2001).

Menurut Maryam (2007), Mass Spectrometer (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dari struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan komponen-komponen suatu senyawa. Perpaduan MS dengan HPLC (LC-MS) membuat alat ini semakin populer untuk mendeteksi berbagai senyawa termasuk mikotoksin.

## 4. PEMBAHASAN

### 4.1 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram)

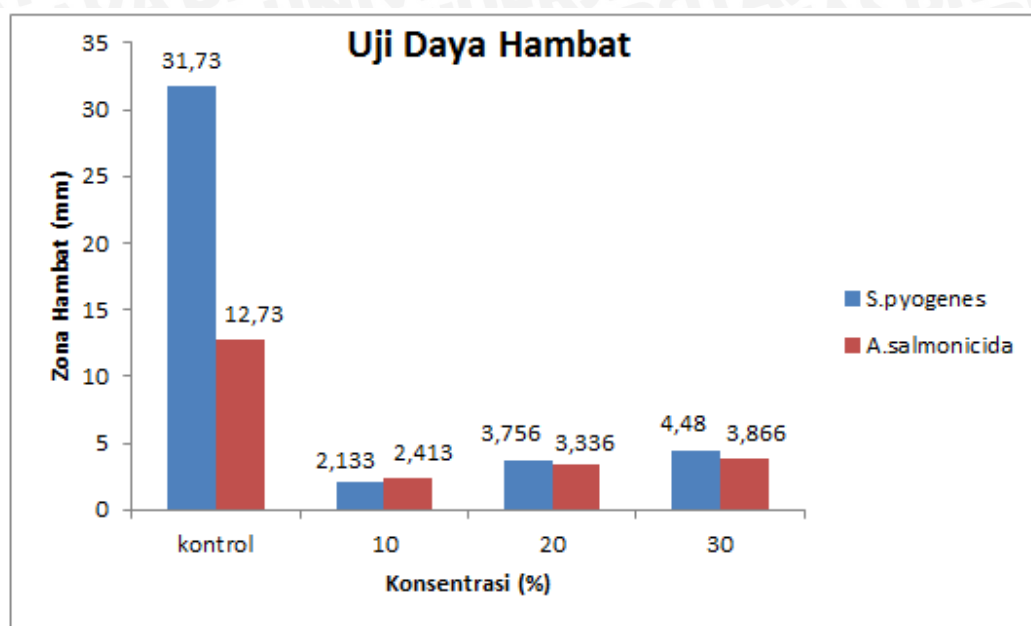
Uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* digunakan untuk mengetahui konsentrasi terbaik dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida*. Setelah dilakukan pengujian menggunakan uji cakram dengan penentuan luas zona bening, maka didapatkan hasil yang terbaik. Hasil terbaik ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida* disajikan dalam Gambar 6.



**Gambar 6. Hasil terbaik uji antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* (a) dan *Aeromonas salmonicida* (b).**

Gambar 6 menunjukkan hasil positif ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dalam menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida*. Hal ini dibuktikan dengan adanya zona bening yang terlihat di sekitar kertas cakram yang telah diberi ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium*. Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Lay (1994) bahwa kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Grafik zona hambat bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida* disajikan pada Gambar 7.



**Gambar 7. Zona hambat kontrol, bakteri *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida* dengan konsentrasi yang berbeda**

Gambar 7 menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* adalah pada konsentrasi 30% yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 4,48 mm. Sedangkan untuk menghambat *Aeromonas salmonicida* adalah pada konsentrasi 30% juga, yang menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 3,866 mm. Dari data diatas dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi berpengaruh terhadap daya hambat yang dihasilkan. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1986), bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula.

Grafik tersebut juga menunjukkan jumlah rata-rata dari setiap perlakuan pada kedua bakteri, mulai dari kontrol hingga konsentrasi 30%. Pada *Streptococcus pyogenes*, kontrol didapatkan rata-rata sebesar 31,73 mm,

konsentrasi 10% didapatkan rata-rata sebesar 2,133 mm, konsentrasi 20% didapatkan rata-rata sebesar 3,756 mm, dan konsentrasi 30% didapatkan rata-rata sebesar 4,48 mm. Pada *Aeromonas salmonicida*, kontrol didapatkan rata-rata sebesar 12,73 mm, konsentrasi 10% didapatkan rata-rata sebesar 2,413 mm, konsentrasi 20% didapatkan rata-rata sebesar 3,336 mm, dan konsentrasi 30% didapatkan rata-rata sebesar 3,866 mm.

Diketahui pula dari data tersebut bahwa daya hambat pada *Streptococcus pyogenes* lebih besar daripada *Aeromonas salmonicida*. Hal ini karena *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki sifat kurang sensitif terhadap komponen antibakteri. Struktur penyusun dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah berupa peptidoglikan dan lapisan dalam berupa lipopolisakarida, sehingga mempersulit senyawa antibakteri masuk kedalam selnya (Pelczar dan Chan, 1986). Oleh karena itu, bakteri *Aeromonas salmonicida* lebih tahan terhadap ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol dibandingkan dengan bakteri *Streptococcus pyogenes*.

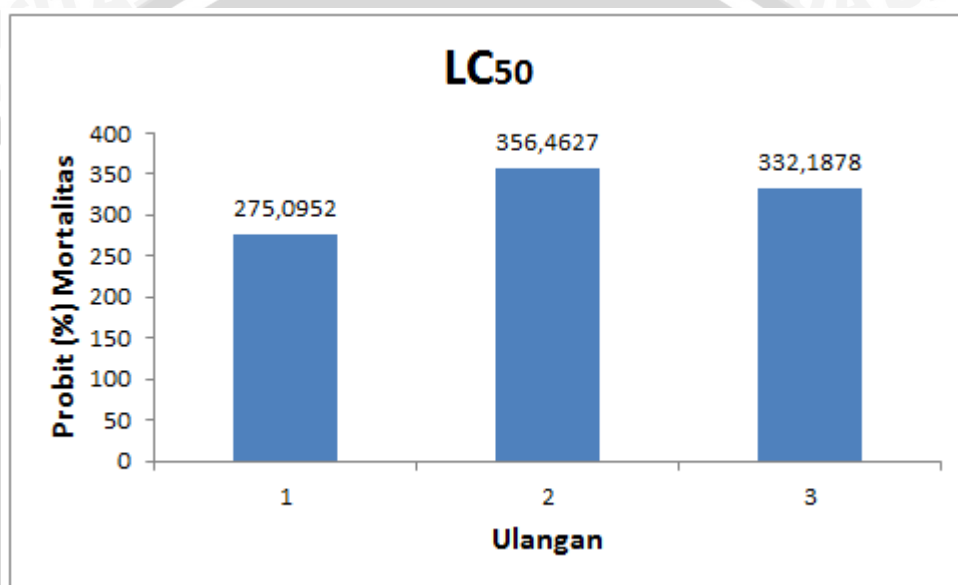
Faktor-faktor lain yang juga dianggap dapat mempengaruhi antara lain kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan temperatur inkubasi. Beberapa faktor yang juga mempengaruhi hal ini antara lain adalah pH lingkungan, komponen media, stabilitas obat, ukuran inokulum, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Brooks, *et al.*, 2005).

#### 4.2 Uji Toksisitas

Hasil uji toksisitas nilai LC<sub>50</sub> ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. didapatkan nilai LC<sub>50</sub> sebesar 321,2485 ppm. Hasil nilai LC<sub>50</sub> tersebut menunjukkan bahwa 50% kematian hewan uji *Artemia salina* Leach. pada konsentrasi larutan ekstrak kasar teh *Sargassum*

*cristaeifolium* pada saat konsentrasi 321,2485 ppm. Uji toksisitas ekstrak *Eucheuma alvarezii* terhadap *Artemia salina* Leach. sebagai studi potensi antikanker didapatkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 23,3346 ppm (Awik et al., 2006). Pengolahan dan perhitungan analisis probit uji toksisitas dapat dilihat pada Lampiran 7.

Grafik nilai  $LC_{50}$  hasil uji toksisitas disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 8. Grafik nilai  $LC_{50}$  hasil uji toksisitas ekstrak kasar teh *Sargassum cristaeifolium***

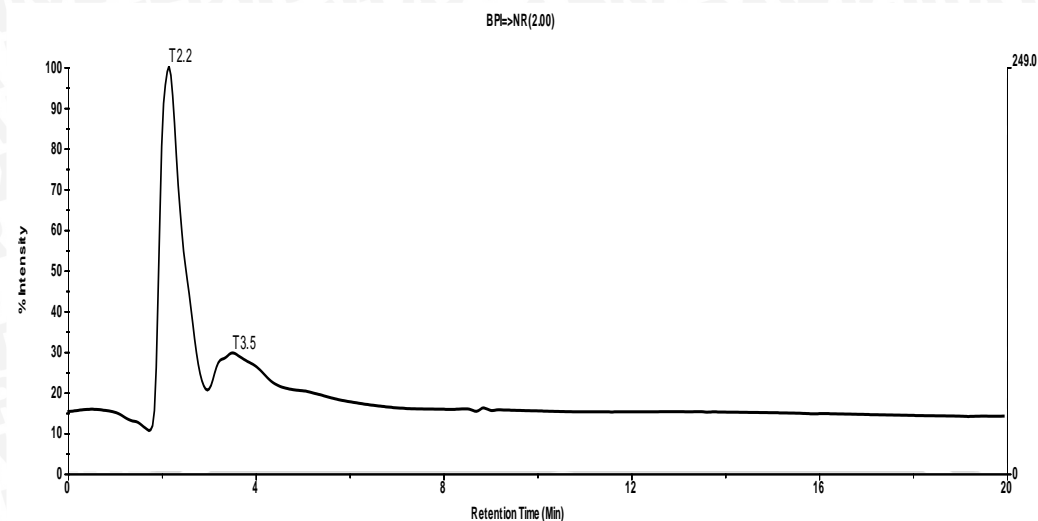
Dari grafik di atas dapat diketahui nilai  $LC_{50}$  paling tinggi yaitu pada ulangan 1 sebesar 275,0952 ppm. Nilai  $LC_{50}$  yang diperoleh dari hasil uji toksisitas memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif, karena hasil nilai  $LC_{50}$  yang telah didapatkan kurang dari 1000 ppm. Hal ini sejalan dengan pernyataan Meyer et al. (1982), menyatakan bahwa suatu ekstrak menunjukkan aktivitas ketoksikan dalam uji toksisitas jika ekstrak dapat menyebabkan kematian 50% hewan uji pada konsentrasi < 1000 ppm untuk ekstrak dan  $\leq 30$  ppm untuk suatu senyawa.

Taraf variasi konsentrasi larutan ekstrak pada penelitian ini menunjukkan pengaruh yang berbeda terhadap kematian larva *Artemia salina* Leach. Semakin

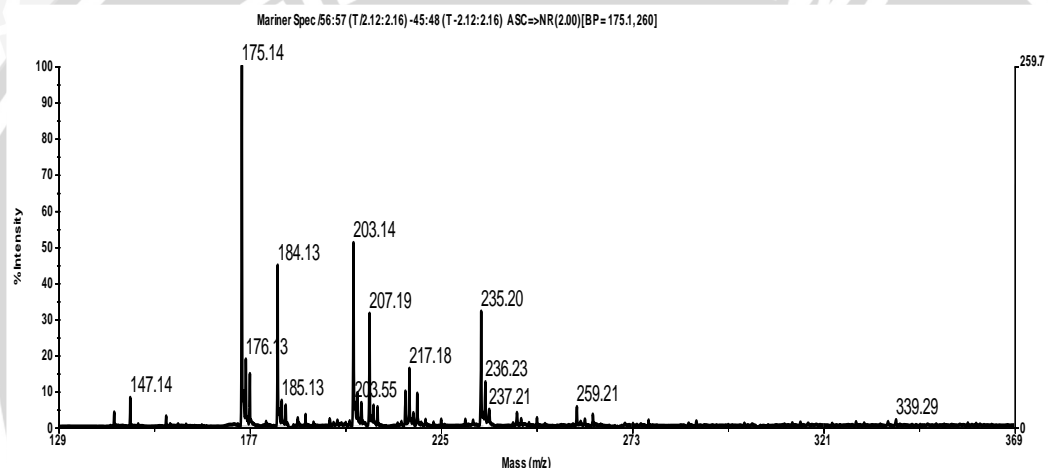
tinggi variasi beban konsentrasi ekstrak, maka semakin besar pula tingkat kematian hewan uji tersebut. Hasil yang sama juga didapatkan pada penelitian Agustin (2013), dengan metode *Brine Shrimp Lethality Test* melaporkan bahwa semakin besar konsentrasi suatu ekstrak maka kematian hewan uji akan semakin tinggi. Hasil penelitian yang sama dilakukan oleh Sriwahyuni (2010), melaporkan bahwa semakin besar nilai konsentrasi masing-masing ekstrak maka mortalitas terhadap *Artemia salina* Leach. juga semakin besar.

#### 4.3 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan LC-MS

Uji LC-MS – ESI (*Electrospray Ionisation*) ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang Selatan. Pengujian LC-MS – ESI bertujuan untuk mengidentifikasi berat molekul dari bioaktif pada ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium*. Analisis senyawa-senyawa antibakteri dengan metode uji LC-MS ditampilkan pada Gambar 9 dan Lampiran 8.



Rt 2.2



**Gambar 9. Hasil Analisis Uji LC-MS ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium***

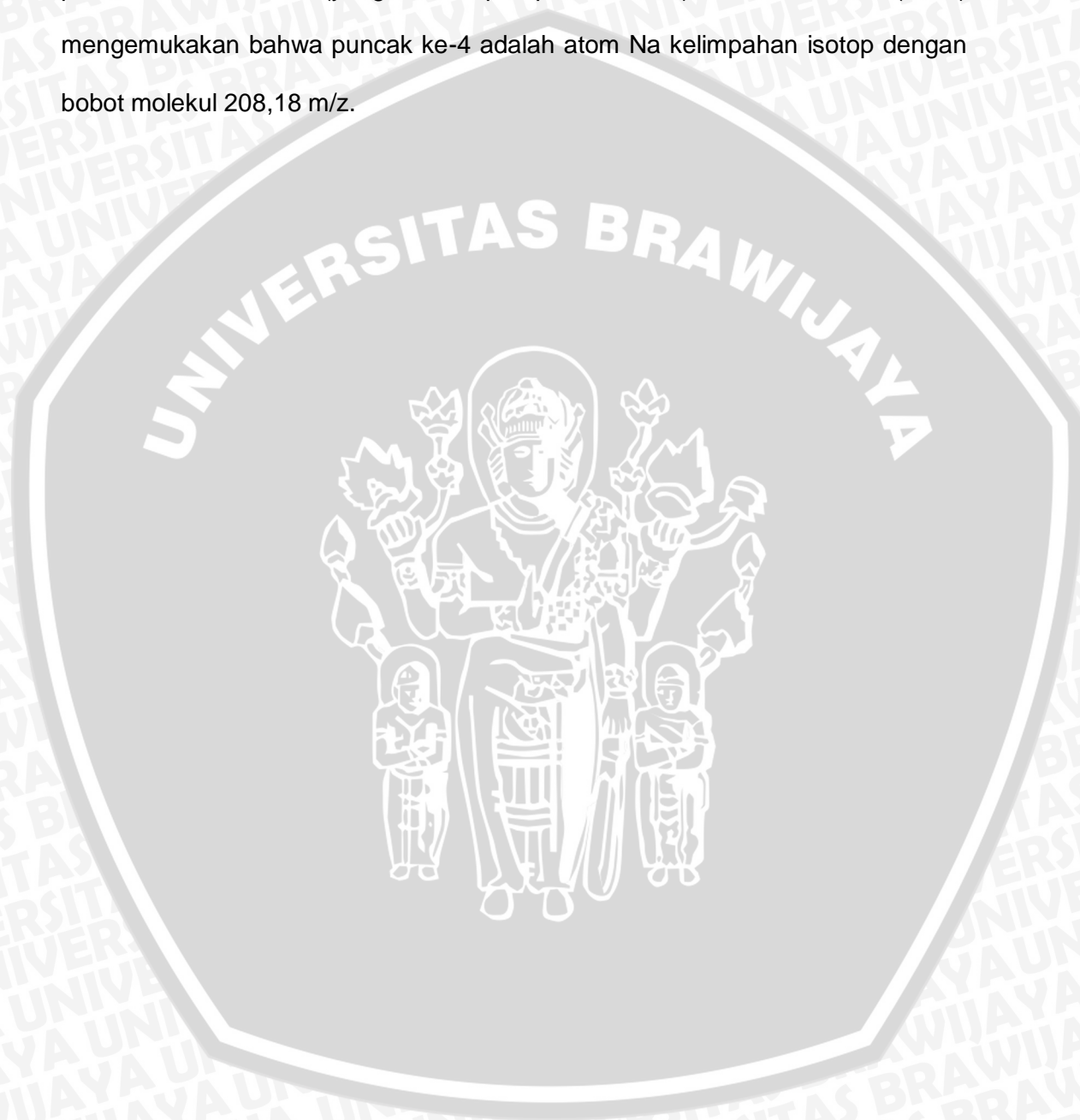
Hasil analisa uji LC-MS pada Rt 2.2 menunjukkan terdapat beberapa puncak ion yang menandakan fragmentasi berdasarkan berat molekulnya. Diduga senyawa pada Rt 2.2 memiliki pecahan molekul dengan kelimpahan terbanyak (base peak) dari fragmen-fragmen tersebut adalah 175,14 m/z. Daftar fragmentasi yang dihasilkan dapat dilihat pada Tabel 3.

Massa ion (m/z)	Dugaan pecahan ion molekul
208,18	$C_{12}H_{24}O-Na$
207,19	$C_{12}H_{24}O-Na$
184,13	$C_{12}H_{24}O$
175,14	$C_{12}H_{15}O$

**Tabel 3. Pecahan ion molekul senyawa dugaan**



Tabel 3 menunjukkan bahwa puncak pertama adalah senyawa dengan berat molekul 175,14 m/z, puncak kedua adalah berat molekul 184,13 m/z, sedangkan puncak ketiga adalah berat molekul 207,19 m/z, yang diduga ada penambahan ion Na (yang menempel pada ion H<sup>-</sup>). Kardono dkk., (2006) mengemukakan bahwa puncak ke-4 adalah atom Na kelimpahan isotop dengan bobot molekul 208,18 m/z.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol menghasilkan daya antibakteri terbaik dengan konsentrasi 30% pada *Streptococcus pyogenes* sebesar 4,48 mm. Sedangkan pada *Aeromonas salmonicida* konsentrasi terbaik pada konsentrasi 30% sebesar 3,866 mm. Untuk hasil uji toksisitas dengan hewan uji *Artemia salina* Leach. didapatkan nilai  $LC_{50}$  sebesar 321,2485 ppm.

### 5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut menggunakan isolat murni *Sargassum cristaefolium* dengan metode MIC dan MBC untuk mengetahui potensi bakteristatik maupun bakteriosidal. Kemudian mengenai identifikasi senyawa pada *Sargassum cristaefolium* disarankan menggunakan analisis identifikasi senyawa dengan spektrofotometri UV-Vis, FT-IR, dan NMR sehingga diketahui senyawa bioaktif yang terkandung secara mutlak.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdullah, C. dan Retnoningrum, D.S., 2003, Deteksi Bakteri Patogen *Streptococcus pyogenes* dengan Teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR), Jurnal Natur Indonesia, 6 (1), 1-4.
- Agilent, T. 2001. Agilent LC-MS Primer. USA 5988-204 EN.
- Agustian, R. R., Y. Ervia, S. Sri, 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Pigmen Kasar Mikroalga *Spirulina platensis* Dengan Metode Uji BSLT (Brine Shrimp Lethality Test). Journal Of Marine Research. Vol. 2. No. 1. Hal. 25-31.
- Andayani, R., Y. Lisawati dan Maimunah. 2008. Penentuan Aktivitas Antioksidan, Kadar Fenolat Total dan Likopen Pada Buah Tomat (*Solanum lycopersicum* L.). jurnal Sains dan Teknologi Farmasi, Vol. 13. No. 1. 2008. ISSN : 1410-0177.
- Angka L dan MT. Suhartono. 2000. Bioteknologi Hasil Laut. Bogor : Pusat Kajian Sumberdaya Pesisir dan Lautan. IPB. Bogor.
- Ansel, H.C. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. Edisi 4. UI Press. Jakarta. Hal. 96-147.
- Aras, T. R. 2013. Uji Toksisitas Ekstrak Teripang *Holothuria Scabra* Terhadap *Artemia salina*. Fakultas Ilmu Kelautan Dan Perikanan. Universitas Hasanuddin. Makassar.
- Aslan, L. M. 1998. Budidaya Rumput Laut. Jakarta : Kanisius. Hal. 13-15.
- Atmadja, WS. 1996. Pengenalan Jenis Algae Coklat (*Phaeophyta*). Pengenalan Jenis-jenis Rumput Laut Indonesia. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.
- Austin B , D. Austin. 2007. Bacterial Fish Pathogens Diseases of Farmed and Wild Fish. Fourth Edition. Springer.
- Awik, P. D. N., A. Nurlita, F. Rachmat. 2006. Uji Toksisitas Ekstrak *Euचेuma alvarezii* Terhadap *Artemia salina* Sebagai Studi Pendahuluan Potensi Antikanker. Jurnal Akta Kimia Indonesia. Vol. 2, No. 1, Hal. 41-46.
- Ayuningrat, E. 2009. Penapisan Awal Komponen Bioaktif Dari Kijing Taiwan (*Anadonta woodiana* Lea.) Sebagai Senyawa Antioksidan. IPB. Bogor.
- Branen, A.L dan P.M, Davidson. 1993. Antimicrobials in foods 2nd ed. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Brooks, G.F., S.B. Janet, A.M. Stephen, 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.

Buchanan, RE. , NE. Gibbons, ed, 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eight ed. The William & Wilkins Company. Baltimore. USA

Cunningham, M. W. 2000. Phatogenesis of Group A Streptococcal Infection. *Clinical Microbiology Revition*, 13 (3). 470-511.

Departemen Kesehatan RI. 2000. Acuan Sediaan Herbal. Jakarta: Direktorat Jendral POM-Depkes RI.

Ditjen POM. (1989). *Materia Medika Indonesia*. Jilid V. Departemen Kesehatan. RI. Jakarta. Hal 41.

DKP. 2009. Pengendalian Penyakit Ikan. Buku Saku. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

Dwidjoseputro, D. 1998. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Cetakan ke 13. Penerbit Djambatan. Jakarta.

Emslie, S. 2003. *Artemia Salina*. [http://animaldiversity.org/accounts/Artemia\\_salina.html](http://animaldiversity.org/accounts/Artemia_salina.html). (23 November 2015).

Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis* 3<sup>rd</sup> ed. England. Cambridge University Press.

Ganiswara, G.S. 1995. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. Halaman 517-518, 571-573, 651-656, 682-685.

Ginting, J. 2008. *Isolasi Bakteri dan Uji Aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara*. Universitas Sumatera Utara. Medan. Skripsi.

Googleimage<sup>a</sup>. 2015. *Sargassum cristaefolium*. <https://www.google.co.id/search?q=sargassum+cristaefolium>. Diakses 8 Oktober 2015.

Googleimage<sup>b</sup>. 2015. *Aeromonas salmonicida*. <https://www.google.co.id/search?q=aeromonas+salmonicida>. Diakses 8 Oktober 2015.

Googleimage<sup>c</sup>. 2015. *Streptococcus pyogenes*. <https://www.google.co.id/search?q=streptococcus+pyogenes>. Diakses 8 Oktober 2015.

Googleimage<sup>d</sup>. 2015. *Artemia salina* Leach. <https://www.google.co.id/search?q=artemia+salina+leach>. Diakses 8 Oktober 2015.

Harborne, J. B. 1978. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB. Bandung.

Hart, H. 1983. *Organic Chemistry, a Short Course, Sixth Edition*, Michigan State University. Houghton Mifflin Co.

Holt. J. G., N. R. Kreig., P. H. A. Sneath and J. T. Staley. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. United States of America.

- Ibrahim, M., A. Akhyar, I. Y. Nur, 2012. Uji Lethal Dose 50% (LD<sub>50</sub>) Poliherbal (*Curcuma xanthorriza*, *Kleinhovia hospita*, *Nigella sativa*, *Arcangelisia flava* dan *Ophiocephalus striatus*) Pada Heparmin Terhadap Mencit (*Mus musculus*). Research & Development. PT. Royal Medicalink Pharmalab.
- Inayati, H. 2007. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Kedondong Bangkok. Departemen Biologi FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Jawetz, E., J.L Melnick and E. Adelberg. 1995. *Medical Microbiology*. Apleton and Lange. New York.
- Kabata, Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics. Taylor and Francis. London.
- Kadi, A. 2005. Beberapa Catatan Kehadiran Marga *Sargassum* Di Perairan Indonesia. Jakarta : Bidang Sumberdaya Laut, Puslitbang Oseanologi – LIPI.
- Kartika, H. P. 2011. Pemanfaatan Rumput Laut Coklat (*Sargassum Sp.*) Sebagai Serbuk Minuman Pelangsing Tubuh. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Kazakevich, Y. , R. Lobrutto. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey : John Wiley & Sons, 282.
- Khopkar, S. M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Alih bahasa oleh A. Saptorahardjo. Jakarta: UI Press.
- Kusmiyati dan N.W.S. Agustini. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Cibinong.
- Lay, B. H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lindsay, S. 1992. High Performance Liquid Chromatography. Second Edition. New York, Chichester Brisbane. Toronto, Singapore : John Wiley & Sons, 157.
- Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. Jurnal Mikotoksin Indonesia 7 (1-2): 12-24.
- McLaughlin, J.I. 1991. Crown Gall Tumours On Potato Disc and Brine Shrimp Lethality. Two Simple Bioassay For Higher Plant Screening and Fractination. Methods in Plant Biochemistry 6: 1-30.
- Meyer, B. N., N. Ferrigni, R., J.E. Putnam, L. B. Jacobson, D.E. Nichols, J.L. McLaughlin, 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica, 45: 31-34 pp.

- Misra, H. D., B. Mehta, K. Mehta, M. Soni, D. C. Jain. 2008. Study of Extraction and HPTLC-UV Method for Estimation of Caffeine in Marketed Tea (*Camellia sinensis*) Granules. International Journal of Green Pharmacy : 47-51.
- Muadja, A.D., S.J.K. Harry, R.J.R. Max, 2013. Uji Toksisitas Dengan Metode BSLT dan Analisis Kandungan Fitokimia Ekstrak Daun Soyogik (*Saurauia bracteosa* DC) Dengan Metode Soxhletasi. Jurnal MIPA UNSRAT Online. Vol. 2, hal. 115-118.
- Mudjiman. 1983. Udang Renik Air Asin (*Artemia salina*). Jakarta : Bhatara.
- Mujahid, R., Awai P.K.D., Nita, S. 2011. Maserasi Sebagai Alternatif Ekstraksi pada Penetapan Kadar Kurkuminoid Siplisia Temulawak (*Curcuma xanthorriza* Roxb). Universitas Wahid Hasyim Semarang.
- Nazir, M. 1989. Metode Penelitian. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Panjaitan, Rido Bertomi. 2011. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Kulit Batang Pulasari (*Alixiae cortex*) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BST). Fakultas Farmasi. Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Pelczar, M.J., and E.C.S. Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 1 dan Jilid 2. UI Press, Jakarta.
- Permana, R.A. 2008. Karakteristik Serbuk Minuman Sari Buah Jeruk Lemon (*Citrus medica* var lemon) Dengan Penambahan Na-Alginat Yang Diekstraksi Dari Rumput Laut *Sargassum filipendula*. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. IPB. Bogor.
- Puskari. (2007) Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri. Pusat Karantina Ikan. Jakarta. 1-4.
- Rivai, Harrizul. 1995. Asas Pemeriksaan Kimia. Jakarta: Penerbit UI Press.
- Romiyanto, A. 2014. Study Kandungan  $\beta$ -Karoten pada Rumput Laut Merah (*Eucheuma spinosum*) dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT). Universitas Brawijaya. Malang.118 hlm.
- Septiana, T. A., A. Asnani, 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat *Sargassum duplicatum* Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. Jurnal Agointek. Vol. 6. No. 1.
- Setianto, R. H. B. 2009. Deteksi dan Uji Toksisitas LC<sub>50</sub> Senyawa Aflatoksin B1, B2, G1, G2 Pada Kacang Tanah (*Arachis hypogaea* L.). Departemen Biokimia FMIPA. IPB. Bogor.
- Singarimbun, M., S. Effendi. 1987. Metode Penelitian Survei. LP3E.
- Soemirat, J. 2005. Toksikologi Lingkungan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.

- Suhirman, S., Hermani., S. Cheppy, 2006. Uji Toksisitas Ekstrak Lempuyang Gajah (*Zingiber zerumbet*) Terhadap Larva Udang (*Artemis salina* Leach.) Balai Besar Penelitian Obat dan Aromatik dan Pasca Panen Pertanian. Buletin. Littra, Vol. XVII, No. 1, hal. 30-38.
- Sulistyo. 1971. *Farmakologi dan Terapi*. EKG. Yogyakarta.
- Sumino. A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Patin (*Pangasioniodon hypophthalmus*). Jurnal Sain Veteriner. ISSN: 0126-0421.
- Surachmad, W. 1994. Pengantar Penelitian-Penelitian Ilmiah : dasar Metoda Teknik. Tarsito. Bandung. 338 hlm.
- Suryaningrum, D. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antioksidan Dari Rumput Laut *Halymenia harveyana* dan *Euचेuma cottonii*. Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan. Vol. 1, No. 1.
- Suryasubrata, S. 1989. Metode Penelitian. Rajawali. Jakarta.
- Suwandi, U. 1992. Mekanisme Kerja Antibiotik. Cermin Dunia Kedokteran No. 76. Jakarta. Pusat Penelitian dan Pengembangan. P.T. Kalbe Farma.
- Utami, T.S., R. Arbianti, H. Hermansyah, dan A. Reza. 2009. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpur (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA. Departemen Teknik Kimia. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Depok. Laporan Penelitian.
- Vogel, A. I. 1987. Textbook of Practical Organic Chemistry. Revised by Furries B.S. 2<sup>nd</sup> Edition. New York.
- Wakhidatur, R. 2011. Daya Antibakteri Ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan Berbagai Pelarut Terhadap *Eschericia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Universitas Brawijaya. Skripsi.
- Winarno, 1996. Teknologi Pengolahan Rumput Laut. Pustaka Sinar Harapan. Jakarta.
- Wiyanto, D. B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. Jurnal Kelautan, 3 (1) : 1-17.
- Yunizal. 2004. Teknik Pengolahan Alginat. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan. Jakarta.

## Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Media TSA

### Komposisi Media Tryptone Soya Agar (TSA)

Formula	Gram / Liter
Tryptone	15
Soya Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Sumber : Fardiaz (1993)

#### Prosedur Pembuatan :

1. Ditimbang 9,6 gram bubuk media TSA.
2. Dimasukkan erlenmeyer 250 mL.
3. Ditambahkan aquades sedikit demi sedikit sambil digoyang sampai 1 liter.
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit.
5. Selama pemanasan di waterbath sesekali erlenmeyer digoyang untuk membantu pelarutan (supaya homogen).
6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer berarti media telah homogen.
7. Media didinginkan sampai suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  (hangat-hangat kuku).
8. Tutup cawan dibiarkan sedikit terbuka untuk mengeluarkan uap panas.
9. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilisasi medium.
10. Jika melewati uji sterilisasi media sudah siap untuk digunakan.



## Lampiran 2. Tahapan Pelaksanaan Uji Cakram Metode Kirby-Bauer (1966)

Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram metode Kirby-Bauer (1966) adalah sebagai berikut :

1. Lempeng agar TSA ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji.
2. Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD : 0,1 CFU/ml, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.
3. Sebar mikroorganisme pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 90°C dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45°C dan dibuat olesan ketiga.
4. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.
5. Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 macam dosis perlakuan, jarak antara kertas cakram harus cukup luas sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat.
6. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu keras karena akan merusak permukaan agar.
7. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
8. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata dan terlihat adanya zona jernih, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

Lampiran 3. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram Bakteri  
*Staphylococcus pyogenes*

1. Data Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Tabel Rata-Rata Diameter Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
10%	1,69	2,49	2,22	6,4	2,13333
20%	3,7	3,92	3,65	11,27	3,75666
30%	4,98	3,99	4,47	13,44	4,48
Total				31,11	10,37

2. Analisis Sidik Ragam (ANOVA)

2.1 Hipotesis :

$H_0$  = tidak ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

$H_1$  = ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

$f_{hitung} < f_{0,05}$  terima  $H_0$  ; tidak ada perbedaan nyata

$f_{hitung} > f_{0,05}$  terima  $H_1$  ; ada perbedaan nyata

2.2 Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

2.2.1 Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\sigma^2}{r n} = \frac{(31,11)^2}{3 \times 3} = \frac{967,8321}{9} = 107,5369$$

2.2.2 Jumlah Kuadrat Total (JK Total)

$$\begin{aligned} JK_{Total} &= (1,69^2 + 2,49^2 + 2,22^2 + \dots + 4,47^2) - FK \\ &= 117,0649 - 107,5369 \\ &= 9,528 \end{aligned}$$

2.2.3 Jumlah Kuadrat Perlakuan (JK Perlakuan)

$$\begin{aligned} JK_{Perlakuan} &= \left( \frac{6,4^2 + 11,27^2 + 13,44^2}{3} \right) - FK \\ &= 116,20217 - 107,5369 \\ &= 8,665267 \end{aligned}$$

## 2.2.4 Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned}JK_{\text{Galat}} &= JK_{\text{Total}} - JK_{\text{Perlakuan}} \\ &= 9,528 - 8,665267 \\ &= 0,862733\end{aligned}$$

## 2.3 Analysis of variance (ANOVA)

Tabel Analisa Ragam Daya Hambat

SK	db	JK	KT (JK/db)	Fhit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	8,665267	4,332634	30,13192	5,14	10,92
Galat	6	0,862733	0,143789			
Total	8	9,528				

Kesimpulan :  $f_{\text{hitung}} > f_{0,01}$

terima  $H_1$  ; perbedaan sangat nyata

## 3. Menentukan Konsentrasi yang Paling Potensial (BNT 5%)

### 3.1 Perhitungan BNT 5%

$$BNT_{5\%} = t_{5\%(\text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \cdot KT_{\text{galat}}}{\text{ulangan}}}$$

$$\begin{aligned}BNT_{0,05} &= t_{0,05(6)} \times \sqrt{\frac{2 \cdot (0,143789)}{3}} \\ &= 2,447 \times 0,30961153 \\ &= 0,7576\end{aligned}$$

### 3.2 Notasi BNT 5%

Tabel Notasi BNT 5%

Konsentrasi	10% (6,4)	20% (11,27)	30% (13,44)	Notasi
10% (6,4)	0	-	-	a
20% (11,27)	4,87	0	-	ab
30% (13,44)	7,04	2,17	0	b
Notasi $BNT_{0,05}$	0,7576			

Kesimpulan:

Dari notasi BNT 5% yang dihasilkan, konsentrasi yang paling berpotensi untuk menghambat bakteri *S. Aureus* adalah konsentrasi 30% dengan notasi yang dihasilkan b.

Lampiran 4. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram Bakteri *Aeromonas salmonicida*

1. Data Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Tabel Rata-Rata Diameter Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
10%	2,47	2,87	1,9	7,24	2,413333
20%	2,49	3,92	3,6	10,01	3,336667
30%	4,15	3,99	3,46	11,6	3,866667
Total				28,85	9,616667

2. Analisis Sidik Ragam (ANOVA)

2.1 Hipotesis :

$H_0$  = tidak ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

$H_1$  = ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

$f_{hitung} < f_{0,05}$  terima  $H_0$  ; tidak ada perbedaan nyata

$f_{hitung} > f_{0,05}$  terima  $H_1$  ; ada perbedaan nyata

2.2 Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

2.2.1 Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\sigma^2}{r n} = \frac{(28,85)^2}{3 \times 3} = \frac{832,3225}{9} = 92,480278$$

2.2.2 Jumlah Kuadrat Total (JK Total)

$$\begin{aligned} JK_{Total} &= (2,47^2 + 2,87^2 + 1,9^2 + \dots + 3,46^2) - FK \\ &= 97,5885 - 92,480278 \\ &= 5,108222 \end{aligned}$$

2.2.3 Jumlah Kuadrat Perlakuan (JK Perlakuan)

$$\begin{aligned} JK_{Perlakuan} &= \left( \frac{7,24^2 + 10,01^2 + 11,6^2}{3} \right) - FK \\ &= 95,7259 - 92,480278 \\ &= 3,245622 \end{aligned}$$

## 2.2.4 Jumlah Kuadrat Galat

$$\begin{aligned}JK_{\text{Galat}} &= JK_{\text{Total}} - JK_{\text{Perlakuan}} \\ &= 5,108222 - 3,245622 \\ &= 1,8626\end{aligned}$$

## 2.3 Analysis of variance (ANOVA)

Tabel Analisa Ragam Daya Hambat

SK	db	JK	KT (JK/db)	Fhit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	3,245622	1,622811	5,227567	5,14	10,92
Galat	6	1,8626	0,310433			
Total	8	5,108222				

Kesimpulan :  $f_{\text{hitung}} > f_{0,05}$

terima  $H_1$  ; perbedaan nyata

## 3. Menentukan Konsentrasi yang Paling Potensial (BNT 5%)

### 3.1 Perhitungan BNT 5%

$$BNT_{5\%} = t_{5\%(\text{db galat})} \times \sqrt{\frac{2 \text{KT}_{\text{galat}}}{\text{ulangan}}}$$

$$\begin{aligned}BNT_{0,05} &= t_{0,05(6)} \times \sqrt{\frac{2(0,310433)}{3}} \\ &= 2,447 \times 0,4549234 \\ &= 1,1132\end{aligned}$$

### 3.2 Notasi BNT 5%

Tabel Notasi BNT 5%

Rata-rata diameter	10% (7,24)	20% (10,01)	30% (11,6)	Notasi
10% (7,24)	0	-	-	a
20% (10,01)	2,77	0	-	ab
30% (11,6)	4,36	1,59	0	b
Notasi $BNT_{0,05}$	1,1132			

Kesimpulan:

Dari notasi BNT 5% yang dihasilkan, konsentrasi yang paling berpotensi untuk menghambat bakteri *A.salmonicida* adalah konsentrasi 30% dengan notasi yang dihasilkan b.

## Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji (Ekstrak kasar)

### ➤ Larutan Ekstrak Konsentrasi 2000 ppm

$$\frac{x}{20 \text{ ml}} = \frac{2000}{1000000}$$

$$x \times 1000000 = 20 \times 2000$$

$$x = \frac{40000}{1000000}$$

$$x = 0,04 \text{ gram}$$

Ekstrak kasar 0,04 gram ditambah air laut sampai volumenya 20 ml, maka dihasilkan 2000 ppm.

### ➤ Larutan Ekstrak Konsentrasi 1000 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 = 5 \text{ ml} \times 1000$$

$$V_1 = \frac{5000}{2000} = 2,5 \text{ ml}$$

Mengambil 2,5 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 5 ml, maka dihasilkan 1000 ppm.

### ➤ Larutan Ekstrak Konsentrasi 500 ppm

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 = 5 \text{ ml} \times 500$$

$$V_1 = \frac{2500}{2000} = 1,25 \text{ ml}$$

Mengambil 1,25 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 5 ml, maka dihasilkan 500 ppm.

➤ **Larutan Ekstrak Konsentrasi 250 ppm**

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 = 5 \text{ ml} \times 250$$

$$V_1 = \frac{1250}{2000} = 0,625 \text{ ml}$$

Mengambil 0,625 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 5 ml, maka dihasilkan 250 ppm.

➤ **Larutan Ekstrak Konsentrasi 125 ppm**

$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 = 5 \text{ ml} \times 125$$

$$V_1 = \frac{625}{2000} = 0,3125 \text{ ml}$$

Mengambil 0,3125 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 5 ml, maka dihasilkan 125 ppm.

➤ **Larutan Ekstrak Konsentrasi 62,5 ppm**

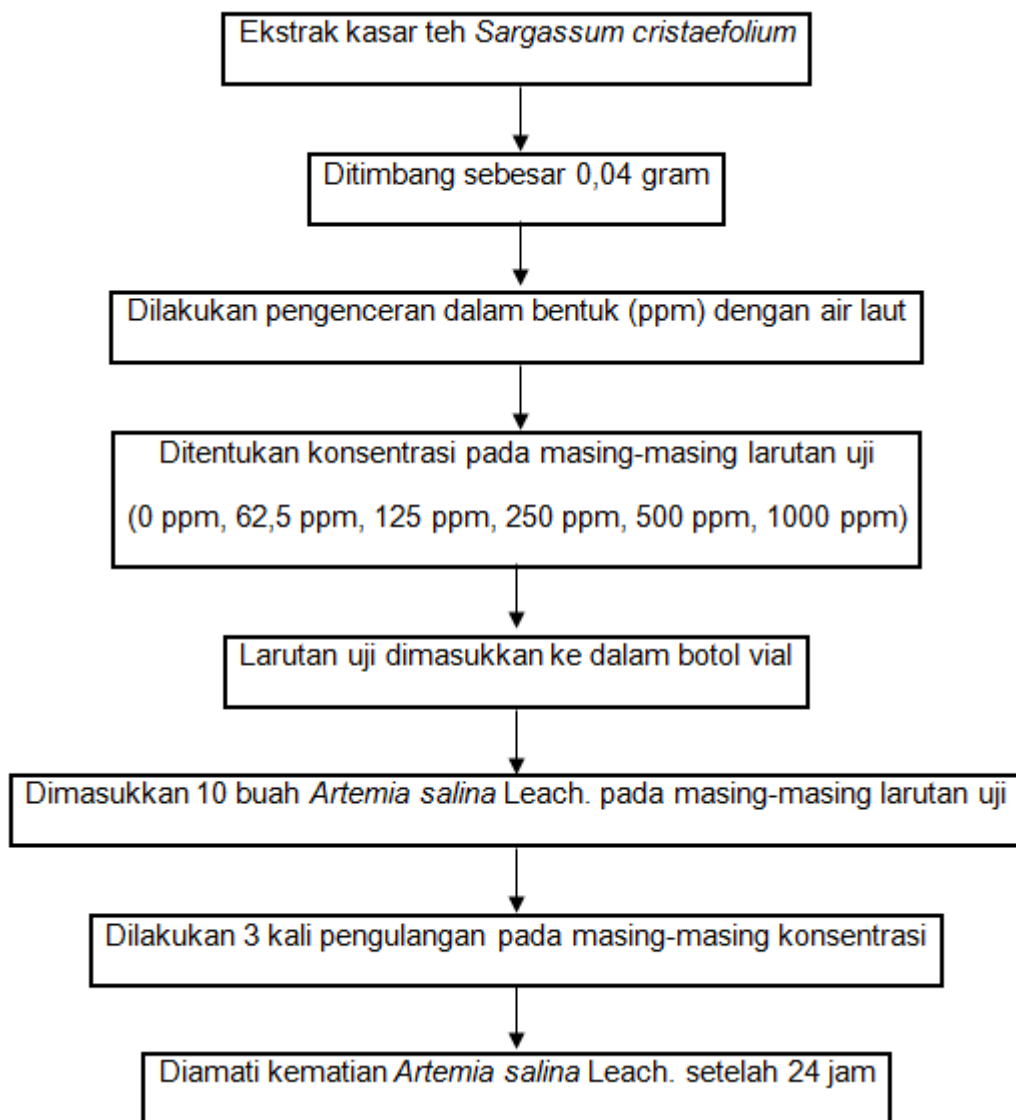
$$V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$$

$$V_1 \times 2000 = 5 \text{ ml} \times 62,5$$

$$V_1 = \frac{312,5}{2000} = 0,156 \text{ ml}$$

Mengambil 0,156 ml dari konsentrasi 2000 ppm dan ditambahkan air laut sampai 5 ml, maka dihasilkan 62,5 ppm.

Lampiran 6. Skema Uji Toksisitas Terhadap *Artemia salina* Leach.





## Lampiran 7. Pengolahan Data Hasil Uji Toksisitas

Tabel Data Uji Toksisitas

Konsentrasi	Jumlah kematian		
	U1	U2	U3
Kontrol	0	0	0
62,5 ppm	1	1	1
125 ppm	2	2	2
250 ppm	5	4	4
500 ppm	6	5	6
1000 ppm	9	8	8

Pengolahan data dengan analisis probit pada ulangan 1 dengan mencari % kematian *Artemia* yaitu dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ kematian } Artemia = \frac{\text{jumlah } Artemia \text{ mati}}{\text{jumlah } Artemia \text{ uji}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{0}{10} \times 100\% = 0\%$$

$$62,5 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{1}{10} \times 100\% = 10\%$$

$$125 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{2}{10} \times 100\% = 20\%$$

$$250 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{5}{10} \times 100\% = 50\%$$

$$500 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{6}{10} \times 100\% = 60\%$$

$$1000 \text{ ppm } \% \text{ kematian } Artemia = \frac{9}{10} \times 100\% = 90\%$$

Hasil dari % kematian Artemia pada setiap variasi konsentrasi ditentukan nilai % probit dengan melihat tabel probit persentase mortalitas.

**Tabel Nilai Probit Persentase Mortalitas**

%Mortalitas	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.30	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

Keterangan :

kisaran angka (+) 1 – 9 % Mortalitas

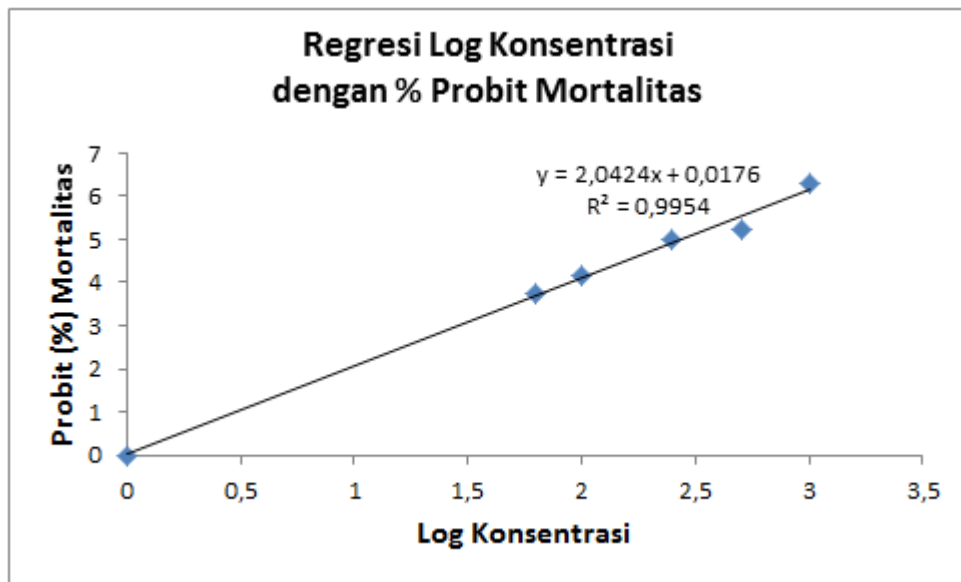
Misal pada ulangan 1 : untuk respon mortalitas 0%, 10%, 20%, 50%, 60%, 90% maka nilai probit sebesar 3.72, 4.16, 5.00, 5.25 dan 6.28 (nilai % probit ditunjukkan dengan blok warna hijau ) )

Setiap konsentrasi kemudian dilogaritmakan.

Log 0 = 0. Log 62,5 = 1,8. Log 125 = 2. Log 250 = 2,4. Log 500 =2,7. Log 1000=3

Sehingga didapatkan log konsentrasi dan % probit mortalitas, kemudian dimasukkan ke dalam *microsoft excel* sehingga diperoleh persamaan pada grafik.

Log konsentrasi	% probit
0	0
1,8	3,72
2	4,16
2,4	5
2,7	5,25
3	6,28



**Gambar 12. Grafik Regresi Log Konsentrasi dengan Probit (%) Mortalitas Ulangan 1**

Didapatkan persamaan  $y = 2,0424x + 0,0176$

Dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut (y) sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji.

$$y = 2,0424x + 0,0176$$

$$5 = 2,0424x + 0,0176$$

$$5 - 0,0176 = 2,0424x$$

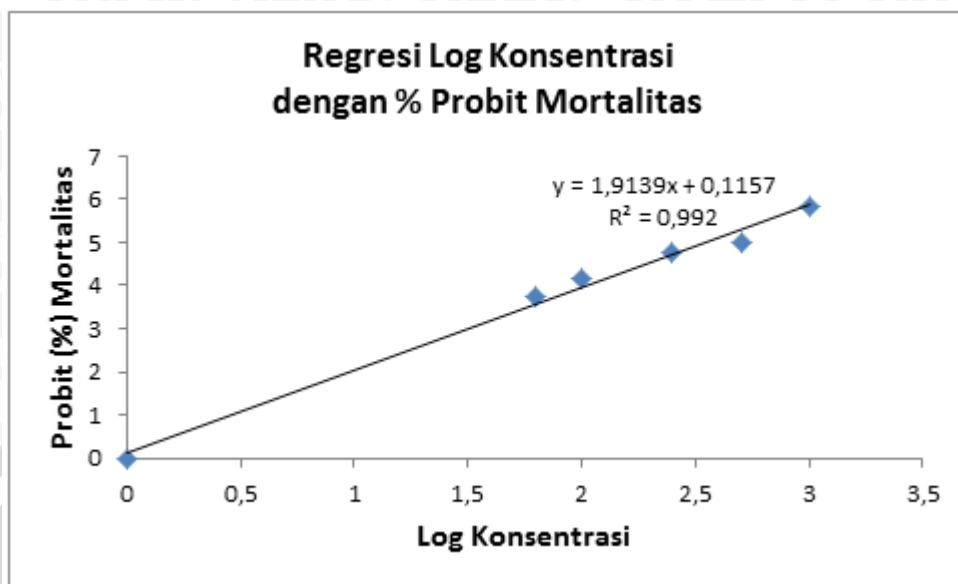
$$4,9824 = 2,0424x$$

$$x = \frac{4,9824}{2,0424} = 2,439483$$

Anti logaritma dari 2,439483 = 275,0952

$$LC_{50} = 275,0952 \text{ ppm}$$

Dengan cara perhitungan yang sama ulangan 2 didapatkan persamaan pada grafik.



**Gambar 13. Grafik Regresi Log Konsentrasi dengan Probit (%) Mortalitas Ulangan 2**

Didapatkan persamaan  $y = 1,9139x + 0,1157$

Dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut (y) sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji.

$$y = 1,9139x + 0,1157$$

$$5 = 1,9139x + 0,1157$$

$$5 - 0,1157 = 1,9139x$$

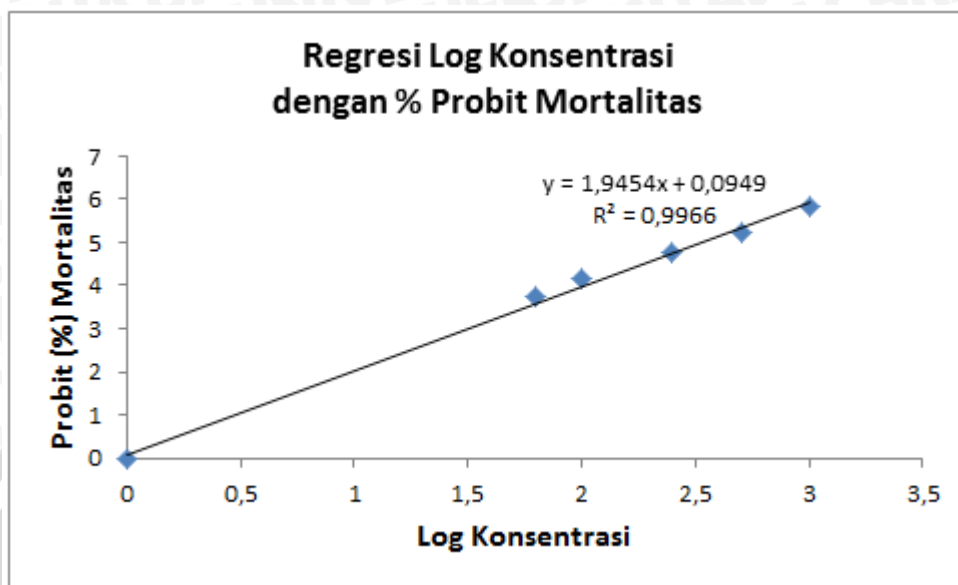
$$4,8843 = 1,9139x$$

$$x = \frac{4,8843}{1,9139} = 2,5520142$$

Anti logaritma dari 2,5520142 = 356,4627

**LC<sub>50</sub> = 356,4627 ppm**

Dengan cara perhitungan yang sama ulangan 3 didapatkan persamaan pada grafik.



**Gambar 14. Grafik Regresi Log Konsentrasi dengan Probit (%) Mortalitas Ulangan 3**

Didapatkan persamaan  $y = 1,9454x + 0,0949$

Dengan memasukkan nilai probit 5 (50% kematian) ke persamaan tersebut (y) sehingga diperoleh konsentrasi yang menyebabkan 50% kematian hewan uji.

$$y = 1,9454x + 0,0949$$

$$5 = 1,9454x + 0,0949$$

$$5 - 0,0949 = 1,9454x$$

$$4,9051 = 1,9454x$$

$$x = \frac{4,9051}{1,9454} = 2,5213838$$

Anti logaritma dari 2,5213838 = 332,1878

**LC<sub>50</sub> = 332,1878 ppm**

Dari ketiga ulangan didapatkan total **LC<sub>50</sub> = 963,7457 ppm**

Sehingga didapatkan rata-rata  $LC_{50} = 321,2485$  ppm

**Lampiran 8. Hasil Uji LC-MS – ESI pada ekstrak kasar teh *Sargassum cristaefolium***

*S.cristaefolium* Metanol

Vol injection 2 ul

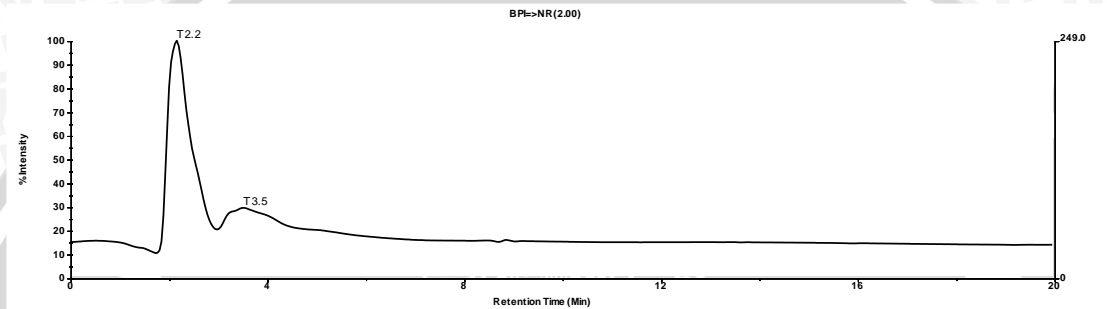
Flow 0.1 ml/min

Collumn C-18 (15mm x 1 mm)

Eluent MeOH

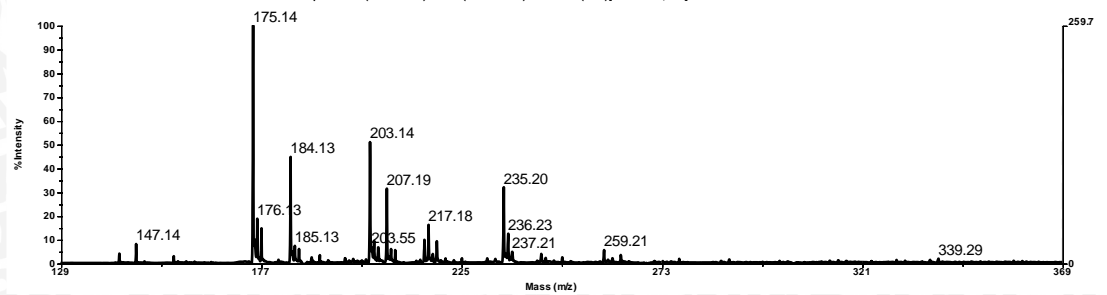
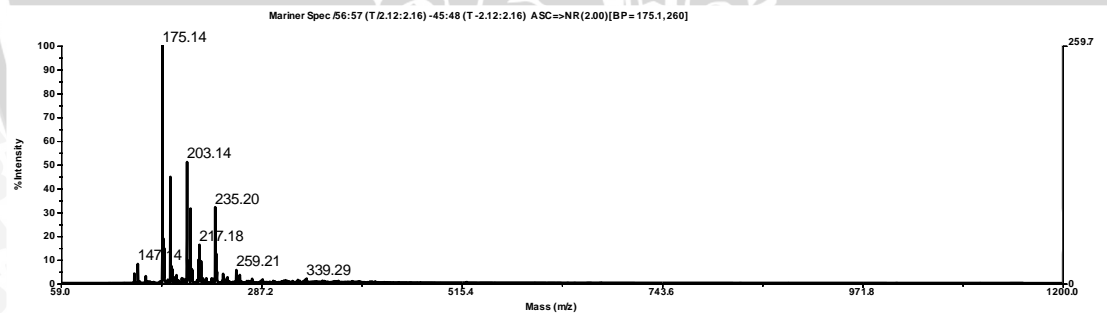
Operating by : Puspa D N Lotulung

LC MS –ESI pos ion



Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.163933	1.775217	2.941383	249	3260.19
2	3.524233	3.019333	7.437517	73	1405.75

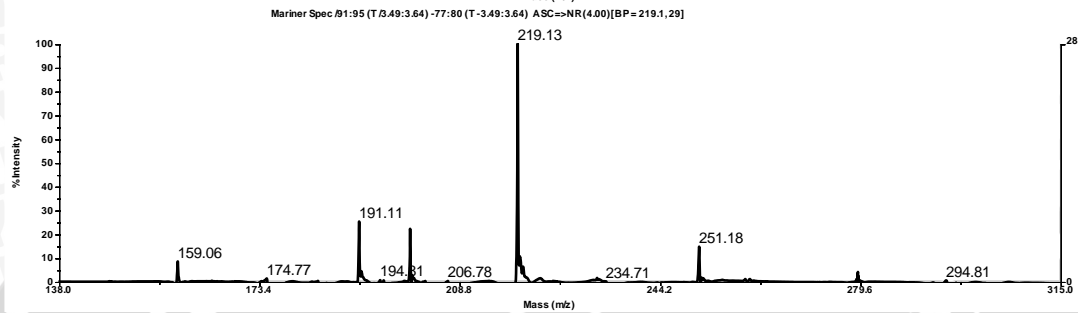
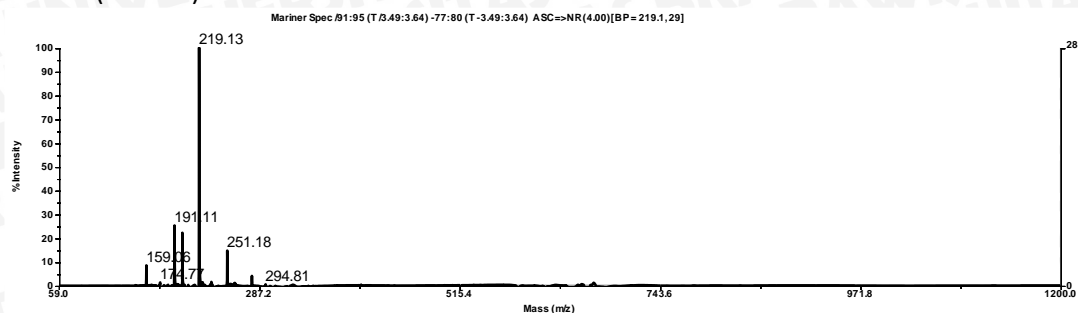
Rt 2.2



Index	Centroid Mass	Relative Intensity	Area
1	143.090172	4.02	82.9

2	147.13878	8.06	121.75
3	156.130378	2.95	49.13
4	175.136377	100	1771.69
5	176.131182	18.68	288.57
6	177.138134	14.67	256.94
7	184.129719	44.66	833.31
8	184.552286	4.94	57.71
9	185.1326	7.27	135.54
10	186.139138	5.99	92.07
11	186.767244	0.54	64.85
12	189.160387	2.45	56.42
13	199.128199	1.8	47.41
14	203.14497	50.93	980.51
15	203.554847	6.72	81.33
16	204.136169	9.39	154.39
17	207.185217	31.37	607.72
18	207.665553	2.83	44.47
19	208.18742	5.94	91.11
20	209.191111	5.51	93.21
21	216.178651	9.84	222.05
22	217.182568	16.14	288.18
23	218.180178	3.87	103.52
24	219.160663	9.21	236.1
25	233.168082	1.8	41.31
26	235.19811	31.93	622.82
27	236.230164	12.42	243.65
28	237.213856	4.77	107.59
29	244.19522	3.93	107.17
30	245.233782	2.19	41.84
31	259.212005	5.51	111.92
32	261.222884	2.12	53.56
33	263.264468	3.46	68.21
34	268.768278	0.23	48.6
35	339.29495	1.92	46.33

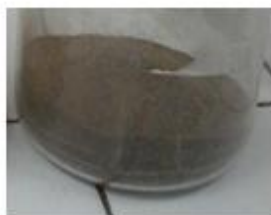
Rt 3.52 (Noise ?)



Index	Centroid Mass	Relative Intensity	Area
1	159.061266	8.44	39.66
2	174.769801	1.27	210.38
3	183.826124	0.26	108.54
4	191.108838	25.23	65.5
5	194.811752	0.57	104.21
6	195.458307	0.45	39.13
7	200.130325	22.13	48.26
8	202.791006	0.18	80.48
9	206.777647	0.2	58.94
10	219.132191	100	234.35
11	234.707468	0.04	45.6
12	251.175722	14.63	45.58
13	294.813939	0.46	92.65



Lampiran 9. Foto Alur Penelitian



Teh *S. cristaefolium*



Maserasi selama 24 jam



Evaporasi



Ekstrak kasar teh *S. cristaefolium*



Uji Antibakteri



Uji Toksisitas



Uji LC-MS