

ISOLASI OLEORESIN LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* K Schum), KARAKTERISASI KOMPONEN PENYUSUNNYA MENGGUNAKAN KC-SM DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI *Aeromonas hydrophila*

TUGAS AKHIR

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Oleh

FATIMAH TRESNA P.

0510920027



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2009**

LEMBAR PENGESAHAN TUGAS AKHIR

ISOLASI OLEORESIN LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* K Schum), KARAKTERISASI KOMPONEN PENYUSUNNYA MENGGUNAKAN KC-SM DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh

**FATIMAH TRESNA P.
0510920027**

**Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Dr. Rurini Retnowati, M.Si
NIP. 131 759 593**

**Arie Srihardvastutie, S.Si, M.Kes
NIP. 132 300 238**

**Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya**

**Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP. 131 653 134**

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini :

Nama : Fatimah Tresna P.
NIM : 0510920027
Jurusan : Kimia
Penulis tugas akhir berjudul :

“ Isolasi Oleoresin Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K Schum), Karakterisasi Komponen Penyusunnya Menggunakan KC-SM dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Aeromonas hydrophila*”

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Mei 2009
Yang menyatakan,

(Fatimah Tresna P.)
NIM. 0510920027

ISOLASI OLEORESIN LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata* K Schum), KARAKTERISASI KOMPONEN PENYUSUNNYA MENGGUNAKAN KC-SM DAN UJI AKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI *Aeromonas hydrophila*

ABSTRAK

Senyawa penyusun minyak atsiri lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K Schum) mempunyai aktivitas sebagai antimikroba. Fraksinasi terhadap ekstrak etanol lengkuas merah dihasilkan oleoresin yang mengandung minyak atsiri dan resin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terkandung dalam oleoresin lengkuas merah dan mengetahui aktivitasnya sebagai antibakteri *Aeromonas hydrophila*. Isolasi oleoresin dilakukan melalui maserasi serbuk lengkuas merah dalam etanol kemudian menguapkan pelarutnya. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi berdasarkan perbedaan berat jenis dan diambil lapisan terbawah yang merupakan fraksi minyak (oleoresin). Oleoresin yang diperoleh dilakukan pemisahan menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada plat silika gel GF₂₅₄ dan diuji kandungan senyawa fenolnya menggunakan larutan FeCl₃ 1% sebagai penampak noda pada plat KLT yang telah dielusi. Senyawa penyusun oleoresin dikarakterisasi menggunakan Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM). Aktivitas oleoresin sebagai antibakteri diketahui berdasarkan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) menggunakan metode dilusi tabung dan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode *streaking*. Berdasarkan hasil penelitian, kromatogram KLT menunjukkan adanya noda pada plat yang dielusi menggunakan eluen toluen-etil asetat dengan perbandingan 3:7 dan 9:1 dengan penampak noda larutan FeCl₃ 1 %. Noda tersebut menunjukkan adanya kandungan senyawa fenol. Karakterisasi oleoresin menggunakan KC-SM menunjukkan bahwa 6 senyawa utama penyusun oleoresin lengkuas merah diduga merupakan turunan kavikol. Nilai KHM diperoleh pada konsentrasi oleoresin 2 %, sedangkan KBM pada konsentrasi oleoresin 4 %.

Kata kunci: Oleoresin, *Aeromonas hydrophila*, KC-SM, Aktivitas antibakteri

ISOLATION OF RED GALANGAL OLEORESIN (*Alpinia purpurata* K Schum), IDENTIFICATION ITS COMPONENTS USING LC-MS AND ITS ANTIBACTERIAL ACTION ON *Aeromonas hydrophila*

ABSTRACT

Essential oil of red galangal (*Alpinia purpurata* K Schum) contained antimicrobial agents. Ethanol extract of red galangal powder was fractionated to yield oleoresin that contained essential oil and resin. The aims of this research were to identify the components of the red galangal oleoresin and to study its antibacterial action on *Aeromonas hydrophila*. To isolate the oleoresin, red galangal powdered was macerated with ethanol and then dried using rotary evaporator. The extract obtained formed three layers due to the difference of its density. The lowest layer, oleoresin, was taken. The components of oleoresin were separated by Thin Layer Chromatography (TLC) method using GF₂₅₄. Phenolic test was done by spraying FeCl₃ 1 % to the eluted TLC plate. The compound and structure of some ingredients from oleoresin were analysed using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). Antibacterial activity was determined based on Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) by tube dilution and streaking method, respectively. Phenolic test showed positive result, which is signed by spot on the plate eluted by toluene-ethyl acetate 3:7 and 9:1 after spraying it with FeCl₃ 1 %. The six main compounds identified by LC-MS were apparently chavicol derivatives. MIC and MBC were obtained at 2 % ad 4 % concentration of oleoresin, respectively.

Keywords: Oleoresin, *Aeromonas hydrophila*, LC-MS, Antibacterial activity

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul **Isolasi Oleoresin Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K Schum), Karakterisasi Komponen Penyusunnya Menggunakan KC-SM dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Aeromonas hydrophila*.**

Tugas akhir ini tidak akan selesai tanpa adanya bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Dr. Rurini Retnowati, M.Si, selaku Dosen Pembimbing I, atas segala bimbingan, pengarahan, dan perhatian yang diberikan kepada penulis.
2. Arie Srihardyastutie, S.Si, M.Kes, selaku Dosen Pembimbing II, atas bimbingan dan kesabaran yang diberikan kepada penulis.
3. Dr. Hermin Sulistyarti, selaku Dosen Penasehat Akademik atas dorongan dan semangat yang diberikan kepada penulis selama masa studi.
4. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS, selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Brawijaya atas perhatian kepada penulis selama melaksanakan masa studi.
5. Drs. Danar P., M.Si, Ir. Bambang Ismuyanto, MS, Dr. Akhmad Sabarudin, dan Dr. Ir. Chanif Mahdi, MS atas segala masukan dan saran yang diberikan kepada penulis untuk perbaikan naskah tugas akhir.
6. Prof. Dr. Hari Eko Irianto selaku Manajer Puncak Laboratorium Pengujian Balai Besar Riset Pengolahan Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan atas segala bantuannya kepada penulis selama melakukan analisis
7. Kedua orang tua yang selalu mendoakan, memberikan semangat, dan kasih sayang.
8. Semua pihak yang telah membantu tersusunnya tugas akhir ini.

Penulis menyadari bahwa tugas akhir ini jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan masukan, saran, dan kritik yang bersifat membangun. Penulis berharap tugas akhir ini dapat bermanfaat.

Malang, Mei 2009

Penulis

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Batasan Masalah.....	3
1.4 Tujuan Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Lengkuas Merah (<i>A. purpurata</i> K Schum)	4
2.2 Ekstraksi Oleoresin.....	8
2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	11
2.4 Uji Fenolik	12
2.5 Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM)	13
2.6 Uji Aktivitas Antibakteri	17
2.6.1 Antibakteri	17
2.6.2 Penghambatan Pertumbuhan Bakteri oleh Senyawa Organik	17
2.6.3 Metode Uji Aktivitas Antibakteri	19
2.7 <i>Aeromonas hydrophila</i>	20
2.8 Hubungan Struktur dan Aktivitas Senyawa terhadap Sifatnya sebagai Antibakteri	23
BAB III METODE PENELITIAN	24
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	24

3.2	Bahan dan Alat Penelitian.....	24
3.2.1	Bahan Penelitian	24
3.2.2	Alat Penelitian.....	24
3.3	Tahapan Penelitian.....	24
3.4	Prosedur Kerja Penelitian	25
3.4.1	Preparasi Bahan Penelitian	25
3.4.2	Ekstraksi Oleoresin	25
3.4.3	Pemisahan dengan KLT	26
3.4.4	Uji Pendahuluan Fenolik.....	26
3.4.5	Karakterisasi Senyawa Penyusun Oleoresin Menggunakan KC-SM.....	26
3.4.6	Uji Aktivitas Oleoresin Lengkuas Merah sebagai Antibakteri <i>A. hydrophila</i>	26
3.5	Analisis Data.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		30
4.1	Uji Fenolik	30
4.2	Analisis Komponen Utama Oleoresin Lengkuas Merah Menggunakan KC-SM.....	31
4.3	Uji Antibakteri	48
4.3.1	Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung.....	48
4.3.2	Penentuan KBM dengan Metode <i>Streaking</i>	49
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....		53
5.1	Kesimpulan	53
5.2	Saran	53
DAFTAR PUSTAKA		54
LAMPIRAN		59

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Lengkuas Merah (<i>A. purpurata</i> K Schum)..... 4
Gambar 2.2	Jalur Pembentukan Senyawa Metabolit Sekunder. . 6
Gambar 2.3	Kromatogram KG Ekstrak Etanol Lengkuas..... 7
Gambar 2.4	Struktur Senyawa dalam Lengkuas 8
Gambar 2.5	Struktur Senyawa Fenol, Katekol, Resorsinol, dan Pirogalol..... 13
Gambar 2.6	Struktur Senyawa Glikosida dalam Lengkuas..... 16
Gambar 2.7	Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Negatif..... 22
Gambar 4.1	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 8,697 Menit..... 34
Gambar 4.2	Struktur Senyawa kavikol glukofuranosil- β -etil glukopiranosida..... 35
Gambar 4.3	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 11,818 Menit..... 36
Gambar 4.4	Struktur Senyawa asetoksi kavikol- β -asetil glukopiranosida 37
Gambar 4.5	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 12,753 Menit..... 38
Gambar 4.6	Struktur Senyawa asetoksi kavikol- β - glukopiranosida 39
Gambar 4.7	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 13,771 Menit 41
Gambar 4.8	Struktur Senyawa kavikol- β -maltosida 42
Gambar 4.9	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 15,255 Menit 44
Gambar 4.10	Struktur Senyawa asetoksikavikol- β -metil maltosida 44
Gambar 4.11	Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 17,159 Menit 46
Gambar 4.12	Struktur Senyawa kavikol- β -rutosida..... 47

Gambar 4.13 Grafik Hubungan Konsentrasi Oleoresin dengan Jumlah Koloni Bakteri..... 50

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Nama dan Kadar Senyawa dalam Rimpang Lengkuas.....	7
Tabel 4.1 Nilai R_f masing-masing plat setelah disemprot $FeCl_3$ 1 %	30
Tabel 4.2 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 8,697 Menit.....	33
Tabel 4.3 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 11,818 Menit.....	36
Tabel 4.4 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 12,753 Menit.....	38
Tabel 4.5 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 13,771 Menit.....	40
Tabel 4.6 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 15,255 Menit.....	43
Tabel 4.7 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 17,159 Menit.....	45
Tabel 4.8 Usulan terhadap Senyawa Utama Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah.....	47
Tabel 4.9 Hasil Pengamatan Tingkat Kekeruhan pada Tabung Reaksi pada Penentuan KHM.....	49
Tabel 4.10 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni pada Media NAP..	50

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1	Diagram Alir Tahapan Penelitian 59
Lampiran 2	Skema Kerja 60
L.2.1	Preparasi Bahan Penelitian 60
L.2.2	Ekstraksi Oleoresin 61
L.2.3	Pembuatan Larutan Pengembang (Eluen)..... 62
L.2.4	Pemisahan dengan KLT 62
L.2.5	Uji Fenolik 62
L.2.6	Analisis Oleoresin Lengkuas Merah Menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa 63
L.2.7	Pembuatan Nutrient Agar Plate Untuk Peremajaan Biakan Murni <i>A. hydrophila</i> 63
L.2.8	Pembuatan Muller Hinton Broth..... 64
L.2.9	Peremajaan Biakan Murni <i>A. hydrophila</i> 64
L.2.10	Pembuatan Larutan Bakteri <i>A. hydrophila</i> 10^6 sel/mL 65
L.2.11	Penentuan KHM dengan Uji Dilusi Tabung..... 65
L.2.12	Pembuatan <i>Nutrient Agar Plate</i> Untuk Penentuan KBM 66
L.2.13	Penentuan KBM dengan Metode <i>Streaking</i> 66
L.2.14	Perhitungan Koloni Bakteri Menggunakan <i>Colony</i> <i>Counter</i> 67
Lampiran 3	Perhitungan 68
L.3.1	Perhitungan Kadar Air dalam Lengkuas Merah Setelah Pengeringan 24 Jam..... 68
L.3.2	Perhitungan Rendemen Oleoresin Lengkuas Merah..... 68
L.3.3	Perhitungan Nilai <i>Retardation Factor</i> (R_f) 68
L.3.3.1	Nilai R_f Untuk Senyawa yang Dielusi dengan Campuran Toluene-Etil Asetat 3:7 68
L.3.3.2	Nilai R_f Untuk Senyawa yang Dielusi dengan Campuran Toluene-Etil Asetat 9:1..... 69
L.3.4	Pembuatan Larutan Bakteri <i>A. hydrophila</i> 10^6 sel/mL 69
Lampiran 4	Hasil Analisis Oleoresin Lengkuas Merah Menggunakan KC-SM..... 70
L.4.1	Gradien Konsentrasi Fasa Gerak 70

L.4.2	Kromatogram KC.....	70
L.4.3	Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC dengan % Area Puncak Di Atas 4 %.....	70
L.4.4	Hasil Pindaian (<i>Scan</i>) Senyawa dengan % Area Puncak Di atas 4 %	71
L.4.4.1	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 8,697 menit.....	71
L.4.4.2	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 11,818 menit.....	71
L.4.4.3	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 12,753 menit.....	72
L.4.4.4	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 13,771 menit.....	72
L.4.4.5	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 15,255 menit.....	73
L.4.4.6	Puncak Kromatogram KC Senyawa dengan Waktu Retensi 17,159 menit.....	73
Lampiran 5	Pustaka Spektrum Massa Komponen dalam Lengkuas.....	74
L.5.1	Senyawa 4-alilfenol (kavikol).....	74
L.5.2	Senyawa kavikol asetat	74
L.5.3	Senyawa asetoksikavikol asetat	75
Lampiran 6	Foto-Foto	
L.6.1	Oleoresin Lengkuas Merah.....	76
L.6.2	Plat KLT pada Uji Fenolik	76
L.6.3	Foto Alat KC-SM Merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000	77
L.6.4	Larutan Oleoresin dengan Berbagai Konsentrasi setelah Ditambahkan Suspensi <i>A. hydrophila</i>	77
L.6.5	Zona hambat <i>A. hydrophila</i> pada Berbagai Variasi Konsentrasi Oleoresin	78

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara penghasil sumber daya perikanan. Masyarakat Indonesia gemar mengkonsumsi ikan karena memiliki kandungan protein yang tinggi yang diperlukan oleh tubuh. Salah satu masalah yang belum dapat diatasi secara tuntas adalah pembusukan ikan baik ketika pendistribusian maupun penyimpanan yang disebabkan oleh bakteri pembusuk. Salah satu bakteri penyebab pembusukan pada ikan adalah *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini biasa ditemukan pada ikan air laut maupun air tawar (Prajitno, 2008).

Menurut Mashaw (2008), pada umumnya nelayan menggunakan es batu untuk mempertahankan kesegaran ikan. Tetapi seiring perkembangan zaman, harga es batu semakin melonjak dan sekarang berkisar Rp 25.000 per balok. Hal ini menyebabkan banyaknya nelayan yang menggunakan alternatif lain sebagai pengawet ikan, diantaranya menggunakan zat kimia berbahaya seperti formalin. Jika dibandingkan dengan es batu, formalin memiliki harga yang lebih murah yaitu hanya Rp 375/kg ikan. Selain itu formalin dapat mengawetkan ikan lebih dari 15 hari.

Formalin merupakan desinfektan kuat untuk bakteri pembusuk, cendawan dan kapang. Apabila formalin tercampur dalam makanan dengan dosis rendah maka akan menyebabkan keracunan, sedangkan dalam dosis tinggi menyebabkan konvulsi (kejang-kejang), haematuria (kencing darah), muntah darah dan dapat menyebabkan kematian (Judarwanto, 2008).

Rempah-rempah dapat dijadikan salah satu alternatif sebagai pengawet alami pada ikan. Qomariyah *dkk.* (2008) telah melakukan penelitian mengenai pemanfaatan serbuk oleoresin lengkuas merah sebagai pengawet pada ikan kembung. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa ikan yang diawetkan menggunakan serbuk oleoresin lengkuas merah dengan konsentrasi 4 % menunjukkan kondisi fisik (daging, mata, dan insang) yang masih baik setelah 10 jam dibandingkan ikan yang tidak diawetkan. Selain memberikan efek

pengawetan, serbuk oleoresin lengkuas merah juga memberikan cita rasa aroma yang khas pada ikan. Efek pengawetan serbuk oleoresin tersebut diduga karena senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba yang terkandung di dalam lengkuas merah. Komponen dalam lengkuas yang memiliki aktivitas sebagai antimikroba terutama terdapat pada bagian minyak atsirinya (Kabelan, 2006).

Ly *et al.* (2001) telah melakukan penelitian terhadap senyawa penyusun minyak atsiri lengkuas putih (*Alpinia galanga*) yang diisolasi menggunakan metode distilasi uap. Senyawa penyusun minyak atsiri tersebut dianalisis menggunakan Kromatografi Gas-Spektroskopi Massa (KG-SM) karena minyak atsiri bersifat volatil. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui bahwa minyak atsiri dalam rimpang lengkuas yang telah dikeringkan mengandung α -bisabolen, 1,8-sineol, senyawa turunan kavikol, senyawa turunan eugenol, α -farnesen, α -karyofilen, α -bisabolol, spatulenol, farnesil asetat, dan 4-hidroksinamil asetat. Senyawa yang mempunyai kelimpahan terbesar dalam lengkuas putih (*A. galanga*) adalah senyawa turunan kavikol.

Pada penelitian ini ekstrak etanol lengkuas merah difraksinasi sehingga diperoleh fraksi minyak yang disebut oleoresin. Oleoresin merupakan campuran minyak atsiri dan resin yang diperoleh dengan mengekstrak rempah-rempah yang telah digiling dengan pelarut organik kemudian pelarutnya diuapkan. Oleoresin rempah-rempah, khususnya dari suku *Zingiberaceae*, banyak digunakan sebagai pemberi cita rasa atau bumbu pada makanan. Selain itu, dalam bidang kesehatan digunakan sebagai antimikroba, mengobati migrain, antimual, antiradang, pereda nyeri, dan memperlancar aliran darah (Abubakar *dkk.*, 2008).

Berdasarkan uraian di atas dapat diduga bahwa oleoresin lengkuas merah mengandung minyak atsiri yang di dalamnya terdapat senyawa turunan kavikol yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri pada *A. hydrophila*. Senyawa kavikol dan turunan fenol lain dapat diuji keberadaannya dalam oleoresin melalui metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan penampak noda larutan FeCl_3 1 %. Oleoresin mempunyai sifat yang nonvolatil, sehingga karakterisasi komponen yang terkandung dalam oleoresin lengkuas merah dapat dilakukan

menggunakan Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM). Aktivitas antibakteri oleoresin lengkuas merah terhadap bakteri uji ditunjukkan dengan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

1.2 Rumusan Masalah

1. Senyawa apakah yang menyusun oleoresin lengkuas merah dalam pelarut etanol?
2. Apakah oleoresin lengkuas merah mempunyai aktivitas sebagai antibakteri *A. hydrophila*?

1.3 Batasan Masalah

1. Lengkuas merah (*A. purpurata* K Schum) yang digunakan diperoleh dari Pasar Johar, Semarang.
2. Karakterisasi komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dilakukan berdasarkan spektra massa hasil analisis menggunakan KC-SM.
3. Komponen utama oleoresin lengkuas merah yang dikarakterisasi mempunyai % area puncak di atas 4 % dari kromatogram Kromatografi Cair (KC).
4. Uji aktivitas antibakteri menggunakan bakteri *A. hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

1.4 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui senyawa penyusun oleoresin lengkuas merah dalam pelarut etanol.
2. Mengetahui aktivitas oleoresin lengkuas merah sebagai antibakteri *A. hydrophila*.

1.5 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kandungan senyawa dalam oleoresin yang mempunyai aktivitas sebagai antimikroba sehingga dapat dijadikan alternatif sebagai pengawet alami pada ikan.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K Schum)

Menurut Sinaga (2000), klasifikasi lengkuas merah adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Ordo	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: Alpinia
Jenis	: <i>Alpinia purpurata</i> K Schum
Nama umum/dagang	: Lengkuas merah
Nama daerah (Jawa)	: Laos merah



Gambar 2.1 Lengkuas Merah (*A. purpurata* K Schum)

Lengkuas merah merupakan tanaman berumur panjang, tinggi pohon dapat mencapai 1-1,5 meter, mempunyai batang yang tertutup oleh pelepah dan bunga berwarna putih dalam tandan pada ujung batang (Tjitrosoepomo, 1994).

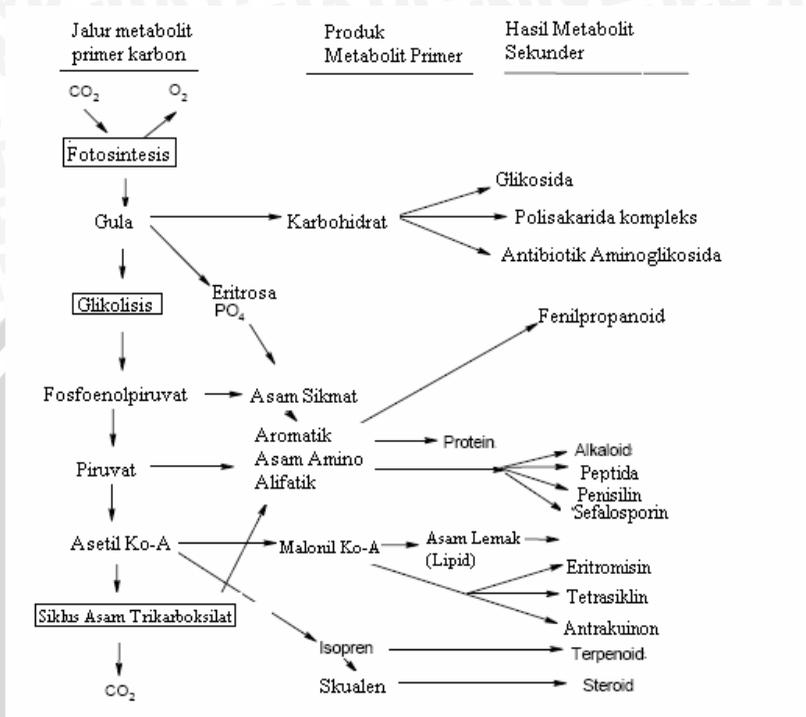
Rimpang lengkuas merah berukuran besar dan tebal, berdaging, berbentuk silindris, diameter sekitar 2-4 cm, dan bercabang-cabang. Bagian luar rimpang berwarna coklat agak kemerahan atau kuning kehijauan pucat, mempunyai sisik-sisik berwarna putih atau kemerahan, keras mengkilap, sedangkan bagian dalamnya berwarna putih. Daging rimpang yang sudah tua berserat kasar. Apabila dikeringkan, rimpang berubah

menjadi agak kehijauan, dan seratnya menjadi keras dan liat. Untuk mendapatkan rimpang yang masih berserat halus, panen harus dilakukan pada saat tanaman berumur lebih kurang 3 bulan. Rasa rimpang tajam pedas, menggigit, dan berbau harum karena kandungan minyak atsirinya (Sinaga, 2000).

Tiap 100 g rimpang lengkuas putih (*A. galanga*) mengandung 14 g uap air, 9 g abu, 49 g senyawa yang larut dalam etanol 80 %, 19 g senyawa yang larut dalam air, 9 g gula, 3 g nitrogen, 16 g protein, dan 0,2 – 1,5 % minyak atsiri (dalam berat kering) (Ravindran dan Balachandran, 2004).

Karbohidrat atau gula menempati kedudukan inti pada metabolisme tumbuhan. Analisis gula dalam daun atau jaringan tumbuhan dapat dilakukan dengan ekstraksi jaringan dengan etanol 95 %, kemudian dilanjutkan dengan memekatkan ekstrak untuk menghilangkan etanol dengan cara pemusingan menggunakan *rotary evaporator*. Senyawa fenol di dalam tumbuhan pada umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida sehingga cenderung mudah larut dalam air (Harborne, 1996).

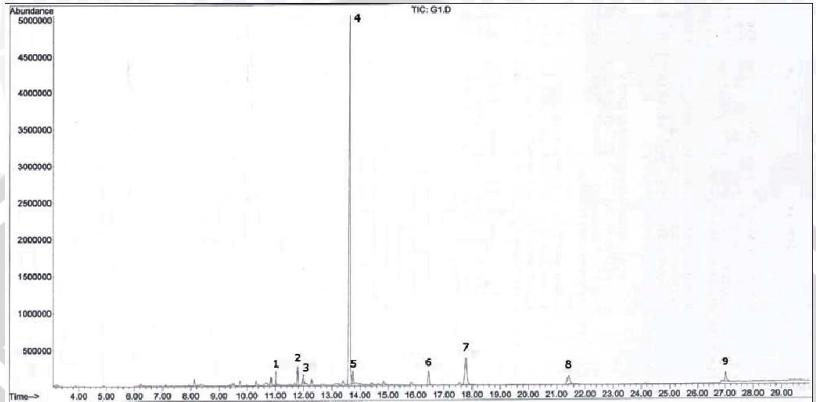
Selain memproduksi senyawa metabolit primer (karbohidrat, lipid, dan asam amino) yang dibutuhkan untuk metabolisme selnya, tumbuhan juga menghasilkan senyawa lain seperti alkaloid, glikosida, flavonoid, tanin, resin, dan minyak atsiri yang dikenal sebagai senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder tidak berperan dalam proses metabolisme sel dari tumbuhan, tetapi mempunyai peranan penting pada interaksi antara tumbuhan dengan lingkungannya (Namdeo, 2007). Senyawa ini merupakan hasil biosintesis lanjutan dari senyawa metabolit primer yang dihasilkan karena adanya tekanan dari lingkungan, atau sebagai pertahanan, perlindungan, dan serangan terhadap suatu mikroorganisme, serangga, atau predator lain (Khanam *et al.*, 2007). Jalur pembentukan senyawa metabolit sekunder disajikan pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Jalur Pembentukan Senyawa Metabolit Sekunder

Menurut Morikawa *et al.* (2005), di dalam rimpang lengkuas putih (*A. galanga*) yang telah dikeringkan terkandung senyawa 1'S-1'-hidroksikavikolasetat, metil eugenol, kavikol-β-D-glukopiranosida, trans - p - hidroksinamaldehyd, trans - p - kumaril alkohol, trans - p - hidroksinamil asetat, dan p - hidroksibenzaldehid. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa turunan fenol yang dikenal mempunyai aktivitas sebagai antimikroba. Selain itu minyak atsiri lengkuas juga mengandung resin yang disebut galangol dan zat kristalin berwarna kuning yang disebut kaempferid (Tjitrosoepomo,1994).

Aree (2005) telah mengidentifikasi senyawa-senyawa dalam lengkuas putih (*A. galaga*) yang larut dalam pelarut etanol menggunakan KG-SM. Kromatogram Kromatografi Gas (KG) dapat dilihat pada Gambar 2.3, sedangkan nama senyawa beserta kadarnya dapat dilihat pada Tabel 2.1



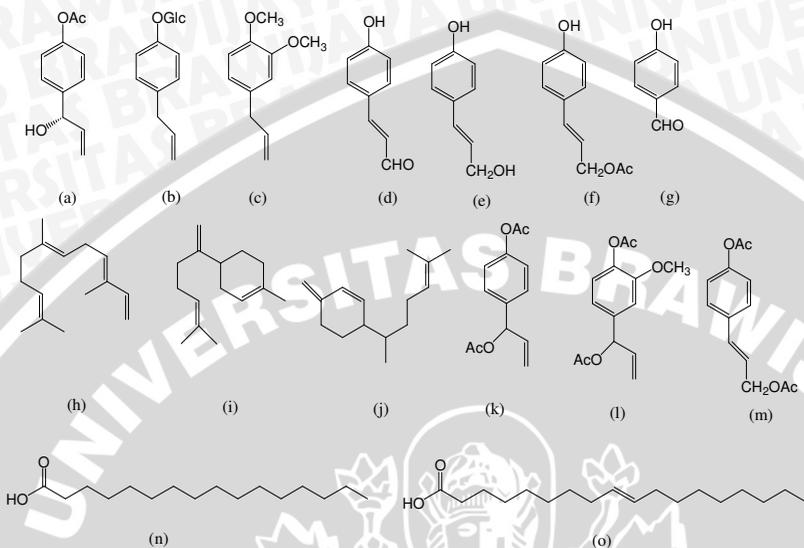
Gambar 2.3 Kromatogram KG Ekstrak Etanol Lengkuas

Tabel 2.1 Nama dan Kadar Senyawa yang Terkandung dalam Rimpang Lengkuas dengan Pelarut Etanol

Senyawa	Persen area (v/v)
1. Trans- β -farnesen	1.59
2. β -bisabolen	2.31
3. β -seskuifelandren	1.18
4. D, L-1'-asetoksikavikol asetat (ACA)	76.49
5. 1'-asetoksieugenol asetat	1.94
6. p-koumaril diasetat	3.06
7. Tidak teridentifikasi	7.96
8. Asam palmitat	3.19
9. Asam-9-oktadekenoat	2.28

Senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba terbesar dalam lengkuas putih (*A. galanga*) adalah ACA yang merupakan senyawa tutunan kavikol. ACA berbentuk kristal berwarna putih dengan berat molekul 234. Senyawa ini dapat ditemukan pada bagian minyak atsiri lengkuas sehingga bersifat volatil dan mudah hilang dengan pemanasan (Aree, 2005).

Struktur dari senyawa-senyawa dalam lengkuas ditunjukkan pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Struktur Senyawa : (a) 1'S-1'-hidroksikavikolasetat, (b) kavikol - β - D - glukopiranosida, (c) metil eugenol, (d) trans p-hidroksinamaldehyd, (e) trans - p - kumaril alkohol, (f) trans-p-hidroksinamil asetat, (g) p-hidroksibenzaldehid, (h) trans - β - farnesen, (i) β -bisabolen, (j) β -seskuifelandren, (k) asetoksikavikol asetat, (l) asetoksieugenol asetat, (m) asam palmitat, (n) p-koumaril diasetat, dan (o) asam - 9 - oktadekenoat

2.2 Ekstraksi Oleoresin

Oleoresin adalah hasil ekstraksi pelarut dari bahan baku tanaman setelah pelarutnya diuapkan (Hui, 1992). Menurut Goldman (1989) dalam Susetyo (2003), oleoresin diperoleh dengan cara mengekstrak rempah-rempah dengan menggunakan pelarut organik tertentu. Bahan rempah berbentuk bubuk halus dicampur dengan pelarut dan diekstraksi. Larutan dipisahkan dengan penyaringan dan pelarutnya disuling.

Pengertian oleoresin sering disamakan dengan minyak atsiri yang sebenarnya keduanya sangat berbeda. Minyak atsiri dapat dihasilkan melalui penyulingan dan hanya mengandung

senyawa yang mudah menguap yang tersuling dari bahan olah yang mempunyai aroma kuat, sedangkan oleoresin diperoleh melalui ekstraksi menggunakan pelarut organik sehingga selain mengandung minyak atsiri juga mengandung resin tidak menguap dan menentukan cita rasa khas aroma rempah (Staniforth, 1973 dalam Ria, 1989).

Oleoresin mengandung minyak atsiri dan senyawa nonvolatil lain yang memiliki karakteristik rasa dan warna sesuai dengan bahan baku di berbagai industri parfum, farmasi, dan makanan. Kebutuhan keduanya meningkat seiring dengan penggunaan di berbagai industri. Berbagai macam rempah-rempah dan tanaman lain mengandung jenis oleoresin dan minyak atsiri yang berbeda (Mahendra, 2004).

Senyawa nonvolatil dapat diisolasi dengan ekstraksi padat-cair menggunakan proses *batch* atau kontinyu (Vogel, 1989). Menurut Darwis (2000) dalam Lenny (2006), beberapa metode ekstraksi senyawa organik bahan alam yang umum digunakan antara lain:

1. Maserasi

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruang. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dalam perendaman sampel akan terjadi tumbukan yang menyebabkan pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut.

2. Perkolasi

Merupakan proses melarutkan pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama pelarut. Tetapi efektifitas dari proses ini hanya akan lebih besar untuk senyawa organik yang sangat mudah larut dalam pelarut organik yang digunakan.

3. Ekstraksi Soxhlet

Pada proses ini digunakan ekstraktor Soxhlet dengan pemanasan sehingga pelarut akan dapat dihemat karena terjadinya sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Proses ini sangat baik untuk senyawa yang tidak terpengaruh oleh panas.

4. Distilasi Uap

Proses distilasi lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada temperatur yang cukup tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan. Pada umumnya lebih banyak digunakan untuk minyak atsiri.

Pelarut yang baik adalah pelarut yang dapat melarutkan oleoresin dengan cepat dan sempurna, titik didih rendah sehingga mudah diperoleh kembali (Cripps, 1973 *dalam* Anam, 2000). Selain itu menurut Sarwono *dkk.* (1987), pelarut yang baik setelah dipakai dapat dimurnikan dengan mudah, murah, dan tidak mudah terbakar. Pelarut yang biasa digunakan dalam ekstraksi oleoresin antara lain: etilendiklorida, aseton, etanol, metanol, n-heksan (Somaatmadja, 1981), eter dan isopropilalkohol (Moestofa, 1981).

Etanol merupakan pelarut yang menghasilkan rendemen oleoresin yang paling tinggi dibandingkan pelarut organik lainnya. Etanol mempunyai tingkat polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak sebagian besar komponen oleoresin yang bersifat polar (Komara, 1991). Menurut Voight (1995), umumnya yang digunakan sebagai pelarut adalah campuran pelarut yang berlainan, khususnya campuran etanol-air. Kesulitan yang sering dihadapi dalam pemisahan pelarut dari oleoresin adalah menekan jumlah minyak atsiri yang menguap bersama pelarut organik pada saat pemanasan. Agar tidak terjadi kerusakan pada komponen oleoresin dan minyak atsiri tidak ikut menguap, pemisahan pelarut dilakukan pada temperatur yang rendah (kurang dari 90 °C) (Moestofa, 1981).

Faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain:

a. Ukuran bahan

Bahan yang akan diekstrak sebaiknya memiliki luas permukaan yang besar untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung dengan baik (Purseglove *et al.*, 1981). Kehalusan bubuk

yang sesuai akan menghasilkan ekstraksi yang sempurna dalam waktu yang singkat, sebaliknya bahan yang digiling terlalu halus dapat menyebabkan pemampatan (stagnasi) pada proses penyulingan sehingga minyak atsiri yang keluar tidak maksimal dan oleoresin sulit turun.

b. Lama dan temperatur ekstraksi

Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada temperatur tinggi, tetapi pada ekstraksi oleoresin hal ini dapat mengakibatkan beberapa komponen yang terdapat dalam rempah mengalami kerusakan (Moestofa, 1981). Menurut Suryandari (1981), semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan untuk bersentuhan makin besar sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan.

c. Pelarut

Jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah pelarut yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal (Ketaren, 1986). Anam (2000), menyatakan bahwa etanol merupakan pelarut yang lebih baik daripada aseton untuk mengekstrak oleoresin jahe.

2.3 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT termasuk dalam Kromatografi Cair-Padat (KCP). Pada kromatografi ini, silika atau alumina yang merupakan adsorben inert dilapiskan pada plat pendukung yang sesuai seperti kaca atau plastik. Senyawa yang akan dipisahkan ditotolkan pada bagian bawah plat dan dikeringkan kemudian plat dimasukkan secara vertikal pada bejana yang berisi fase gerak (eluen) yang telah jenuh. Eluen akan bergerak karena adanya gaya kapilaritas sehingga terjadi pemisahan yang ditandai dengan timbulnya noda yang terdapat pada plat. Noda yang diperoleh dapat diidentifikasi baik secara fisika seperti fluoresensi dan radiasi, atau secara kimia dengan mereaksikannya dengan reagen tertentu (Braithwaite dan Smith, 1985). Senyawa yang mempunyai polaritas hampir sama dengan fase geraknya akan terelusi lebih dulu sehingga mempunyai nilai R_f yang lebih besar dibandingkan senyawa yang mempunyai polaritas berbeda dengan fase geraknya (Vogel, 1989).

KLT merupakan metode pemisahan senyawa-senyawa baik organik maupun anorganik yang cukup sederhana, cepat dalam pemisahan, sensitif dan mudah memperoleh kembali senyawa-senyawa yang terpisahkan. Metode ini mempunyai kelebihan lain yaitu mempunyai resolusi yang lebih baik daripada kromatografi kertas dikarenakan laju difusi yang luar biasa kecilnya pada lapisan pengadsorpsi (Khopkar, 2002).

KLT digunakan untuk tujuan analitik dan preparatif. KLT analitik digunakan untuk menganalisa senyawa organik dalam jumlah kecil dan menentukan pelarut yang tepat untuk pemisahan dengan KLT preparatif, sedangkan KLT preparatif digunakan untuk memisahkan campuran senyawa dari sampel dalam jumlah besar berdasarkan fraksinya (Townshend, 1995).

Aree (2005) telah melakukan uji KLT pada ekstrak lengkuas putih (*A. galanga*) dan standar ACA menggunakan fase gerak toluen:etil asetat (9:1) dengan penampak noda vanillin- H_3PO_4 , kemudian hasil keduanya dibandingkan. Berdasarkan penelitian tersebut, ekstrak lengkuas yang telah dielusi akan menampakkan sebuah noda dengan nilai R_f 0,7, sedangkan nilai R_f untuk standar ACA adalah 0,69.

Penampak noda campuran vanillin- H_3PO_4 digunakan sebagai reagen untuk mengarangkan senyawa polimer yang mengikat plat KLT. Plat yang telah disemprot reagen tersebut dipanaskan pada temperatur 110 °C selama 5 sampai 30 menit hingga terbentuk noda berwarna yang dapat diamati. Pengarangan dapat dilanjutkan sampai noda berwarna coklat, abu-abu, atau hitam (Anonymous, 2009).

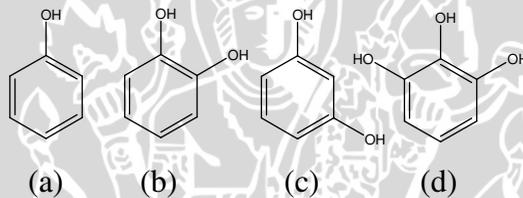
2.4 Uji Fenolik

Uji keberadaan senyawa fenolik pada suatu ekstrak tanaman dilakukan dengan metode penambahan besi (III) klorida (FeCl_3) pada ekstrak pekat senyawa hasil ekstraksi yang telah diencerkan dengan akuades. Adanya golongan fenolik ditunjukkan dengan perubahan warna dari coklat menjadi hijau kecoklatan (Harborne, 1996). Perubahan warna yang terjadi disebabkan karena terbentuknya kompleks antara fenol dengan FeCl_3 (Mohan, 2003).

Warna pada kompleks senyawa anorganik dapat disebabkan karena adanya serapan pada panjang gelombang

sinar tampak yang disebabkan oleh transisi elektron pada orbital d dari logam sebagai atom pusat atau karena adanya transfer muatan. Serapan yang dihasilkan dari proses transfer muatan terjadi karena adanya perpindahan elektron dari satu atom ke atom lain pada keadaan transisi. Transfer muatan dapat terjadi dari logam ke ligan atau dari ligan ke logam. Transfer muatan dari ligan ke logam terjadi karena transisi elektronik dari orbital p pada ligan ke orbital d pada logam (Douglas *et al.*, 1983).

Senyawa fenol dan turunannya bereaksi dengan FeCl_3 menghasilkan warna yang berbeda-beda. Fenol akan menghasilkan warna ungu, katekol berwarna hijau, resorsinol berwarna ungu tua, dan pirogallol berwarna biru kehitaman (Wilson dan Gisvold, 1962). Adapun struktur dari senyawa-senyawa tersebut disajikan pada Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Struktur Senyawa : (a) fenol, (b) katekol, (c) resorsinol, dan (d) pirogallol

2.5 Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (KC-SM)

Kromatografi Cair (KC) merupakan istilah yang digunakan dalam kromatografi dimana fase geraknya berupa cairan. Berbeda dengan KG, penggunaan KC tidak dibatasi pada sifat volatil suatu senyawa atau stabilitasnya terhadap temperatur (Braithwaite dan Smith, 1985).

KC dapat dipakai untuk senyawa anorganik yang sebagian besar tidak atsiri dan senyawa dengan bobot molekul tinggi. KC biasanya dilakukan pada temperatur kamar sehingga senyawa yang tidak tahan panas dapat ditangani dengan mudah (Gritter *et al.*, 1991).

Di dalam KC dikenal istilah kromatografi fase normal dan fase terbalik. Pada fase normal, fase diam bersifat polar dan fase gerak nonpolar. Sedangkan pada fase terbalik, fase diam

bersifat nonpolar dan fase gerak polar sehingga senyawa polar akan keluar terlebih dahulu bersama eluen (Wagaw *et al.*, 2009).

Untuk membuat fase diam pada kromatografi fase terbalik pada pendukung berupa silika, silanol bebas direaksikan dengan klorosilan yang bersifat hidrofob agar permukaannya bersifat nonpolar. Silanol yang bereaksi biasanya hanya sepertiganya saja. Oleh karena itu, selanjutnya kolom direaksikan dengan klorotrimetilsilan yang bereaksi dengan silanol bebas yang akan meningkatkan efisiensi kolom (Wagaw *et al.*, 2009).

Kolom yang paling banyak digunakan pada kromatografi fase terbalik adalah oktadekil (C_{18} , ODS), yang berikatan kuat dengan analit nonpolar. Kolom ini berguna untuk analisis nukleosida, steroid, vitamin, asam lemak, dan senyawa-senyawa alam (Wagaw *et al.*, 2009).

Selain kolom, pemisahan juga dipengaruhi fase gerak. Karena derajat kelarutan komponen dalam sampel bervariasi terhadap pelarut yang berbeda, pemilihan pelarut organik dapat mempengaruhi selektivitas dan resolusinya. Pelarut organik yang sering digunakan dalam kromatografi fase terbalik adalah metanol, tetrahidrofuran, dan asetonitril untuk meningkatkan kekuatan pelarutnya. Kekuatan pelarut merupakan kemampuan pelarut untuk menahan analit dalam fase gerak. Asetonitril merupakan pelarut aprotik yang sangat polar, memberikan resolusi yang baik pada pemisahan banyak senyawa (Wagaw *et al.*, 2009).

Spektrometer massa merupakan detektor yang baik untuk KC. Pemakaian spektrometer massa pada efluen kromatografi memungkinkan untuk mengukur spektra massa setiap komponen, atau sembarang bagian dari aliran, komponen murni atau campuran. Data jenis ini dapat dipakai untuk mendeteksi zat terlarut dan terutama untuk identifikasi kuantitatif (Gritter *et al.*, 1991).

Spektrometri massa didasarkan pada penguraian senyawa organik dan pola fragmentasi menurut massanya. Pada spektrometri massa, sampel dalam bentuk gas ditembak dengan elektron berenergi tinggi (Fessenden dan Fessenden, 1992). Tabrakan antara sebuah molekul organik dan salah satu elektron berenergi tinggi menyebabkan lepasnya elektron dari molekul menghasilkan radikal kation. Ion molekuler tersebut biasanya

terurai menjadi sepasang pecahan atau filamen yang dapat berupa radikal dan ion, atau molekul kecil dan radikal kation. Spektrogram massa yang dihasilkan merupakan grafik antara limpahan relatif lawan perbandingan massa/muatan (m/z) (Sastroamidjojo, 1991).

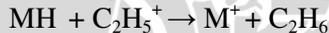
Dalam spektrometri massa, dikenal beberapa metode pengionan, yaitu (Anonymous, 2008):

1. Ionisasi kimia

Pada ionisasi kimia digunakan ion reagen untuk bereaksi dengan molekul analit. Ion reagen dihasilkan dari penembakan metana oleh sumber elektron pada *electron impact* (EI). Tumbukan elektron akan menghasilkan CH_4^+ dan CH_3^+ yang kemudian bereaksi dengan metana membentuk ion reagen CH_5^+ dan C_2H_5^+ . Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut :



Ion reagen yang dihasilkan bereaksi dengan molekul analit melalui transfer proton maupun hidrida. Reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut:



2. *Electron Impact* (EI)

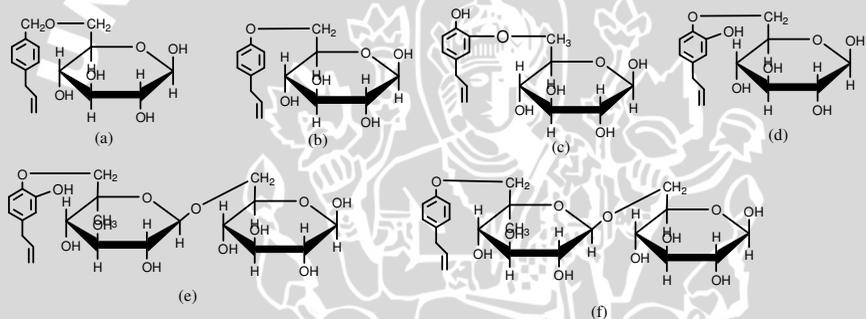
EI menggunakan sumber sinar elektron, yang biasanya dihasilkan dari filamen tungsten untuk mengionisasi atom atau molekul menjadi fase gas. Elektron sumber akan menumbuk elektron pada atom atau molekul analit sehingga menghasilkan ion.

3. *Electrospray Ionization* (ESI)

Sumber ESI terdiri dari jarum yang sangat kecil dan rangkaian penyaring. Larutan sampel disemprotkan untuk membentuk *droplet*. *Droplet* tersebut yang membawa muatan ketika keluar dari kapiler pada saat pelarut menguap. Metode ESI sangat berguna untuk ionisasi molekul biologi yang besar yang sangat sulit untuk menguap atau terionisasi.

KC-SM adalah perpaduan dua instrumen, yaitu kromatografi cair dan spektrometer massa. Masalah utama dari penggunaan KC-SM adalah adanya fase gerak berupa zat cair yang harus dihilangkan sebelum spektra dapat diukur (Gritter *et al.*, 1991).

Ly *et al.* (2002) telah melakukan analisis terhadap senyawa penyusun ekstrak metanol rimpang lengkuas putih (*A. galanga*) menggunakan KC-SM. Berdasarkan penelitian tersebut diketahui di dalam rimpang lengkuas terkandung benzil - β - D - glukopiranosida, 1 - O - β - D - glukopiranosil - 4 - alilbenzen (kavikol - β - D - glukopiranosida), 1 - hidroksi - 2 - O - β - D - glukopiranosil - 4 - alilbenzen, 1 - O - β - D - glukopiranosil - 2 - hidroksi - 4 - alilbenzen (demetileugenol - β - D - glukopiranosida), 1 - O - (6 - O - α - L - ramnopiranosil - β - D - glukopiranosil) - 2 - hidroksi - 4 - alilbenzen (demetileugenol - β - D - rutinosida), dan 1 - O - (6 - O - α - L - ramnopiranosil - β - D - glukopiranosil) - 4 - alilbenzen (kavikol - β - rutinosida). Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 2.6.



Gambar 2.6 Struktur Senyawa : (a) benzil - β - D -glukopiranosida, (b) kavikol - β - D - glukopiranosida, (c) 1 - hidroksi - 2-O- β -D-glukopiranosil - 4 - alilbenzen, (d) demetileugenol - β - D -glukopiranosida, (e) demetileugenol - β - D - rutinosida, dan (f) kavikol - β - rutinosida

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

2.6.1 Antibakteri

Mikroorganisme dapat dihambat atau dibunuh dengan proses fisik atau senyawa kimia. Zat antimikroba diartikan sebagai senyawa yang mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba, sehingga senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan bahkan membunuh mikroba. Bila

mikroorganisme yang dimaksud adalah bakteri maka senyawa antimikroba sering disebut dengan senyawa antibakteri (Brooks *et al.*, 2001)

Bakteri adalah organisme dengan sel tunggal yang mempunyai karakteristik sendiri. Bentuknya berbeda menurut genusnya. Jenis bakteri tertentu dapat menunjukkan bentuk dan ukuran sesuai dengan keadaan lingkungan. Sel bakteri terdiri dari dinding luar, sitoplasma dan bahan inti. Dinding luar terdiri dari 3 lapis, dari luar ke dalam berturut-turut lapisan lendir, dinding sel, dan membran sitoplasma. Sitoplasma adalah suatu koloid yang mengandung karbohidrat, protein, dan enzim-enzim (Dwijoyoseputro, 1985).

Menurut Davidson dan Brannen (1993), beberapa jenis senyawa yang mempunyai aktivitas antimikroba adalah sodium benzoat, senyawa fenol, asam-asam organik, asam lemak rantai sedang dan esternya, sulfur dioksida dan sulfit, nitrit, senyawa kolagen dan surfaktan, dimetil karbonat dan metil askorbat.

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengamati pengaruh senyawa yang terkandung dalam minyak atsiri tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai antimikroba, antara lain eugenol pada cengkeh, ACA pada lengkuas, sinamaldehyd pada kayu manis, serta karvakrol dan timol pada oregano (Aree, 2005).

2.6.2 Penghambatan Pertumbuhan Bakteri oleh Senyawa Organik

Zat antimikroba dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteristatik (menghambat pertumbuhan bakteri), fungisidal (membunuh kapang), fungistatik (menghambat pertumbuhan kapang), ataupun germisidal (menghambat germinasi spora bakteri). Hasil-hasil penelitian menunjukkan bahwa sebagian besar komponen di dalam rempah-rempah bersifat sebagai antimikroba, sehingga dapat mengawetkan makanan. Komponen rempah-rempah yang mempunyai aktivitas antimikroba terutama adalah bagian minyak atsiri (Kabelan, 2006).

Mekanisme senyawa bakteristatik umumnya menghambat sintesis protein dengan cara berikatan dengan ribosom. Ketika

senyawa tersebut dihilangkan, ikatannya dengan ribosom akan terputus dan pertumbuhan dapat berjalan kembali. Sedangkan senyawa bakterisidal akan membunuh bakteri, umumnya dengan cara menghambat sintesis dinding selnya. Ketika pembentukan dinding sel terhalang, bakteri akan lisis dan mati. Sifat bakteristatik dan bakterisidal tergantung pada konsentrasi senyawa antimikroba. Senyawa bakterisidal pada konsentrasi rendah kemungkinan hanya menghambat dan senyawa bakteristatik pada konsentrasi tinggi dapat bersifat bakterisidal (Madigan *et al.*, 2009).

Cara kerja senyawa antimikroba terdiri dari 4 kategori, yaitu (Tenover, 2006):

1. Menghambat pembentukan dinding sel
2. Menghambat sintesis protein
3. Menghambat pembentukan asam nukleat
4. Menghambat jalur metabolik

Aktivitas bakterisida hampir semua senyawa telah dibandingkan dengan fenol. Hampir semua senyawa fenol dan turunannya menunjukkan sifat antibakteri namun tidak terlalu spesifik. Dinding sel bakteri gram negatif lebih banyak mengandung lipid daripada dinding sel bakteri gram positif. Hal ini mungkin dapat menjelaskan aktivitas antibakteri yang lebih besar dari beberapa fenol larut lemak terhadap bakteri gram negatif dibanding pada bakteri gram positif (Gilman *et al.*, 1991).

Sifat antiseptik dari fenol dan asam karboksilat dipengaruhi oleh konsentrasi dalam bentuk tak terdisosiasinya. Konsentrasi fenol (pKa 9,9) pada range pH 2-8 tidak berubah karena pada pH tersebut 99,99 % fenol tidak terdisosiasi. Sedangkan konsentrasi asam asetat (pKa 4,74) akan naik sejalan dengan naiknya pH karena semakin banyaknya yang terdisosiasi (Foye *et al.*, 1995).

2.6.3 Metode uji aktivitas antibakteri

Kerentanan mikroorganisme terhadap senyawa antimikroba dapat diketahui berdasarkan nilai KHM dan KBM (Torotora *et al.*, 2001).

KHM adalah kadar terendah senyawa antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau bersifat bakteristatik. Sedangkan KBM adalah kadar terendah senyawa antimikroba yang dapat membunuh bakteri atau bersifat bakterisidal (Torotora *et al.*, 2001). Metode untuk menentukan nilai KHM dan KBM antara lain :

1. Metode dilusi tabung

Metode dilusi tabung digunakan untuk menentukan KHM secara *in vitro* (Pelczar *et al.*, 1977). Menurut Dzen *dkk.* (2003), KHM ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih secara visual (tidak ada pertumbuhan mikroba).

2. Metode difusi cakram

Pada metode ini cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Metode ini dipengaruhi oleh beberapa faktor fisik dan kimia, misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat (Brooks *et al.*, 2001). Ditambahkan oleh Dzen *dkk.* (2003) bahwa metode difusi cakram sering digunakan untuk menentukan KBM.

KBM dapat juga ditentukan dengan menanamkan hasil uji dilusi tabung pada penentuan KHM pada medium yang bebas senyawa antimikroba, kemudian diamati pertumbuhannya. Cara penanaman dapat dilakukan dengan metode *streaking*. Pada metode ini kultur bakteri yang telah dicampur dengan senyawa antimikroba digoreskan pada media pertumbuhan dengan pola tertentu. Bakteri akan tumbuh dan bereproduksi membentuk koloni yang dapat secara langsung dilihat oleh mata (Tortora *et al.*, 2001).

Analisis aktivitas senyawa antimikroba *in vivo* lebih rumit daripada keadaan *in vitro*. Aktivitas *in vivo* tidak hanya melibatkan obat dan parasit tetapi juga faktor ketiga yaitu inang. Hubungan parasit-obat meliputi adsorpsi, ekskresi, distribusi, metabolisme, dan toksisitas. Sedangkan hubungan parasit-inang meliputi perubahan respon jaringan, perubahan respon imun, dan perubahan flora mikroba (Brooks *et al.*, 2001).

Perhitungan jumlah bakteri dapat dilakukan menggunakan *colony counter*. Cara perhitungan menggunakan alat ini adalah (Brown, 2005):

1. Pemilihan cawan dengan jumlah bakteri berkisar antara 30-300 koloni.
2. Cawan diletakkan pada *colony counter* dalam keadaan terbuka. Perhitungan dimulai dari bagian paling atas cawan dengan menggunakan garis bantu untuk menghindari perhitungan ganda pada koloni yang sama.
3. Menghitung jumlah bakteri per mL suspensi yang ditanamkan pada cawan. Sebagai contoh, apabila jumlah bakteri yang terhitung adalah 220 koloni, sedangkan suspensi yang ditanamkan pada cawan sebanyak 0,1 mL dengan pengenceran 1:1.000.000, maka jumlah bakteri per 1 mL suspensi adalah : $220 \text{ koloni} \times 10^6 \times 10 = 2,2 \times 10^9$ koloni.

Bakteri yang tumbuh memiliki kemungkinan bergabung dengan bakteri lain membentuk suatu kumpulan. Apabila jumlah bakteri dinyatakan dalam satuan bakteri per mililiter, jumlah bakteri yang terhitung akan lebih sedikit dari jumlah bakteri tunggal yang seharusnya karena satu kumpulan bakteri hanya akan menghasilkan satu koloni. Oleh karena itu, jumlah bakteri dinyatakan dengan *colony forming unit* (CFU) per mililiter (Brooks *et al.*, 2001).

2.7 *Aeromonas hydrophila*

Menurut Prajitno (2008), klasifikasi *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schyzomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadineae
Suku	: Vibrionaceae
Marga	: <i>Aeromonas</i>
Jenis	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

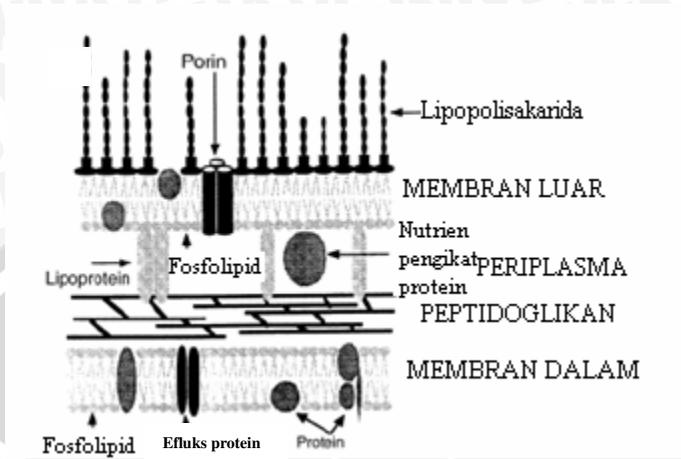
Bakteri *A. hydrophila* dapat menyebabkan penyakit *haemorrhagic septicemia* pada ikan, yaitu penyakit yang

merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Bakteri ini berbentuk batang dengan ukuran $0,7-0,8 \mu\text{m} \times 1,0-1,5\mu\text{m}$, bersifat anaerob fakultatif, bersifat meragikan glukosa, fruktosa, maltosa, dan tetrahalosa menjadi asam atau asam dengan gas. Bakteri ini dapat juga mereduksi nitrat menjadi nitrit. Tes sitokrom oksidase dan katalase menunjukkan hasil positif (Prajitno, 2008).

Berdasarkan pada pewarnaan diferensial (pewarnaan gram), *A. hydrophila* termasuk dalam bakteri gram negatif. Bakteri ini tumbuh optimum pada temperatur $28-41 \text{ }^\circ\text{C}$ dan biasa diisolasi dari kulit ikan yang terluka atau dari insang (Prajitno, 2008).

Bakteri gram negatif berbeda pada bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram positif tersusun atas 50 % peptidoglikan, sedangkan pada gram negatif hanya mengandung peptidoglikan sebanyak 10 %. Pada bakteri gram negatif terdapat membran luar yang mengelilingi lapisan peptidoglikan, membran ini menyebabkan dinding sel bakteri gram negatif kaya akan lipid (Madigan *et al.*, 2009).

Membran luar dinding sel bakteri gram negatif tersusun atas lipopolisakarida (LPS), lipoprotein, dan fosfolipid. Membran ini berfungsi sebagai penghalang masuknya senyawa antibiotik, enzim pencernaan seperti lisozim, detergen, dan logam berat. Namun, tidak semua senyawa terhalang untuk melalui membran tersebut. Pada membran ini terdapat bagian yang bersifat permeabel berupa protein yang disebut porin. Porin mampu melewatkan molekul seperti nukleotida, peptida, asam amino, vitamin B12, besi dan gula monosakarida ataupun oligosakarida. Molekul-molekul tersebut diperlukan oleh bakteri sebagai nutrisi untuk menopang metabolisme selnya (Tortora *et al.*, 2001). Struktur dinding sel bakteri gram negatif ditunjukkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur Dinding Sel Bakteri Gram Negatif

Pergerakan senyawa melalui membran plasma baik pada prokariot maupun eukariot dibagi menjadi 2 macam, yaitu pasif dan aktif. Pada proses pasif senyawa keluar-masuk membran dari daerah dengan konsentrasi tinggi ke daerah dengan konsentrasi rendah tanpa melibatkan energi berupa ATP. Proses pasif dapat dibagi menjadi 2 macam, yaitu difusi dan osmosis. Difusi merupakan proses pergerakan molekul atau ion dari daerah berkonsentrasi tinggi ke rendah. Sedangkan osmosis merupakan pergerakan molekul pelarut (biasanya air) melewati membran permeabel dari daerah dengan konsentrasi pelarut tinggi ke daerah dengan konsentrasi pelarut rendah (Tortora *et al.*, 2001).

Salah satu fungsi dari dinding sel bakteri adalah untuk melindungi bakteri dari kerusakan oleh tekanan osmotik. Apabila zat terlarut mempunyai konsentrasi yang lebih tinggi (hipertonis) pada lingkungan hidup bakteri daripada di dalam sel, maka cairan akan mengalir ke luar menyebabkan efek yang disebut plasmolisis. Sedangkan apabila zat terlarut di dalam sel bakteri mempunyai konsentrasi lebih tinggi daripada lingkungan hidupnya maka cairan akan mengalir masuk ke dalam sel menimbulkan efek yang disebut plasmotipsis (Prescott *et al.*, 2005).

2.8 Hubungan Struktur dan Aktivitas Senyawa terhadap Sifatnya sebagai Antibakteri

Fenol merupakan salah satu senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Mekanisme penghambatan fenol terhadap bakteri berhubungan dengan sifat fenol yang sangat larut terhadap fosfolipid, yang merupakan salah satu molekul penting penyusun dinding sel bakteri. Gugus hidroksil senyawa fenol akan membentuk ikatan hidrogen dengan permukaan fosfolipid yang berperan sebagai penarik proton (Messaoud dan Miloudi, 2007).

Pada perusakan membran sel bakteri, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel, akibatnya membran sel akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan atau bahkan kematian (Gilman *et al.*, 1991).

Adanya sakarida yang terikat pada suatu senyawa dapat mempengaruhi aktivitas biologi senyawa tersebut. Monosakarida yang berikatan dengan senyawa 9-hidroksieliptisin terbukti dapat meningkatkan kelarutan senyawa tersebut dalam air dan mempengaruhi permeabilitas serta toksisitasnya terhadap mikroorganisme (Jonsson *et al.*, 1989).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Isolasi oleoresin lengkuas merah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Brawijaya, Malang; Analisis KC-SM dilaksanakan di Laboratorium Pengujian Balai Besar Riset Pengolahan Produk Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Departemen Kelautan dan Perikanan, Jakarta; Uji aktivitas antibakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang mulai bulan Oktober-Desember 2008.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rimpang lengkuas merah (*A. purpurata* K Schum), etanol 96 % teknis, akuades, plat KLT silika gel GF₂₅₄ ukuran 10 x 20 cm, etil asetat teknis, toluen teknis, asetonitril p.a, larutan FeCl₃ 1 %, Mueller Hinton Broth, biakan *A. hydrophila*, Nutrient Agar Plate (NAP), BaCl₂.2H₂O 1,175 %, H₂SO₄ 1 %, kertas saring Whatman no. 40, kertas tissue, korek api, aluminium foil, dan plastik.

3.2.2 Alat-alat penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah oven, blender, ayakan ukuran 30 mesh, gelas pengaduk, corong Buchner dan penyaring vakum, rotary evaporator pengurangan tekanan, neraca analitik, corong pisah, pipet ukur 10 mL, pipet tetes, pipa kapiler, tabung reaksi, jarum ose, cawan petri, rak tabung reaksi, colony counter dan seperangkat alat KC-SM merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000.

3.3 Tahapan Penelitian

1. Preparasi bahan penelitian
2. Ekstraksi oleoresin

3. Pemisahan senyawa dalam oleoresin dengan KLT
4. Uji fenolik
5. Karakterisasi senyawa dalam oleoresin menggunakan metode KC-SM
6. Uji aktivitas oleoresin lengkuas merah sebagai antibakteri *A. hydrophila*

3.4 Prosedur Kerja Penelitian

3.4.1 Preparasi Bahan Penelitian

Rimpang lengkuas merah segar dicuci dengan air bersih, diiris tipis-tipis, dan ditimbang beratnya. Irisan rimpang tersebut dikeringkan dalam oven pada temperatur 55 °C selama 20-24 jam sampai diperoleh berat konstan. Rimpang lengkuas yang telah dikeringkan ditimbang beratnya untuk mengetahui kadar air, kemudian dilakukan pengecilan ukuran bahan dengan pembレンダー dengan kecepatan tinggi sampai berbentuk serbuk. Serbuk lengkuas merah kemudian diayak menggunakan ayakan ukuran 30 mesh.

3.4.2 Ekstraksi Oleoresin

Serbuk lengkuas merah hasil pengayakan 30 mesh sebanyak 1185,3 g dimaserasi dengan pelarut etanol 96 % sampai pelarut berada \pm 1-2 cm di atas bahan yang diekstraksi dan didiamkan selama \pm 24 jam. Hasil maserasi disaring menggunakan penyaring vakum. Residu hasil penyaringan dilakukan maserasi kembali dan disaring. Filtrat yang diperoleh dari hasil penyaringan maserasi pertama dan kedua digabungkan kemudian pelarutnya diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pengurangan tekanan hingga tidak ada lagi cairan yang menetes pada kondensor. Ekstrak yang diperoleh dimasukkan dalam corong pisah dan didiamkan sampai terlihat jelas batas antar lapisan. Fraksi minyak pada bagian bawah (oleoresin) diambil dan ditimbang beratnya untuk menentukan rendemen.

3.4.3 Pemisahan dengan KLT

Eluen campuran toluen dan etil asetat dibuat dengan perbandingan 1:9, 3:7, 7:3, dan 9:1 dalam 4 bejana berbeda, kemudian bejana ditutup dan dibiarkan sampai jenuh. Oleoresin lengkuas merah ditotolkan pada 4 buah plat KLT yang berbeda menggunakan pipa kapiler dan dibiarkan sampai kering. Plat kemudian dielusi menggunakan eluen yang telah jenuh sampai batas yang telah ditentukan.

3.4.4 Uji Fenolik

Plat KLT yang telah dielusi disemprot dengan larutan FeCl_3 1 % kemudian diamati perubahan warna yang terjadi.

3.4.5 Karakterisasi Senyawa Penyusun Oleoresin Menggunakan KC-SM

Dipipet 20 μL oleoresin hasil isolasi kemudian diinjeksikan ke dalam alat KC-SM merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000 dengan fase diam C_{18} (Kolom Shimadzu Shim Pack VP ODS) dan fase gerak asetonitril dengan kondisi operasional:

Temperatur kolom : 30 °C
Panjang kolom : 15 cm
Program landaian :

t (menit)	0	10	20	25	36	38	40
% asetonitril	10	45	85	100	100	10	10

Kecepatan alir : 0,2 mL/menit
Detektor : spektrometer massa (m/z 150-700)
Jenis pengionan : *electrospray ionization* (ESI)

3.4.6 Uji Aktivitas Oleoresin Lengkuas Merah sebagai Antibakteri *A. hydrophila*

a. Pembuatan Larutan *Nutrient Agar*

Sebanyak 2 g *nutrient agar* dilarutkan dalam 100 mL akuades dan dipanaskan sampai mendidih. Larutan *nutrient agar* dimasukkan dalam wadah yang dibutuhkan (tabung reaksi untuk peremajaan biakan murni dan cawan petri untuk

uji KBM). Tabung reaksi ditutup dengan kapas, sedangkan cawan petri dibungkus dengan kertas. Selanjutnya larutan *nutrient agar* dalam tabung reaksi dan cawan petri disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit pada tekanan 15 Psi. Kemudian tabung reaksi diletakkan dalam posisi miring selama 24 jam pada temperatur ruang.

b. Pembuatan Muller Hinton Broth (Media Produksi)

Daging sapi dicuci bersih dan dipotong kecil-kecil. Potongan daging tersebut kemudian dimasak dalam 1000 mL akuades dan dibiarkan mendidih selama 25 menit. Kaldu yang diperoleh disaring dengan kapas atau kain kasa. Pepton dilarutkan kedalam air kaldu hingga rata dan media diatur pada pH 7, kemudian media yang telah siap dimasukkan ke dalam tabung reaksi atau erlenmeyer. Tabung reaksi dan erlenmeyer tersebut disumbat kapas. Tutup tersebut dibungkus kertas dan diikat dengan benang kasur. Selanjutnya media disterilisasi dengan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit.

c. Peremajaan Biakan Murni *A. hydrophila*

Biakan murni *A. hydrophila* digoreskan secara aseptis dengan jarum *ose* pada *Nutrient Agar Plate* (NAP) pada posisi miring dan tabung media agar ditutup dengan kapas berlemak. Selanjutnya biakan *A. hydrophila* diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 37 °C.

d. Pembuatan Larutan Bakteri *A. hydrophila*

Pada pembuatan larutan bakteri digunakan konsentrasi standar bakteri sebesar 0,5 McFarland (10^8 sel/mL). Larutan 0,5 McFarland dibuat dengan mencampurkan 0,05 mL $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.175% dengan 9,95 mL H_2SO_4 1 %. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 1×10^6 sel/mL, maka larutan suspensi bakteri yang memiliki kekeruhan yang sama dengan 0,5 McFarland dipipet sebanyak 0,1 mL kemudian ditambahkan Muller Hinton Broth hingga volume akhir 10 mL dan dicampur hingga rata.

e. Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung

Disiapkan sebanyak 7 buah tabung steril. Suspensi bakteri *A. hydrophila* dengan konsentrasi 10^6 sel/mL dimasukkan pada tabung no. 1 kemudian ditambah 1 mL Muller Hinton Broth. Oleoresin lengkuas merah dengan konsentrasi 0 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, dan 4 % (b/v) dimasukkan pada tabung no. 2-7, masing-masing sebanyak 1 mL. Suspensi *A. hydrophila* ditambahkan sebanyak 1 mL pada tabung no. 2-7, kemudian diinkubasikan pada temperatur $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam. Pada hari kedua dilakukan pengamatan terhadap kekeruhan pada tabung no. 2-7 dan ditentukan KHM oleoresin lengkuas merah terhadap *A. hydrophila* dengan cara menentukan konsentrasi terendah larutan oleoresin lengkuas merah yang tampak jernih.

f. Penentuan KBM dengan Metode *Streaking*

Dilakukan penggoresan suspensi bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam dari tabung hasil dilusi tabung no. 2-7 pada NAP menggunakan *loop* yang telah disterilkan, kemudian cawan diinkubasi pada temperatur $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 18 jam. Pada hari ketiga, jumlah koloni *A. hydrophila* yang tumbuh pada NAP dihitung dengan menggunakan *colony counter*. KBM ditentukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah oleoresin lengkuas merah yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri pada cawan petri.

3.5 Analisis Data

Berdasarkan perubahan warna pada plat KLT yang telah disemprot larutan FeCl_3 1 % dapat ditentukan kandungan senyawa fenol dalam oleoresin. Analisis menggunakan KC-SM akan diperoleh pola fragmentasi senyawa-senyawa dalam oleoresin lengkuas merah dan dengan melakukan interpretasi terhadap pola fragmentasi senyawa tersebut, dapat ditentukan hubungan pola fragmentasi dengan struktur senyawanya. Penentuan nilai KHM dilakukan berdasarkan tingkat kekeruhan pada tabung dengan berbagai variasi konsentrasi oleoresin yang telah ditambahkan suspensi *A. hydrophila*, sedangkan nilai KBM ditentukan berdasarkan hasil pengamatan jumlah bakteri

pada cawan petri. Data yang diperoleh pada penentuan KBM dianalisis menggunakan analisis regresi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada preparasi bahan penelitian, lengkuas merah dikeringkan pada temperatur 55 °C untuk mencegah rusaknya senyawa yang termolabil atau hilangnya sebagian besar komponen minyak atsiri yang bersifat volatil. Senyawa-senyawa tersebut akan menguap apabila temperatur pemanasan terlalu tinggi.

Oleoresin lengkuas merah diperoleh melalui metode ekstraksi maserasi. Sebanyak 1185,3 g serbuk lengkuas merah diekstraksi menggunakan etanol 96 % dilanjutkan dengan penguapan pelarutnya menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 96 mL. Ekstrak yang diperoleh difraksinasi menggunakan corong pisah dan diambil lapisan paling bawah yang merupakan fraksi minyaknya (oleoresin). Oleoresin yang diperoleh adalah sebanyak 51,94 g atau dengan kata lain rendemen oleoresin yang diperoleh adalah 4,38 % (dihitung dari berat serbuk lengkuas merah yang dimaserasi) (Lampiran L.3.1).

4.1 Uji Fenolik

Uji ini dilakukan pada plat hasil KLT yang dielusi dengan eluen campuran toluen dan etil asetat kemudian disemprot dengan larutan FeCl_3 1 %. Reaksi positif ditandai dengan terjadinya perubahan warna karena terbentuknya senyawa kompleks antara fenol atau turunannya dengan FeCl_3 . Hasil uji fenolik oleoresin dapat dilihat pada Tabel 4.1 dan Lampiran L.6.2.

Tabel 4.1 Hasil Pengamatan terhadap Uji Fenolik Oleoresin

Komposisi eluen (toluen:etil asetat)	Noda setelah dielusi	Noda setelah disemprot FeCl_3 1%	R_f	Keterangan
1:9	-	-	-	Tidak terdapat noda
3:7	-	+	0,5	Noda coklat tua
7:3	-	-	-	Tidak terdapat noda
9:1	-	+	0,46	Noda coklat tua

Keterangan: tanda (+) menunjukkan adanya noda
tanda (-) menunjukkan tidak adanya noda

Berdasarkan hasil pengamatan pada Tabel 4.1 diketahui bahwa campuran eluen toluen:etil asetat 3:7 dan 9:1 menghasilkan sebuah noda berwarna coklat tua dengan nilai R_f berturut-turut 0,5 dan 0,46. Noda tersebut tidak dapat dipastikan hanya mengandung satu jenis senyawa, tetapi kemungkinan masih berupa campuran beberapa senyawa akibat pemisahan yang kurang sempurna.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Aree (2005), ekstrak etanol yang dipisahkan dengan KLT menggunakan eluen campuran toluen-etil asetat 9:1 diperoleh noda dengan nilai R_f 0,69. Apabila dibandingkan dengan penelitian tersebut, nilai R_f yang diperoleh pada penelitian ini lebih kecil. Hal ini diduga karena senyawa fenol dalam tumbuhan pada umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida. Adanya gula tersebut akan menambah polaritas senyawa sehingga senyawa tersebut lebih tertahan pada silika sebagai fase diam yang juga bersifat polar daripada ikut terelusi bersama eluen yang bersifat nonpolar.

Senyawa yang diduga memberikan hasil positif dengan $FeCl_3$ adalah senyawa turunan fenol dalam campuran yang terdapat pada noda yang dihasilkan yang berada dalam keadaan bebas (tidak berikatan dengan gula), misalnya senyawa trans p-hidroksinamaldehyd, trans - p - kumaril alkohol, trans-p-hidroksinamil asetat, p-hidroksibenzaldehyd, dan senyawa-senyawa turunan kavikol. Struktur senyawa-senyawa tersebut dirujuk pada Gambar 2.4.

4.2 Analisis Komponen Utama Oleoresin Lengkuas Merah Menggunakan KC-SM

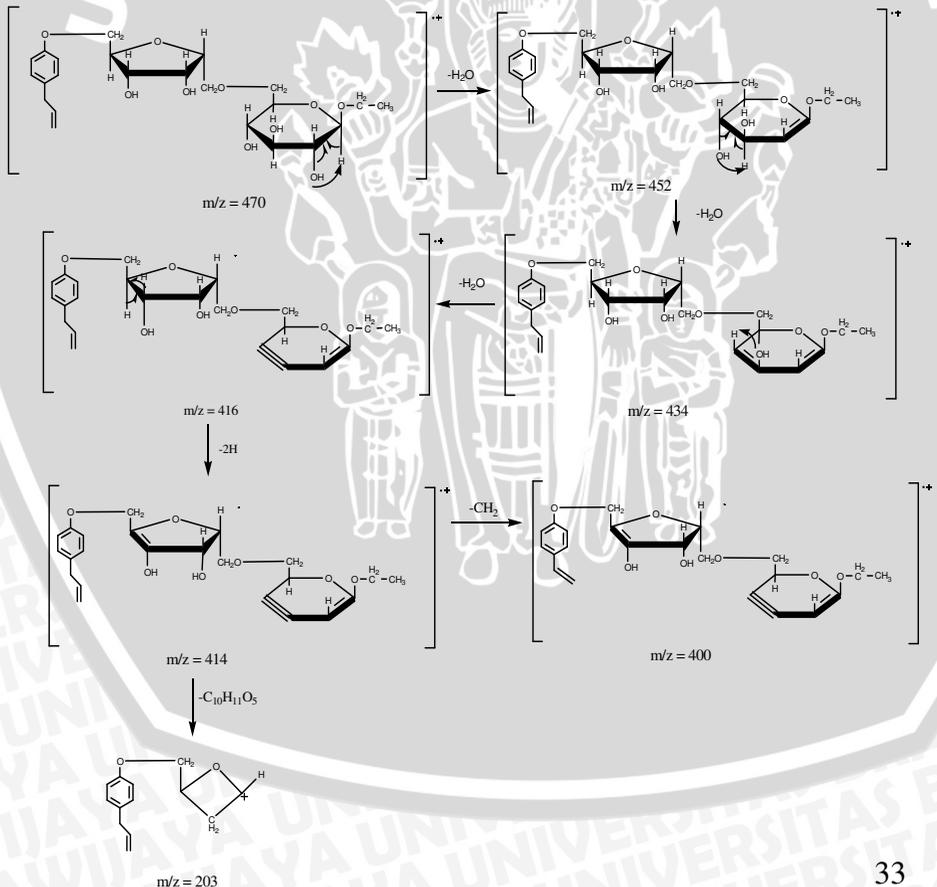
Oleoresin lengkuas merah yang diperoleh dianalisis komponennya menggunakan KC-SM. Sebelum dilakukan analisis menggunakan Spektrometri Massa (SM), komponen-komponen di dalam oleoresin dipisahkan menggunakan metode KC fase terbalik yang biasa digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa polar. Pada metode ini, fase gerak (asetonitril) bersifat polar sehingga senyawa yang lebih polar akan terelusi lebih dahulu bersama eluen dibandingkan senyawa yang kurang polar. Kromatogram KC oleoresin lengkuas merah disajikan pada Lampiran L.4.2.

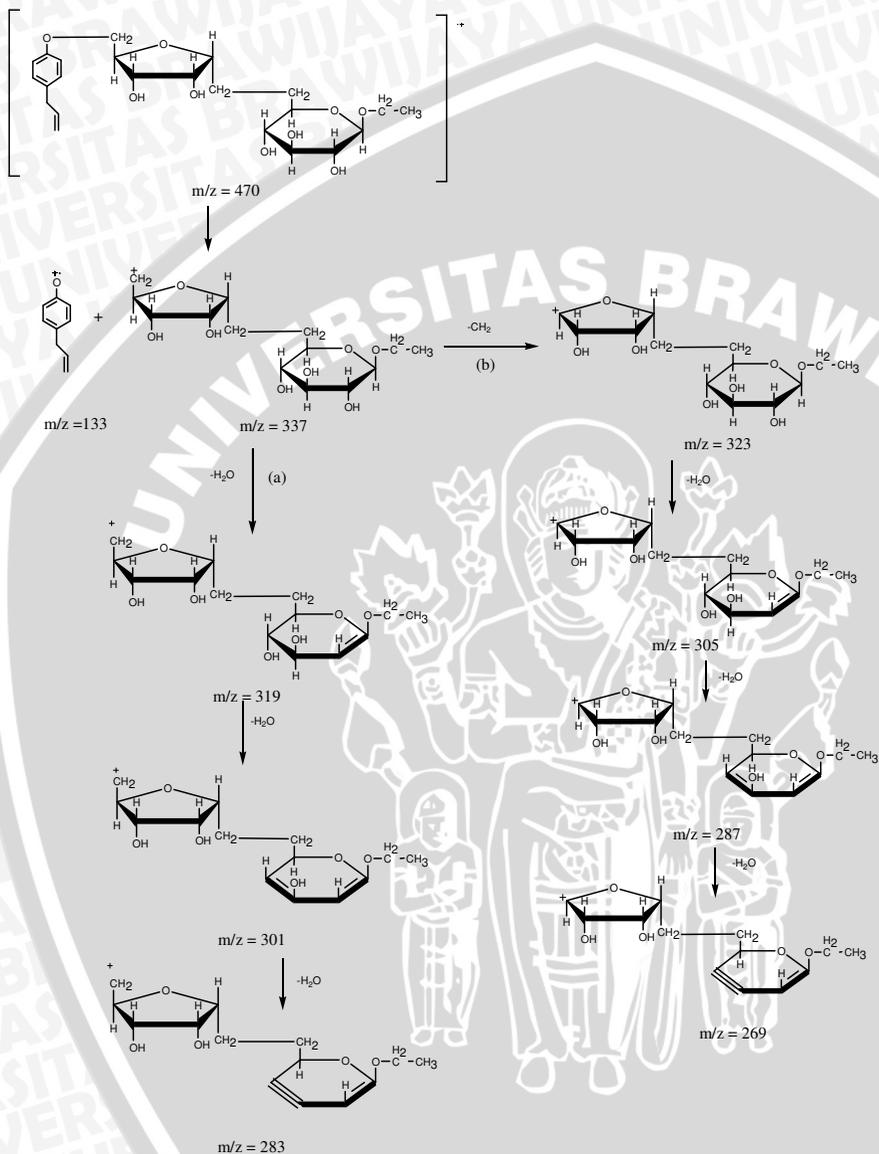
Berdasarkan kromatogram pada gambar pada Lampiran L.4.2, dapat diketahui ada 31 komponen penyusun oleoresin lengkuas merah. Diantara komponen-komponen tersebut, 6 komponen utama memiliki % area puncak di atas 4 %. Komponen tersebut berturut-turut mempunyai waktu retensi 8,697, 11,818, 12,753, 13,771, 15,255, dan 17,159 menit.

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 8,697 menit (puncak no. 9 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.1. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.1 menunjukkan puncak pada m/z 414, 400, 323, 283, 269, 203, dan 133. Puncak m/z 414 mempunyai kelimpahan yang paling tinggi (*base peak*) sehingga puncak tersebut mempunyai fragmen yang paling stabil. Puncak tersebut diperoleh melalui pelepasan 3 molekul air (M-54) berturut-turut dari m/z 470 menghasilkan m/z 416 dilanjutkan pelepasan 2 hidrogen radikal (M-2) secara homolitik. Puncak m/z 400 diperoleh melalui pelepasan CH_2 (M-14) dari m/z 414. Selain cara tersebut, puncak m/z 414 juga dapat melepaskan $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5$ (M-211) menghasilkan m/z 203. Puncak m/z 133 dan 337 diperoleh melalui cara fragmentasi yang berbeda dari m/z 470. Selanjutnya puncak m/z 337 mengalami 2 cara fragmentasi. Fragmentasi pertama (cara a) melepaskan molekul air (M-18) berturut-turut menghasilkan puncak m/z 319, 301, dan 283. Sedangkan cara kedua (cara b) dengan melepaskan CH_2 (M-14) dihasilkan puncak m/z 323 dilanjutkan pelepasan molekul air (M-18) berturut-turut menghasilkan puncak m/z 305, 287, dan 269. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.2 dan Gambar 4.1.

Tabel 4.2 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 8,697 menit

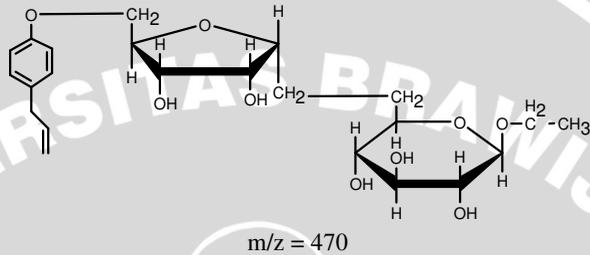
m/z	M-x	Fragmen
416	M-54	$C_{23}H_{28}O_7^+$
414	M-2	$C_{23}H_{26}O_7^+$
323	M-14	$C_{13}H_{23}O_9^+$
319	M-18	$C_{14}H_{23}O_8^+$
305	M-18	$C_{13}H_{21}O_8^+$
301	M-18	$C_{14}H_{21}O_7^+$
283	M-18	$C_{14}H_{19}O_6^+$
269	M-18	$C_{13}H_{17}O_6^+$
203	M-211	$C_{13}H_{15}O_2^+$
133	M-337	$C_9H_9O^+$





Gambar 4.1 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 8,697 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.1 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 8,697 menit adalah kavikol glukofuranosil - β - etil glukopiranosida dengan berat molekul 470. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.2.

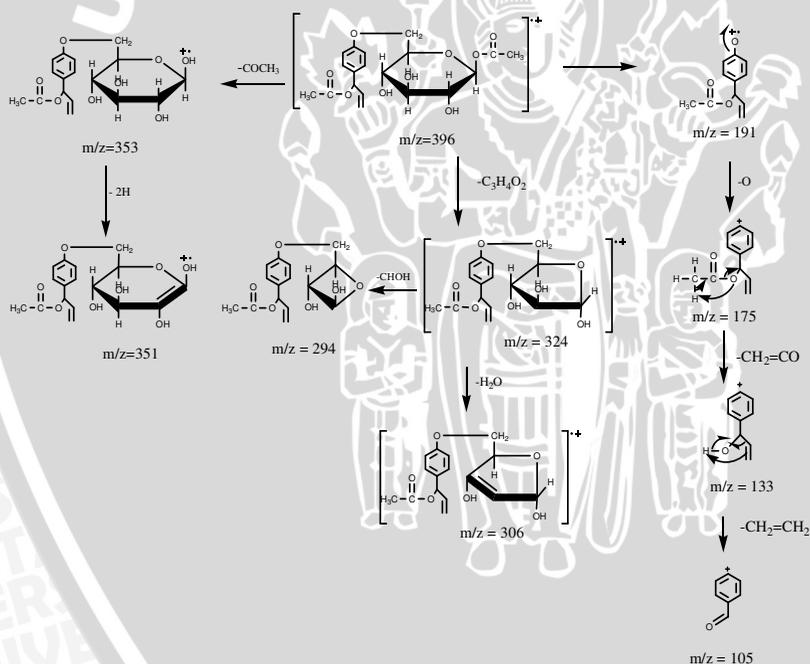


Gambar 4.2 Struktur Senyawa kavikol glukofuranosil - β - etil glukopiranosida

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 11,818 menit (puncak no. 14 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.2. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.2 menunjukkan puncak pada m/z 351, 306, 294, 175, 133, dan 105. Puncak m/z 351 diperoleh melalui pelepasan COCH_3 (M-43) dari m/z 396 menghasilkan m/z 353 dilanjutkan oleh pelepasan 2 buah hidrogen radikal (M-2). Pelepasan $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ (M-72) dari m/z 396 menghasilkan puncak m/z 324. Selanjutnya m/z 324 melepaskan molekul air (M-18) sehingga dihasilkan puncak m/z 306. Selain cara tersebut, puncak m/z 324 juga dapat melepaskan radikal CHOH (M-30) menghasilkan puncak m/z 294. Pelepasan molekul $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_6$ (M-205) dari m/z 396 menghasilkan puncak m/z 191, dilanjutkan pelepasan oksigen radikal (M-16) sehingga dihasilkan puncak m/z 175. Pelepasan $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ dari m/z 175 menghasilkan puncak m/z 133, dilanjutkan pelepasan $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ (M-28) menghasilkan puncak m/z 105. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.3.

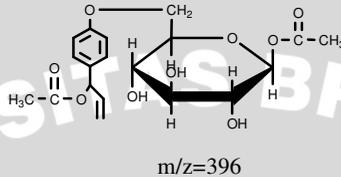
Tabel 4.3 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 11,818 menit

m/z	M-x	Fragmen
353	M-43	$C_{17}H_{21}O_8^+$
351	M-2	$C_{17}H_{19}O_8^+$
324	M-72	$C_{16}H_{20}O_7^+$
306	M-18	$C_{16}H_{18}O_6^+$
294	M-30	$C_{15}H_{18}O_6^+$
191	M-205	$C_{11}H_{11}O_3^+$
175	M-16	$C_{11}H_{11}O_2^+$
133	M-42	$C_9H_9O^+$
105	M-28	$C_7H_5O^+$



Gambar 4.3 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 11,818 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.3 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 11,818 menit adalah asetoksikavikol - β -asetil glukopiranosida dengan berat molekul 396. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.4.

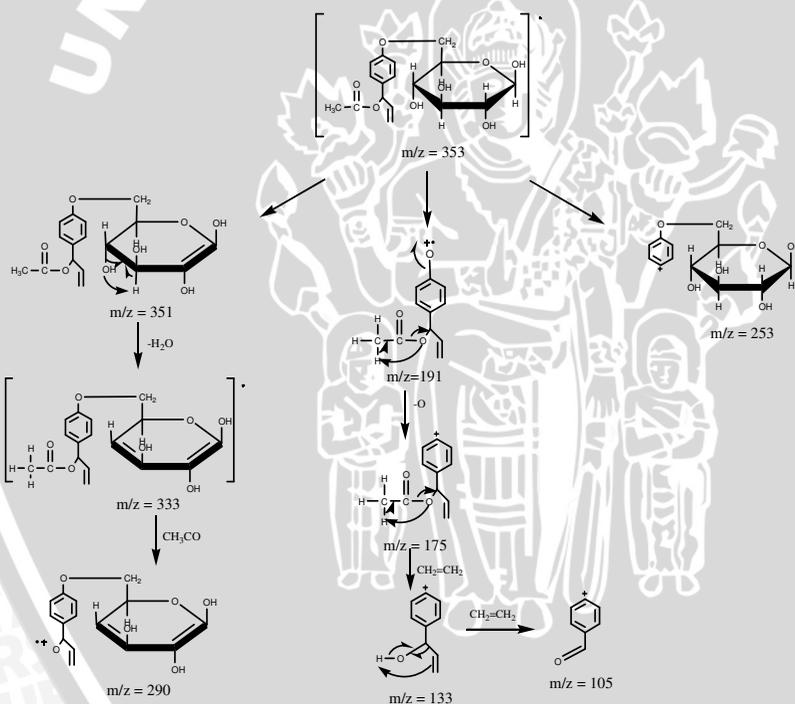


Gambar 4.4 Struktur Senyawa asetoksikavikol - β -asetil glukopiranosida

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 12,753 menit (puncak no. 15 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.3. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.3 menunjukkan puncak pada m/z 353, 351, 290, 253, 199, 175, 133, dan 105. Puncak m/z 351 dihasilkan dari pelepasan 2 buah hidrogen radikal dari ion molekul m/z 353. Puncak m/z 351 melepaskan molekul air menghasilkan puncak m/z 333 (M-18), dilanjutkan pelepasan CH_3CO (M-43) menghasilkan puncak m/z 290. Pelepasan molekul $\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_2$ (M-100) dari m/z 353 menghasilkan puncak m/z 253. Pelepasan $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ (M-162) dari ion molekul m/z 353, dilanjutkan dengan pelepasan oksigen radikal (M-16) akan menghasilkan puncak m/z 175. Selanjutnya puncak m/z 175 melepaskan $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ menghasilkan puncak m/z 133 (M-42) dilanjutkan pelepasan $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ (M-28) sehingga dihasilkan puncak m/z 105. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.4 dan Gambar 4.5.

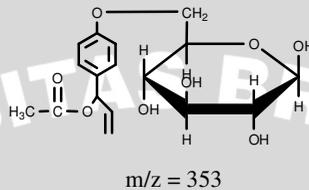
Tabel 4.4 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 12,753 menit

m/z	M-x	Fragmen
351	M-2	$C_{17}H_{19}O_8^+$
333	M-18	$C_{17}H_{17}O_7^+$
289	M-43	$C_{15}H_{13}O_6^+$
253	M-100	$C_{12}H_{13}O_6^+$
191	M-162	$C_{11}H_{11}O_3^+$
175	M-16	$C_{11}H_{11}O_2^+$
133	M-42	$C_9H_9O^+$
105	M-28	$C_7H_5O^+$



Gambar 4.5 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 12,753 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.5 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 12,753 menit adalah asetoksikavikol - β - glukopiranosida dengan berat molekul 353. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.6.



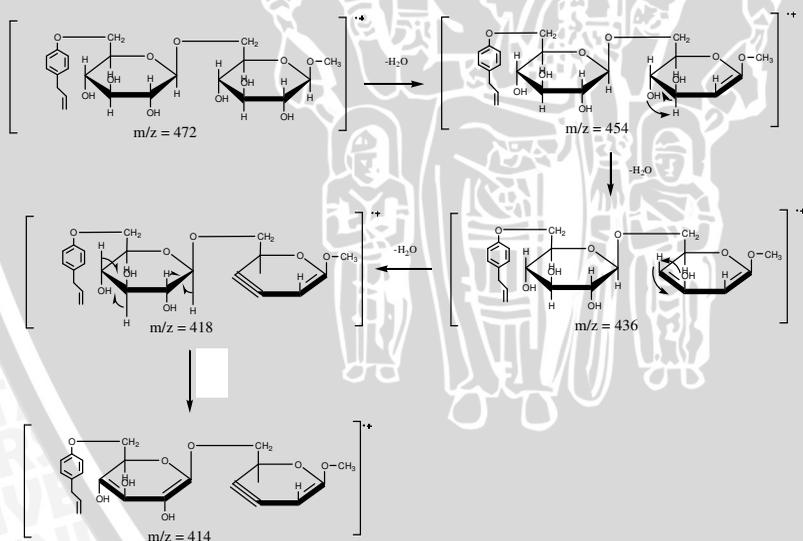
Gambar 4.6 Struktur Senyawa asetoksikavikol - β - glukopiranosida

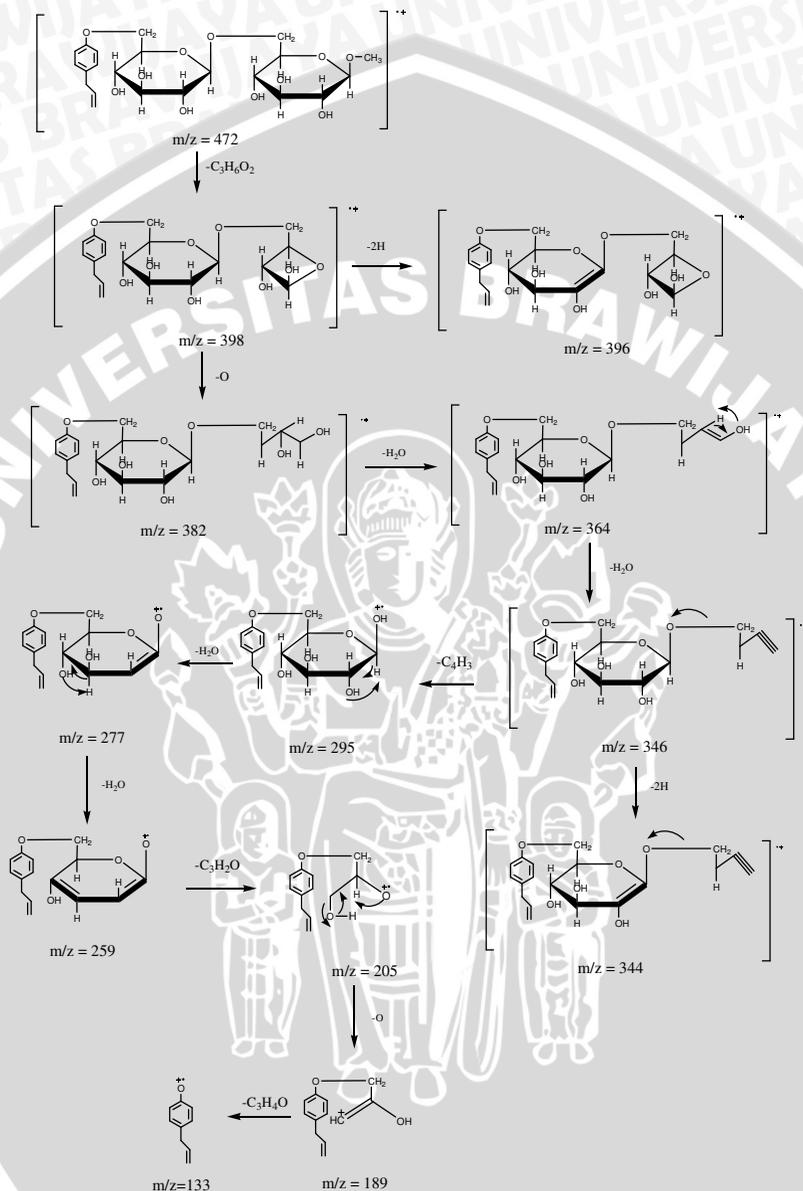
Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 13,771 menit (puncak no. 16 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.4. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.4 menunjukkan puncak pada m/z 436, 414, 396, 344, 325, 262, 205, 189, dan 133. Puncak m/z 436 dihasilkan dari pelepasan 2 buah molekul air (M-36) berturut-turut dari m/z 472. Pelepasan molekul air (M-18) dilanjutkan pelepasan 2 buah hidrogen radikal sebanyak 2 kali berturut-turut dari m/z 436 akan dihasilkan puncak m/z 414. Puncak m/z 472 menghasilkan puncak m/z 398 melalui pelepasan $C_3H_6O_2$ (M-74), kemudian dilanjutkan pelepasan 2 buah hidrogen radikal (M-2) sehingga dihasilkan puncak m/z 396. Puncak m/z 398 melepaskan radikal oksigen (M-16) menghasilkan m/z 382, dilanjutkan pelepasan molekul air berturut-turut menghasilkan puncak m/z 364 dan 346. Puncak m/z 346 melepaskan 2 buah hidrogen radikal (M-2) sehingga dihasilkan puncak m/z 344. Pelepasan C_4H_3 (M-51) dari m/z 346 akan menghasilkan puncak m/z 295, dilanjutkan pelepasan 2 molekul air berturut-turut menghasilkan puncak m/z 277 dan 259. Puncak m/z 259 melepaskan C_3H_2O (M-54) menghasilkan m/z 205 dilanjutkan pelepasan oksigen radikal (M-16) menghasilkan m/z 189. Puncak m/z 133 dihasilkan dari pelepasan C_3H_4O (M-56) dari m/z 189. Pola fragmentasi yang

disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.5 dan Gambar 4.7.

Tabel 4.5 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 13,771 menit

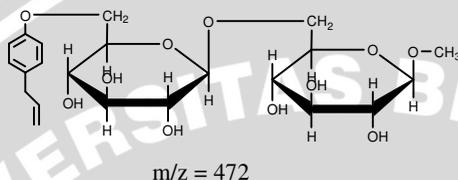
m/z	M-x	Fragmen
436	M-18	$C_{22}H_{12}O_{10}^{+}$
418	M-18	$C_{22}H_{10}O_9^{+}$
414	M-4	$C_{22}H_6O_9^{+}$
398	M-74	$C_{19}H_{26}O_9^{+}$
396	M-2	$C_{19}H_{24}O_9^{+}$
346	M-18	$C_{19}H_{22}O_6^{+}$
344	M-2	$C_{19}H_{20}O_6^{+}$
205	M-54	$C_{12}H_{13}O_3^{+}$
189	M-16	$C_{12}H_{13}O_2^{+}$
133	M-56	$C_9H_9O^{+}$





Gambar 4.7 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 13,771 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.7 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 13,771 menit adalah kavikol - β - metil maltosida dengan berat molekul 472. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.8.

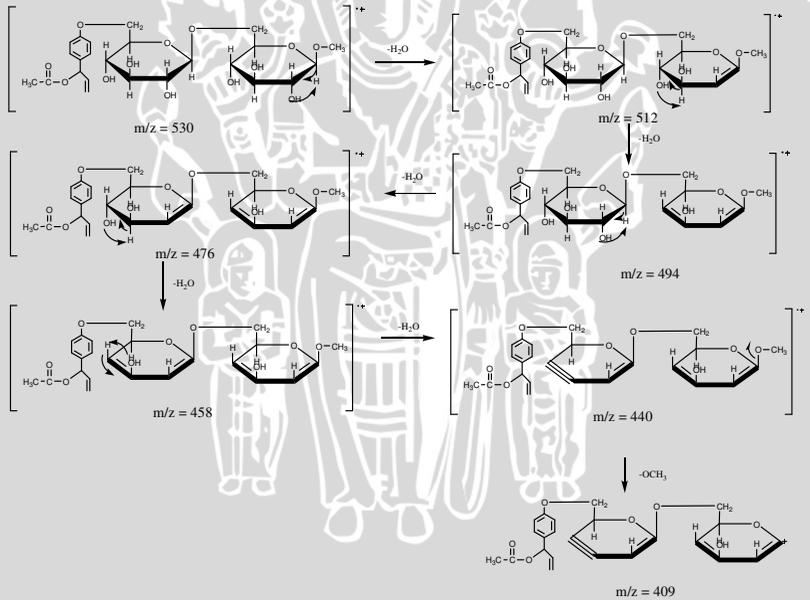


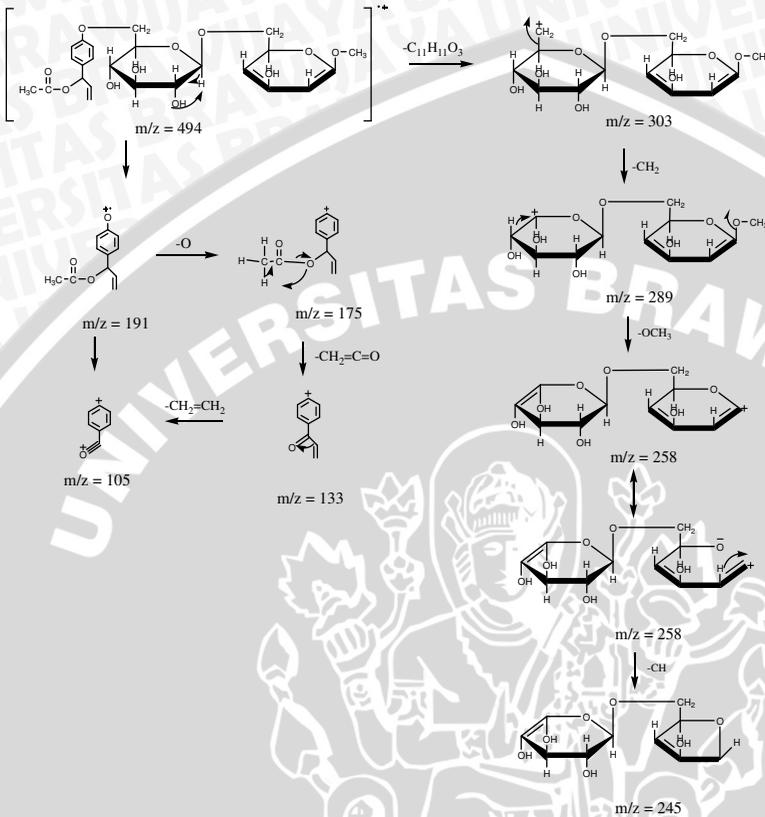
Gambar 4.8 Struktur Senyawa kavikol - β - metil maltosida

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 15,255 menit (puncak no. 18 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.5. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.5 menunjukkan puncak pada m/z 494, 409, 315, 289, 258, 245, 175, 133, dan 105. Puncak m/z 494 diperoleh melalui pelepasan 2 buah molekul air (M-36) dari m/z 530. Selanjutnya puncak m/z 494 melepaskan 2 buah molekul air (M-36) diikuti pelepasan radikal metoksi (M-31) sehingga dihasilkan puncak m/z 409. Pelepasan $C_{11}H_{11}O_3$ (M-191) dari m/z 494 menghasilkan puncak m/z 303. Puncak m/z 303 melepaskan CH_2 (M-14) menghasilkan puncak m/z 289, dilanjutkan dengan pelepasan radikal metoksi (M-31) sehingga dihasilkan puncak m/z 258. Puncak m/z 245 dihasilkan dari pelepasan CH (M-13) dari m/z 258. Puncak m/z 191 yang dihasilkan dari hasil fragmentasi m/z 494, kemudian melepaskan radikal oksigen (M-16) menghasilkan m/z 175, dilanjutkan pelepasan molekul $CH_2=C=O$ (M-42) menghasilkan m/z 133. Puncak m/z 105 dihasilkan dari pelepasan $CH_2=CH_2$ dari m/z 133 (M-28). Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.6 dan Gambar 4.9.

Tabel 4.6 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 15,255 menit

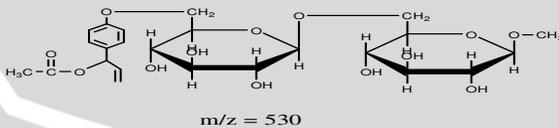
m/z	M-x	Fragmen
494	M-18	$C_{24}H_{30}O_{11}^{+}$
409	M-31	$C_{23}H_{21}O_7^{+}$
303	M-191	$C_{13}H_{19}O_8^{+}$
289	M-14	$C_{12}H_{17}O_8^{+}$
258	M-31	$C_{11}H_{14}O_7^{+}$
245	M-13	$C_{10}H_{13}O_7^{+}$
191	M-303	$C_{11}H_{11}O_3^{+}$
175	M-16	$C_{11}H_{11}O_2^{+}$
133	M-42	$C_9H_9O^{+}$
105	M-28	$C_7H_5O^{+}$





Gambar 4.9 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 15,255 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.9 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 15,255 menit adalah asetoksikavikol - β - metil maltosida dengan berat molekul 530. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.10.

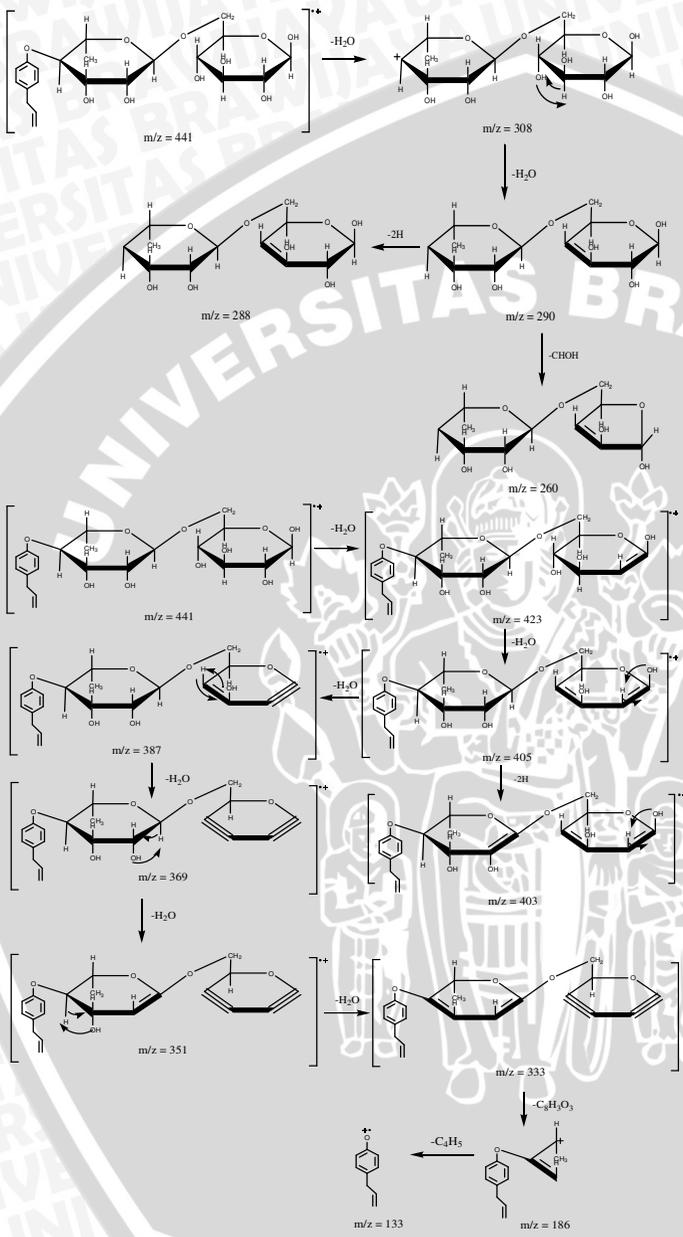


Gambar 4.10 Struktur Senyawa asetoksikavikol - β - metil maltosida

Spektra massa hasil analisis spektroskopi massa terhadap puncak senyawa dengan waktu retensi 17,159 menit (puncak no. 20 pada kromatogram KC oleoresin) disajikan pada Lampiran L.4.5.6. Hasil spektra massa pada Lampiran L.4.5.6 menunjukkan puncak pada m/z 403, 333, 288, 260, 186, dan 133. Puncak m/z 405 diperoleh melalui pelepasan 2 buah molekul air (M-36) dari m/z 441. Selanjutnya puncak tersebut melepaskan 2 buah hidrogen radikal (M-2) menghasilkan puncak m/z 403. Pelepasan 4 buah molekul air (M-72) dari puncak m/z 405 akan menghasilkan puncak m/z 333. Puncak m/z 186 dihasilkan dari pelepasan C₈H₃O₃ (M-147) dari m/z 333. Puncak m/z 133 dihasilkan melalui pelepasan C₄H₅ (M-53) dari m/z 186. Puncak m/z 308 dihasilkan melalui pelepasan C₉H₉O (M-133) dari puncak m/z 441. Pelepasan molekul air (M-18) dari m/z 308 menghasilkan puncak m/z 290. Pelepasan CHOH (M-30) dari puncak m/z 290 akan dihasilkan puncak m/z 260. Pola fragmentasi yang disarankan untuk senyawa tersebut disajikan pada Tabel 4.7 dan Gambar 4.11.

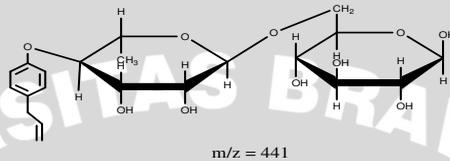
Tabel 4.7 Data Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 17,159 menit

m/z	M-x	Fragmen
405	M-18	C ₂₁ H ₂₅ O ₈ ⁺
403	M-2	C ₂₁ H ₂₃ O ₈ ⁺
333	M-18	C ₂₁ H ₁₇ O ₄ ⁺
308	M-133	C ₁₂ H ₂₀ O ₉ ⁺
290	M-18	C ₁₂ H ₁₈ O ₈ ⁺
288	M-2	C ₁₂ H ₁₆ O ₈ ⁺
260	M-30	C ₁₁ H ₁₆ O ₇ ⁺
186	M-147	C ₁₃ H ₁₄ O ⁺
133	M-53	C ₉ H ₉ O ⁺



Gambar 4.11 Pola Fragmentasi Komponen Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah dengan Waktu Retensi 17,159 menit

Berdasarkan pola fragmentasi pada Gambar 4.11 maka dapat diusulkan komponen penyusun oleoresin lengkuas merah dengan waktu retensi 17,159 menit adalah kavikol - β - rutinosa dengan berat molekul 441. Struktur senyawa tersebut disajikan pada Gambar 4.12.



Gambar 4.12 Struktur Senyawa kavikol - β - rutinosa

Hasil analisis terhadap pola fragmentasi 6 senyawa utama penyusun oleoresin lengkuas merah dapat diringkas seperti yang disajikan pada Tabel 4.8.

Tabel 4.8 Usulan terhadap Senyawa Utama Penyusun Oleoresin Lengkuas Merah

Nomor Puncak	Waktu Retensi (Menit)	% Area Puncak	Usulan Senyawa
9	8,697	4,29453	kavikol glukofuranosil- β -etil glukopiranosida
14	11,818	4,40266	asetoksikavikol- β - asetil glukopiranosida
15	12,753	13,79159	asetoksikavikol- β - glukopiranosida
16	13,771	5,37689	kavikol- β -metil- maltosida
18	15,255	39,00088	asetoksikavikol- β - metil maltosida
20	17,159	6,26217	kavikol- β -rutinosida

Berdasarkan spektra massa dan hasil fragmentasi 6 senyawa utama penyusun oleoresin lengkuas merah dapat diamati bahwa puncak m/z 133 selalu muncul dan mempunyai

kelimpahan yang besar. Puncak m/z 132/134 merupakan puncak yang khas untuk senyawa turunan kavikol (Lampiran L.5.1, L.5.2, dan L.5.3) .

Tabel 4.8 menunjukkan bahwa 6 senyawa utama penyusun oleoresin lengkuas merah adalah senyawa turunan kavikol yang berikatan O-glukosida dengan beberapa jenis gula. Hal ini disebabkan karena selain melarutkan senyawa yang terdapat di dalam minyak atsiri, etanol juga melarutkan gula yang terkandung dalam lengkuas merah.

Apabila dibandingkan dengan hasil uji fenolik, dapat diduga bahwa senyawa yang memberikan hasil positif adalah senyawa turunan fenol yang terdapat dalam keadaan bebas (tidak berikatan dengan gula). Senyawa-senyawa tersebut mempunyai kelimpahan yang kecil di dalam oleoresin sehingga tidak termasuk dalam 6 senyawa utama oleoresin lengkuas merah yang dikarakterisasi.

4.3 Uji Antibakteri

Prinsip dari uji antibakteri ini adalah untuk mengetahui pengaruh oleoresin lengkuas merah dalam pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* menggunakan metode dilusi tabung untuk menentukan KHM dan metode *streaking* untuk menentukan KBM.

4.3.1 Penentuan KHM dengan Metode Dilusi Tabung

Penentuan KHM menggunakan metode dilusi tabung dilakukan melalui pengamatan visual terhadap kekeruhan larutan oleoresin dengan berbagai konsentrasi yang telah ditambahkan suspensi bakteri. KHM merupakan konsentrasi terendah oleoresin yang menunjukkan hasil biakan yang mulai tampak jernih. Hasil pengamatan terhadap kekeruhan pada tabung hasil dilusi disajikan pada Tabel 4.9 atau dapat diamati pada Lampiran L.6.4.

Tabel 4.9 Hasil Pengamatan Tingkat Kekeruhan pada Tabung Reaksi

Konsentrasi oleoresin lengkuas merah (%)	Tingkat kekeruhan
0	++++
0,25	+++
0,5	++
1	+
2	-
4	-

Keterangan: tanda (+) menunjukkan tingkat kekeruhan
tanda (-) menunjukkan tidak terjadi kekeruhan

Berdasarkan data pada Tabel 4.9 dan Lampiran L.6.4, dapat diketahui bahwa biakan dalam tabung mulai tampak jernih pada konsentrasi 2 %. Tingkat kekeruhan menunjukkan banyaknya bakteri yang tumbuh. Semakin banyak bakteri yang tumbuh, maka larutan akan semakin keruh. Hasil biakan yang mulai tampak jernih pada konsentrasi oleoresin 2 % mengindikasikan bahwa pada konsentrasi tersebut oleoresin dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa nilai KHM oleoresin lengkuas merah terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah pada konsentrasi 2 %.

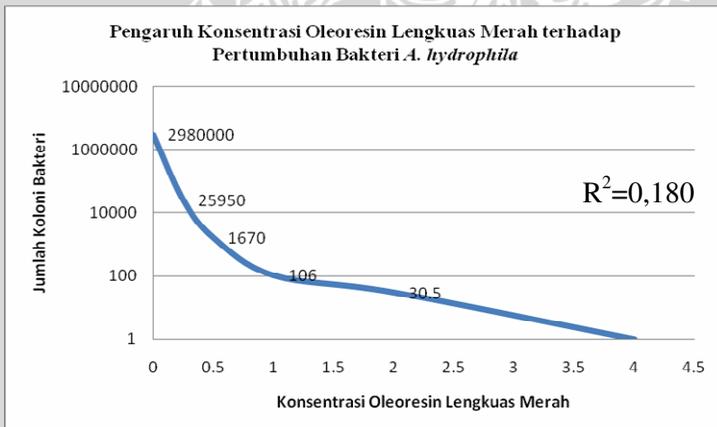
4.3.2 Penentuan KBM dengan Metode *Streaking*

Penentuan nilai KBM menggunakan metode *streaking* diperoleh dari hasil pengamatan pada NAP yang menunjukkan tidak adanya bakteri yang tumbuh. Hasil pengamatan terhadap pertumbuhan *A. hydrophila* pada media NAP dapat diamati pada Lampiran L.6.5, sedangkan hasil perhitungan koloni bakteri menggunakan *colony counter* disajikan pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni pada Media NAP

Konsentrasi Oleoresin Lengkuas Merah (%)	Replikasi		Rerata	Jumlah bakteri (CFU/plate)
	I	II		
0	301x10 ⁴	295x10 ⁴	298,0 x 10 ⁴	3,0 x 10 ⁶
0,25	253x10 ²	266x10 ²	259,5 x 10 ²	2,6 x 10 ⁴
0,5	161x10 ¹	173x10 ¹	167,0 x 10 ¹	1,7 x 10 ³
1	102	110	106,0	1,1 x 10 ²
2	26	35	30,5	3,1 x 10 ¹
4	0	0	0	0

Berdasarkan data pada Tabel 4.10, maka dapat dibuat grafik hubungan antara konsentrasi oleoresin lengkuas merah dengan pertumbuhan koloni bakteri *A. hydrophila* seperti Gambar 4.13.



Gambar 4.13 Grafik Hubungan Konsentrasi Oleoresin dengan Jumlah Koloni Bakteri

Berdasarkan perhitungan jumlah bakteri pada Tabel 4.10 dan Gambar 4.13, dapat diamati bahwa konsentrasi oleoresin lengkuas merah berbanding terbalik dengan jumlah bakteri, dimana semakin tinggi konsentrasi oleoresin lengkuas merah

maka semakin rendah jumlah bakteri. Gambar pada Lampiran L.6.5 (d) dan hasil perhitungan koloni bakteri pada Tabel 4.10 menunjukkan bahwa pada konsentrasi oleoresin 4 % tidak tampak adanya koloni bakteri yang dapat tumbuh. Dengan demikian nilai KBM oleoresin lengkuas merah terhadap bakteri *A. hydrophila* adalah 4 % karena pada konsentrasi tersebut tidak ada bakteri yang dapat bertahan hidup.

Senyawa yang dapat menghambat (bersifat bakteristatik) maupun yang membunuh bakteri (bersifat bakterisidal) belum dapat diketahui secara pasti karena senyawa tersebut terdapat dalam campuran di dalam oleoresin. Untuk mengetahui aktivitas masing-masing senyawa sebagai antibakteri perlu dilakukan suatu pemisahan.

Berdasarkan Tabel 4.8 diketahui bahwa senyawa yang memiliki kelimpahan terbesar adalah senyawa turunan kavikol. Difusi senyawa tersebut ke dalam tubuh bakteri diduga berhubungan dengan strukturnya yang berikatan dengan gula. Adanya gula hidrofily yang terikat pada senyawa tersebut dapat menambah kelarutannya dalam air atau dengan kata lain akan meningkatkan sifat hidrofilitas senyawa sehingga memfasilitasi senyawa antibakteri agar dapat masuk dalam dinding sel bakteri melalui porin.

Aktivitas senyawa tersebut dalam menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan karena kemampuannya dalam menghambat pembentukan asam nukleat dan protein serta mengganggu kerja enzim di dalam tubuh bakteri. Penghambatan pembentukan senyawa-senyawa penting dalam tubuh bakteri mengakibatkan metabolisme dalam tubuh bakteri terganggu sehingga pertumbuhan bakteri menjadi terhambat. Efek ini disebut sebagai efek bakteristatik dan dapat diamati pada konsentrasi oleoresin 2 %.

Sedangkan pada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu konsentrasi 4 %, diketahui bahwa oleoresin lengkuas merah dapat membunuh bakteri (bersifat bakterisidal). Konsentrasi yang lebih tinggi akan menyebabkan difusi senyawa berlangsung lebih cepat. Adanya cincin benzen dalam senyawa tersebut yang bersifat lipofil akan melarutkan membran fosfolipid yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel bakteri gram negatif. Apabila dinding sel telah lisis maka akan terjadi kebocoran yang mengakibatkan

zat-zat yang diperlukan oleh bakteri untuk metabolisme selnya terbuang keluar sehingga bakteri tidak dapat bertahan hidup karena nutrisinya tidak terpenuhi.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

1. Oleoresin lengkuas merah tersusun atas 6 komponen utama yang merupakan senyawa turunan kavikol yaitu kavikol glukofuranosil - β - etil glukopiranosida, kavikol - β - asetil glukopiranosida, asetoksi kavikol - β - glukopiranosida, kavikol - β - maltosida, asetoksikavikol - β - metil maltosida, dan kavikol - β - rutinosida.
2. Oleoresin lengkuas merah mempunyai daya hambat maupun daya bunuh terhadap bakteri *A. hydrophila* ditandai dengan nilai KHM pada konsentrasi oleoresin 2 % dan nilai KBM pada konsentrasi oleoresin 4 %.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai isolasi terhadap senyawa-senyawa penyusun oleoresin lengkuas merah, uji aktivitas masing-masing senyawa terhadap pertumbuhan bakteri, dan hubungan antara struktur dan aktivitas senyawa tersebut sebagai antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, E. Mulyono, dan Yulianingsih, **Prospek Oleoresin dan Penggunaannya di Indonesia**, http://www.atsiri-indonesia.com/uploaded_files/library_12makalah3_abu_bakar_oleoresin.pdf, diakses tanggal 12 Desember 2008
- Anonymous, **Mass Spectrometry Ionization Methods**, Department of Chemistry, The University of Adelaide, Australia, <http://www.chemistry.adelaide.edu.au/external/socrel/content/ionizatn.htm>, diakses tanggal 12 Desember 2008
- Anonymous, **TLC Visualization Reagent**, http://www.pretech.nu/public/MN/TLC_Reagents.pdf, diakses tanggal 8 April 2009
- Anam, C., 2000, **Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber officinale*): Kajian dari Ukuran, Bahan, Pelarut, Waktu, dan Temperatur**, Tesis, Universitas Brawijaya, Malang
- Aree, J.O., 2005, **Effects of The Zingiberaceae Spice Extracts on Growth and Morphological Changes of Foodborne Pathogens**, Thesis, http://sutir.sut.ac.th:8080/sutir/bitstream/123456789/1054/2/jirawan_oon_fulltext.pdf, diakses tanggal 20 Oktober 2008
- _____, T. Suzuki, P. Gasaluck, G. Eumkeb, 2005, **Antimicrobial Properties and Action of Galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on *Staphylococcus aureus***, http://203.158.6.22:8080/sutir/bitstream/123456789/2061/2/BIB1410_F.pdf, diakses tanggal 20 Oktober 2008
- Braithwaite, A. and F. J. Smith, 1985, **Chromatographic Methods**, Chapman & Hall, England
- Brooks, G. F., J. S. Butel, dan S. A. Morse, 2001, **Mikrobiologi Kedokteran**, Penerbit Salemba Medika, Jakarta
- Brown, A. E., 2005, **Microbial Applications**, 9th edition, Mc Graw Hill, USA
- Davidson, P. M. and Brannen, 1993, **Antimicrobials in Food**, Marcel Decker Inc., New York
- Decad, G. M., and H. Nikaido, 1976, **Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria XII. Molecular-Sieving Function of Cell Wall**, Journal of Bacteriology, <https://content.nejm.org/cgi/reprint/335/19/1445.pdf>, diakses tanggal 10 Desember 2008

- Douglas, B., D. H. McDaniel, and J. H. Alexander, 1983, **Concepts and Models of Inorganic Chemistry**, John Wiley and Son, Inc., Singapore
- Dwidjoseputro D, 1985, **Dasar-Dasar Mikrobiologi**, Penerbit Djambatan, Jakarta
- Dzen, S.M., Roekistiningsih, Santoso S., Winarsih S., 2003, **Bakteriologi Medik**, Bayu Media Publishing, Malang
- Fessenden, R.S., dan I. S. Fessenden, 1992, **Kimia Organik**, Jilid 2, Erlangga, Jakarta
- Foye, W. O., T. L. Lemke, D. A. Williams, 1995, **Principles of Medicinal Chemistry**, 4th edition, Williams and Wilkins, USA
- Gilman, A.G., T. Rall. Nies, and P. Taylor, 1991, **The Pharmacological Basic of Therapeutics**, Pengamongan Press Inc., New York
- Gritter, R. J., J. M. Bobbit, dan A. E. Schwarting, 1991, **Pengantar Kromatografi**, Edisi Kedua, Penerbit ITB, Bandung
- Harborne, J.B., 1996, **Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**, Penerbit ITB, Bandung
- Hui, Y. H., 1992, **Encyclopedia of Food Science and Technology**, Vol.11, John Wiley and Sons Inc., New York
- Jonsson, Jörgen, L. Eriksson, S. Hellberg, M. Jöström., and S. Wold, 1989, **A Multivariate Approach to Saccharide Quantitative Structure-Activity Relationships Exemplified by Two Series of 9-Hydroxyellipticine Glycosides**, http://actachemscand.dk/pdf/acta_vol_43_p0286-0289.pdf, diakses tanggal 12 Desember 2008
- Judarwanto, W., 2008, **Pengaruh Formalin Bagi Sistem Tubuh**, <http://puterakembara.org/archives8/00000066.shtml>, diakses tanggal 12 Maret 2009
- Kabelan, K., 2006, **Lengkuas Pengganti Formalin**, http://kabelankunia.blogspot.com/2008_07_01_archive.html, diakses tanggal 16 Desember 2007
- Ketaren, S., 1986, **Pengantar Teknologi Minyak dan Lemak Pangan**, UI Press, Jakarta
- Khopkar, S. M., 2002, **Konsep Dasar Kimia Analitik**, UI Press, Jakarta
- Komara, A., 1991, **Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit**

- (*Capsicum frutescens*), Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, IPB, Bogor
- Ly, T. N., R.Yamauchi, M. Shimoyamada, and K. Kato, 2001, **Volatile Components of the Essential Oils in Galanga (*Alpinia officinarum* Hance) from Vietnam**, http://www.jstage.jst.go.jp/article/fstr/7/4/303/_pdf, diakses tanggal 23 November 2008
- _____, 2002, **Isolation and Structural Elucidation of Some Glycosides from the Rhizomes of Smaller Galanga (*Alpinia officinarum* Hance)**, Abstract, Journal of Agricultural Food Chemistry, <http://pubs.acs.org/cgi-bin/abstract.cgi/jafcau/2003/51/i17/abs/jf034295m.html>, diakses tanggal 23 November 2008
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlop, and D. P. Clark, 2009, **Biology of Microorganism**, 20th edition, Pearson Education Inc., San Francisco
- Mahendra, T., 2004, **Pengaruh Konsentrasi Pelarut Etanol dan Derajat Kehalusan Bahan pada Ekstraksi Oleoresin Lengkuas Putih (*Alpinia galanga*)**, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang
- Mashaw, 2008, **Pengawet Alami Pengganti Formalin dan Resiko Keamanannya**, <http://banabakery.wordpress.com/2008/12/27/pengawet-alami-pengganti-formalin-dan-risiko-keamanan>, diakses tanggal 12 Maret 2009
- Messaoud and Miloudi, 2007, **Antibacterial Activity of Certain Phenolic Resins: Effect of -OH and -NH- Groups on *Escherichia coli* Bacteria**, <http://www.hawaii.edu/medicine/pediatrics/pedtext/s06c04.html>, diakses tanggal 23 November 2008
- Moestofa, A., 1981, **Isolasi Oloresin dari Lada Hitam**, Proceeding Minyak Atsiri II, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Industri Hasil Pertanian, Bogor
- Mohan, J., 2003, **Organic Analytical Chemistry Theory and Practice**, Alpha Science International Ltd., Pangbourne, England
- Morikawa, T., S. Ando, H. Matsuda, S. Kataoka, O. Muraoka, and M. Yoshikawa, **Inhibitors of Nitric Oxide Production from the Rhizomes of *Alpinia galanga*: Structures of New 8–9 Linked Neolignans and Sesqueneolignan**,

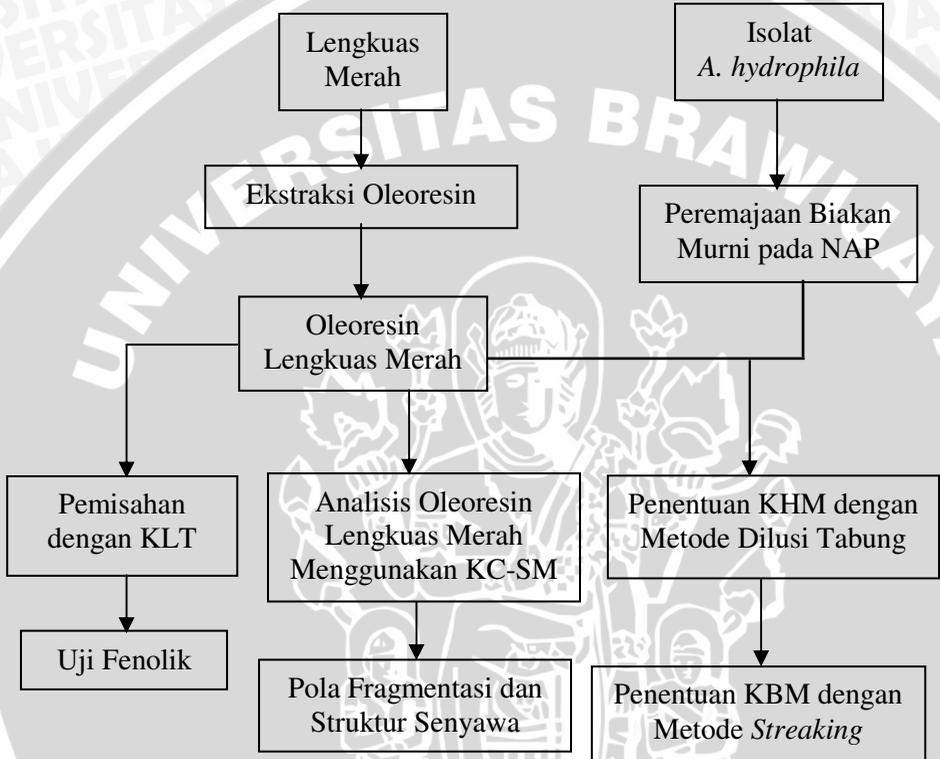
- <http://www.pmlmicro.com/assets/TDS/545.pdf>, diakses tanggal 12 Desember 2008
- Namdeo, A. G., 2007, **Plant Cell Elicitation for Production of Secondary Metabolites : A Review**, <http://www.phcogrev.com/issue1/8.pdf>, diakses tanggal 11 Maret 2009
- Pelczar, R. D. Reid, E. C. S. Chan, 1977, **Microbiology**, 3rd edition, G. Williamson-WJA, Payne
- Prajitno, A., 2008, **Penyakit Ikan-Udang : Bakteri**, UM Press, Malang
- Prescott, L. M., J. P. Harley, D. A. Klein, 2005, **Microbiology**, 6th edition, McGraw Hill Companies, Singapore
- Purseglove, J. W., E. G. Brown , C. L. Green, and S. R. T. Robins, 1981, **Spices**, Vol. II, Longman Inc., New York
- Qomariyah, Nuril., S. B. Barit, dan F. T. Pratiwi, 2008, **Pemanfaatan Serbuk Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K Schum) sebagai Bahan Pengawet Alami pada Ikan Kembung (*Rastregiller brachysoma*)**. Laporan Program Kreativitas Mahasiswa. Universitas Brawijaya, Malang
- Ravindran, P. N. and I. Balachandran, 2004, **Under Utilized Medicinal Spices**, http://www.indianspices.com/magazine/archive/dec_eng.pdf, diakses tanggal 7 Desember 2008
- Ria, E. B., 1989, **Pengaruh Jumlah Pelarut, Lama Ekstraksi, dan Ukuran Bahan Terhadap Rendemen dan Mutu Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb)**, Skripsi, IPB, Bogor
- Sarwono, R., Roy H., Trisnamurti, dan Fuadi, 1987, **Ekstraksi Oleoresin Lada Hitam**, Abstrak, Jurnal (Pusat Penelitian dan Pengembangan Tanaman Industri), Departemen Pertanian, Bogor
- Sastrohamidjojo, H., 1991, **Spektroskopi**, Edisi kedua, Penerbit Liberty, Yogyakarta
- Sinaga, E., 2000, ***Alpinia galanga* (L.) Wild**, http://www.warintek.apjii.or.id/artikel/ttg_tanaman_obat/una_s/lengkuas.pdf, diakses tanggal 16 September 2007
- Somaatmadja, D., 1981, **Prospek Pengembangan Industri Oleoresin di Indonesia**, Makalah di dalam Hasil Perumusan dan Kumpulan Kertas Kerja Pekan Pengembangan Ekspor Rempah-rempah Olahan di Tanjung Karang, Lampung

- Suryandari, S., 1981, **Pengambilan Oleoresin Jahe dengan Cara Ekstraksi Pelarut**, Buletin IHP (2), BPIHP, Bogor
- Susetyo, R., 2003, **Ekstraksi Oleoresin Temulawak (Kajian Jumlah Etanol dan Lama Ekstraksi)**, Skripsi, Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang
- Tenover, F. C., 2006, **Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria**, http://www.biomed.emory.edu/PROGRAM_SITES/PBEE/pdf/tenover1.pdf, diakses tanggal 23 November 2008
- Tjitrosoepomo, G., 1994, **Taksonomi Tumbuhan Obat-obatan**, Gajah Mada University Press, Yogyakarta
- Tortora, G.J., B. R. Funke, and C. L. Case, 2001. **Microbiology : An Introduction**, Addison Wesley Longman, Inc., USA
- Townshend, A., 1995, **Encyclopedia of Analytical Science**, Vol. 2, Academic Press Inc., London
- Voight, R., 1995, **Buku Pelajaran Teknologi Farmasi**. Penerjemah Soendani, N. S., Gajahmada University Press, Yogyakarta
- Vogel, A. L., 1989, **Textbook of Practical Organic Chemistry**, 5th edition, Longman Group Ltd., England
- Wagaw, S., J. Tedrow, T. Grieme, L. Bavda, W. Wang, S. Viswanath, D. Barnes, and M. McLaughlin, **HPLC Guide**, http://chemgroups.northwestern.edu/scheidt/PDFs/HPLC_guide.pdf, diakses tanggal 11 Maret 2009
- Wilson, C. O. and O. Gisvold, 1962, **Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, J. B. Lippincott Company, USA

LAMPIRAN

LAMPIRAN 1

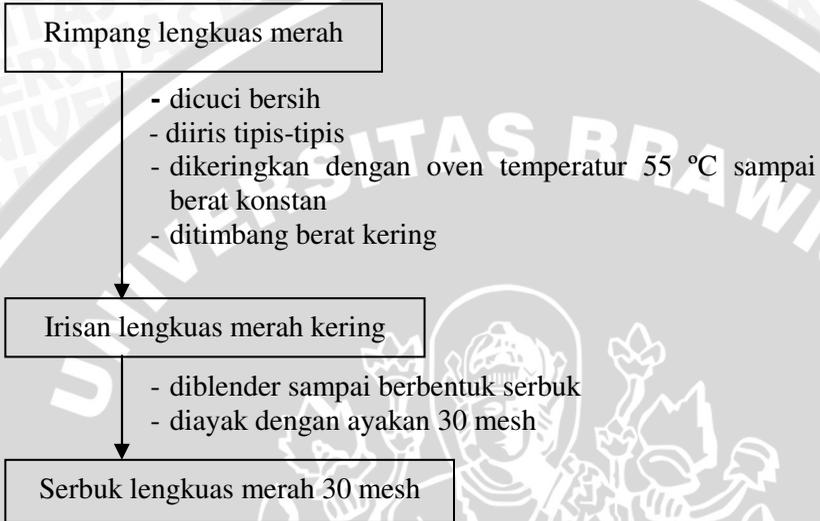
DIAGRAM ALIR TAHAPAN PENELITIAN



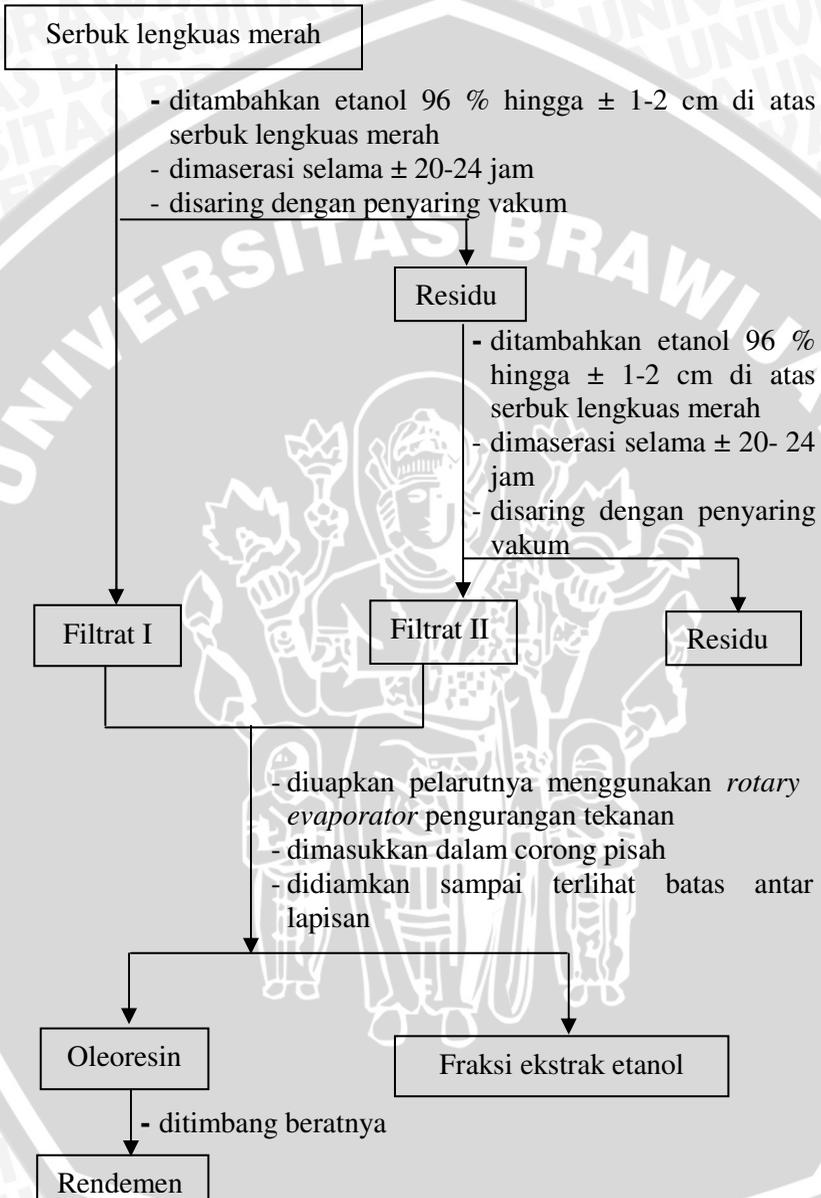
LAMPIRAN 2

SKEMA KERJA

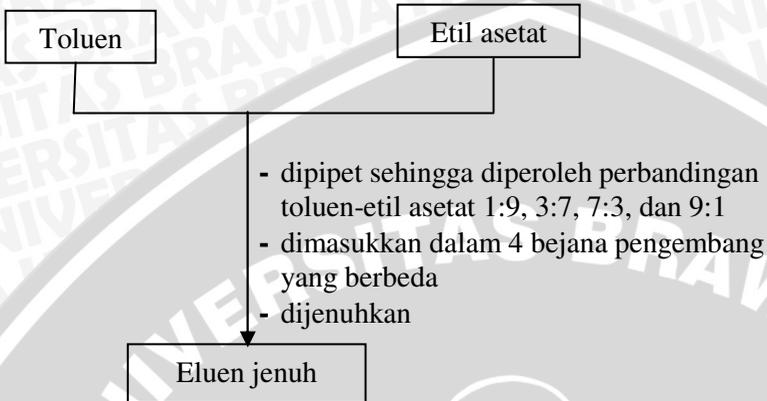
L.2.1 Preparasi Bahan Penelitian



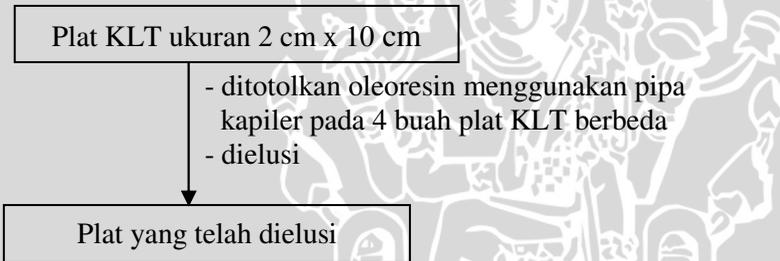
L.2.2 Ekstraksi Oleoresin



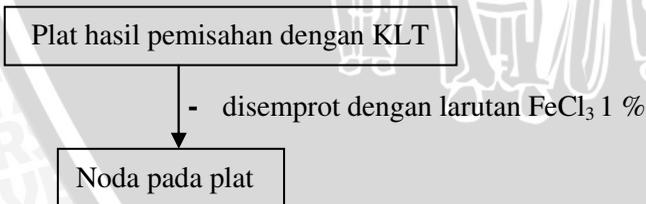
L.2.3 Pembuatan Larutan Pengembang (Eluen)



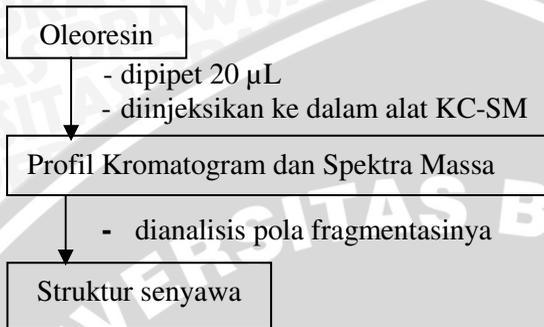
L.2.4 Pemisahan dengan KLT



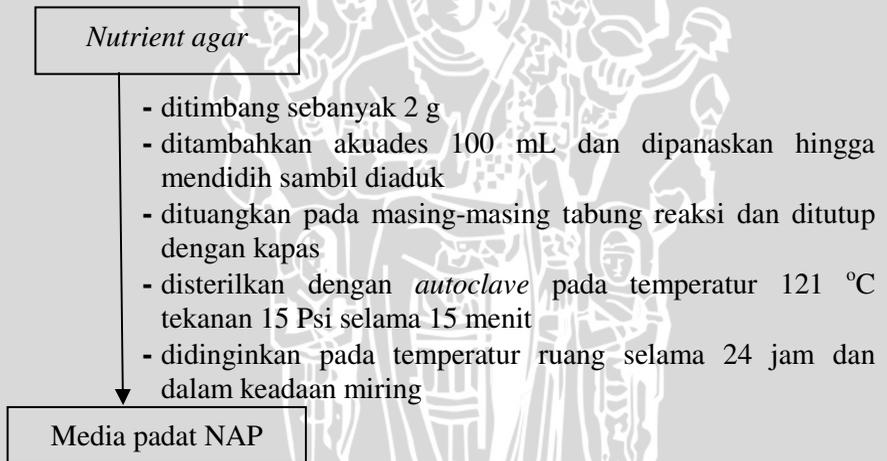
L.2.5 Uji Fenolik



L.2.6 Analisis Oleoresin Lengkuas Merah Menggunakan Kromatografi Cair-Spektroskopi Massa



L.2.7 Pembuatan *Nutrient Agar Plate* Untuk Peremajaan Biakan Murni *A. hydrophila*



L.2.8 Pembuatan Muller Hinton Broth (Media Produksi)

Daging sapi

- dicuci bersih
- dipotong kecil-kecil
- dimasak dalam 1000 mL akuades
- dididihkan 25 menit

Kaldu daging sapi

- disaring dengan kapas atau kain kasa
- dilarutkan pepton hingga rata
- diatur pada pH 7
- dimasukkan dalam tabung reaksi atau erlenmeyer
- disumbat dengan kapas
- disterilisasi dengan *autoclave* pada temperatur 121 °C selama 15 menit

Muller Hinton Broth

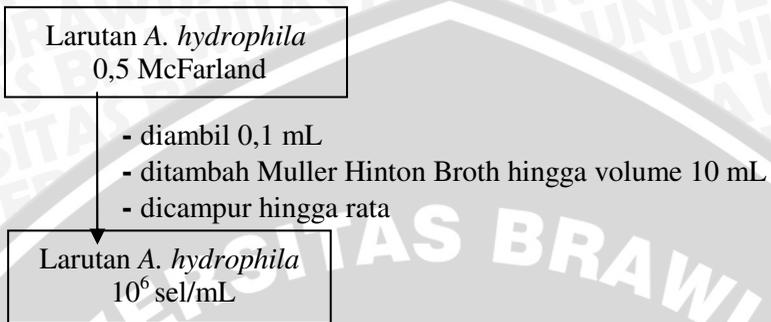
L.2.9 Peremajaan biakan murni *A. hydrophila*

Isolat Bakteri

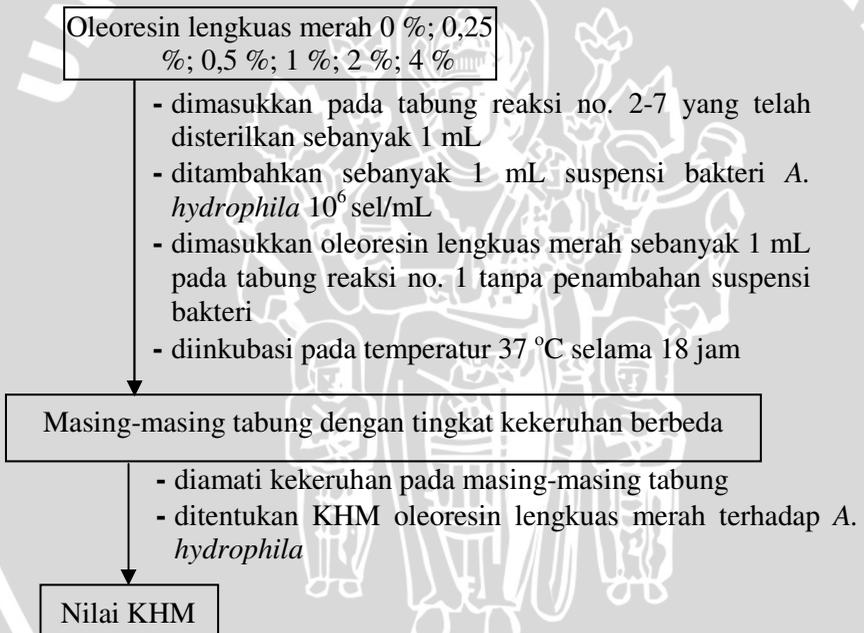
- digoreskan secara aseptis dengan jarum *ose* pada media padat NAP agar miring
- ditutup tabung media agar dengan kapas berlemak
- diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 37 °C

Biakan Murni

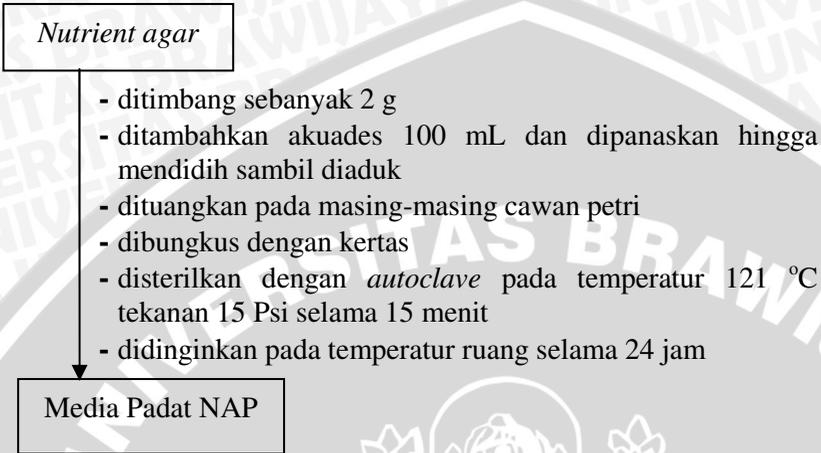
L.2.10 Pembuatan larutan bakteri *A. hydrophila* 10⁶ sel/mL



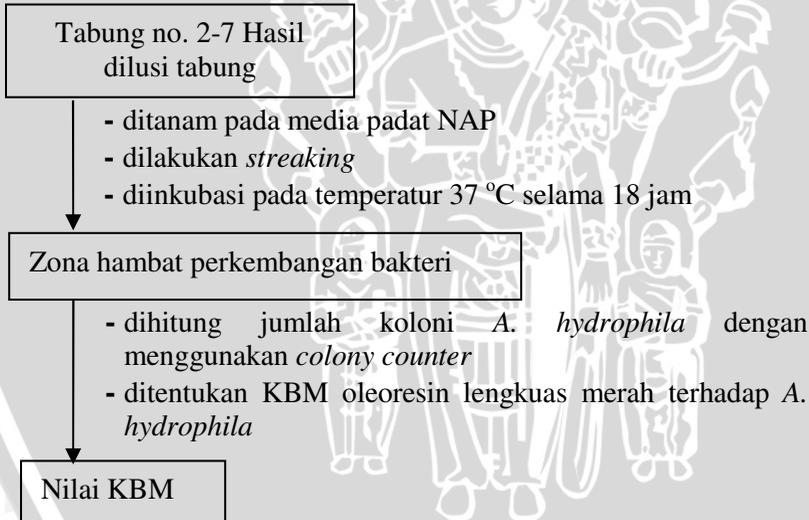
L.2.11 Penentuan KHM dengan Uji Dilusi Tabung



L.2.12 Pembuatan *Nutrient Agar Plate* Untuk Penentuan KBM



L.2.13 Penentuan KBM dengan Metode *Streaking*



L.2.14 Perhitungan Koloni Bakteri menggunakan *Colony Counter*

Media dalam cawan petri

- dihidupkan *colony counter*
- ditempatkan pada *counting plate* media yang akan dihitung jumlah koloninya
- dihitung setiap koloni yang tumbuh dengan cara menekan ujung detektor pada koloni yang tampak
- dicatat jumlah koloni yang terlihat pada *display*

Jumlah bakteri (CFU/plate)



LAMPIRAN 3

PERHITUNGAN

L.3.1 Perhitungan Kadar Air dalam Lengkuas Merah Setelah Pengeringan 24 Jam

No	Penimbangan	Massa (g)
1	Lengkuas merah basah yang telah diiris	6421,53
2	Lengkuas merah yang telah dikeringkan 24 jam	1190,05

Perhitungan kadar air dalam lengkuas merah

$$\begin{aligned}\text{Kadar air} &= \frac{\text{Massa basah}-\text{massa setelah pengeringan}}{\text{Massa basah}} \times 100\% \\ &= \frac{6421,53 \text{ g} - 1190,05 \text{ g}}{6421,53 \text{ g}} \times 100 \% \\ &= 81,46 \%\end{aligned}$$

L.3.2 Perhitungan Rendemen Oleoresin Lengkuas Merah

$$\begin{aligned}\text{Rendemen} &= \frac{\text{Massa Oleoresin}}{\text{Massa serbuk yang dimaserasi}} \times 100\% \\ &= \frac{51,94 \text{ g}}{1185,3 \text{ g}} \times 100\% \\ &= 4,38 \%\end{aligned}$$

L.3.3 Perhitungan Nilai *Retardation Factor* (R_f)

L.3.3.1 Nilai R_f untuk Senyawa yang Dielusi dengan Campuran Toluena-Etil Asetat 3:7

$$\begin{aligned}R_f &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}} \\ &= \frac{4,3 \text{ cm}}{8,6 \text{ cm}} \\ &= 0,5\end{aligned}$$

L.3.3.2 Nilai R_f untuk Senyawa yang Dielusi dengan Campuran Toluena-Etil Asetat 9:1

$$\begin{aligned}R_f &= \frac{\text{Jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{Jarak yang ditempuh pelarut}} \\ &= \frac{3,7 \text{ cm}}{8 \text{ cm}} \\ &= 0,46\end{aligned}$$

L.3.4 Pembuatan Larutan Bakteri *A. hydrophila* 10⁶ sel/mL

Pada metode uji kepekaan bakteri ini, digunakan konsentrasi standar kuman sebesar 0,5 McFarland (10⁸ sel/mL). Untuk mendapatkan konsentrasi kuman sebesar 10⁶ sel/mL, maka 0,1 mL dari 0,5 McFarland diencerkan dengan dasar perhitungan sebagai berikut:

Keterangan:

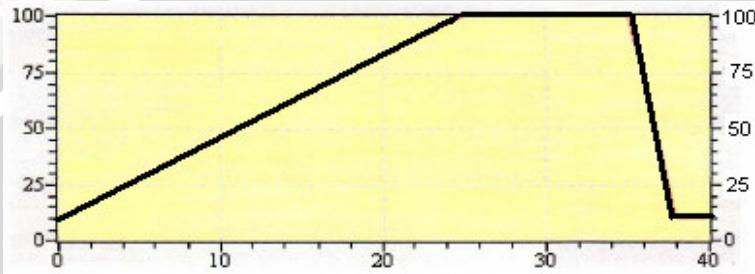
$$\begin{aligned}V_1 N_1 &= V_2 N_2 \\ V_1 &= \text{volume dari 0,5 McFarland} \\ V_2 &= \frac{V_1 N_1}{N_2} \quad N_1 = 10^8 \text{ sel/mL (0,5 McFarland)} \\ & \quad N_2 = 10^6 \text{ sel/mL} \\ V_2 &= \frac{0,1 \times 10^8}{10^6} \\ V_2 &= 10 \text{ mL}\end{aligned}$$

LAMPIRAN 4

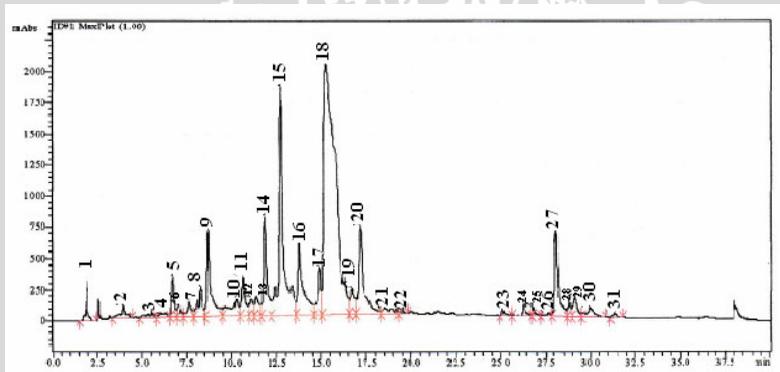
HASIL ANALISIS OLEORESIN LENGKUAS MERAH MENGUNAKAN KC-SM

L.4.1 Gradien Konsentrasi Fase Gerak

Gradien = [% konsentrasi asetonitril]



L.4.2 Kromatogram KC

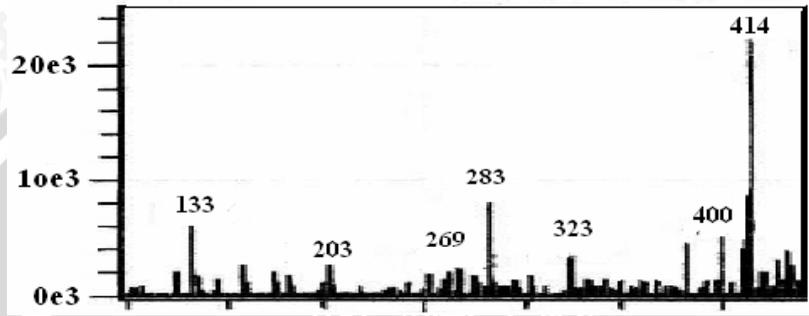


L.4.3 Data Hasil Analisis Senyawa Menggunakan KC dengan % Area Puncak Di Atas 4 %

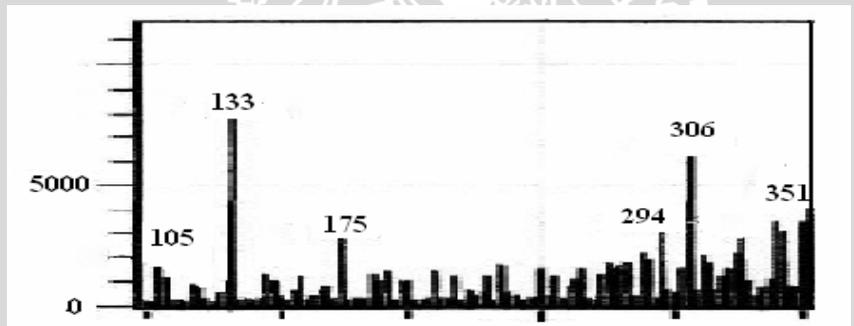
No Puncak	Waktu Retensi (menit)	% Area
9	8,697	4,29453
14	11,818	4,40266
15	12,753	13,79159
16	13,771	5,37689
18	15,255	39,00088
20	17,159	6,26217

L.4.4 Hasil Pindaian (Scan) Senyawa dengan % Area Puncak Di atas 4 %

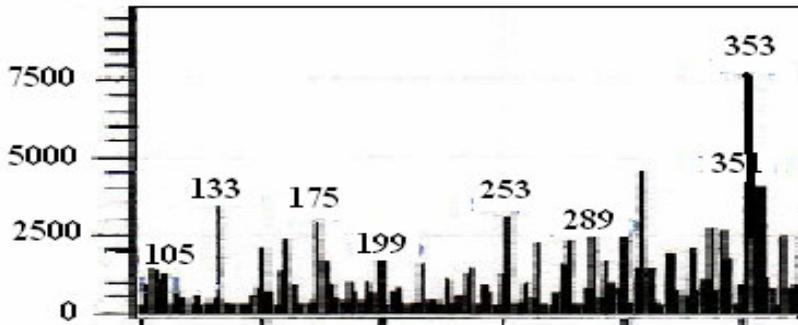
L.4.4.1 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 8,697 menit (Puncak nomor 9)



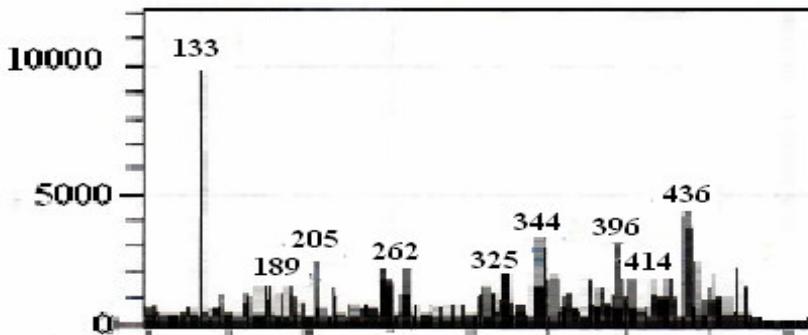
L.4.4.2 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 11,818 menit (Puncak nomor 14)



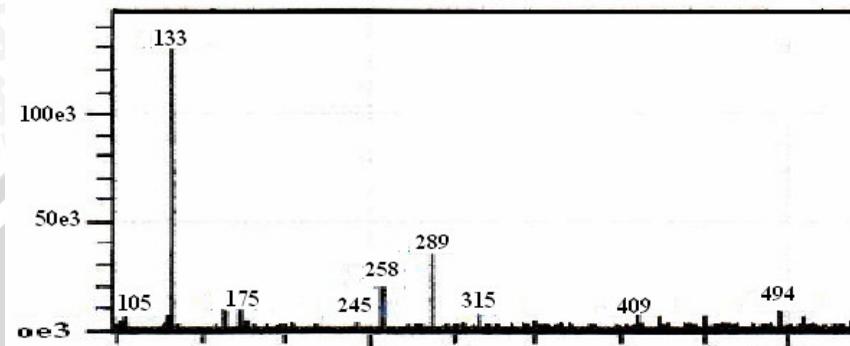
L.4.4.3 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 12,753 menit (Puncak nomor 15)



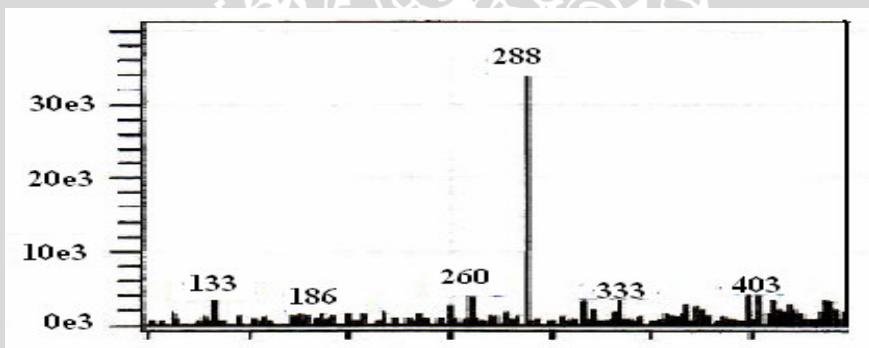
L.4.4.4 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 13,771 menit (Puncak nomor 16)



L.4.4.5 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 15,255 menit (Puncak nomor 18)



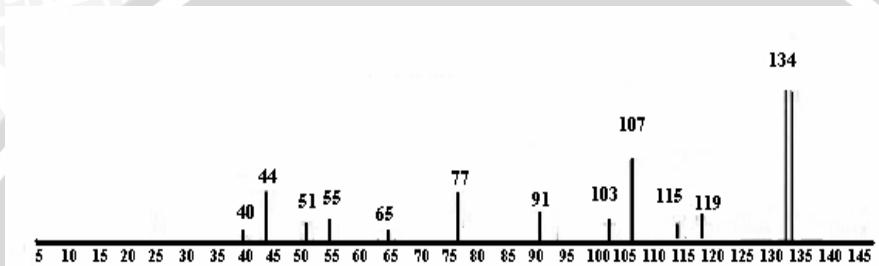
L.4.4.6 Puncak Senyawa Kromatogram KC dengan Waktu Retensi 17,159 menit (Puncak nomor 20)



LAMPIRAN 5

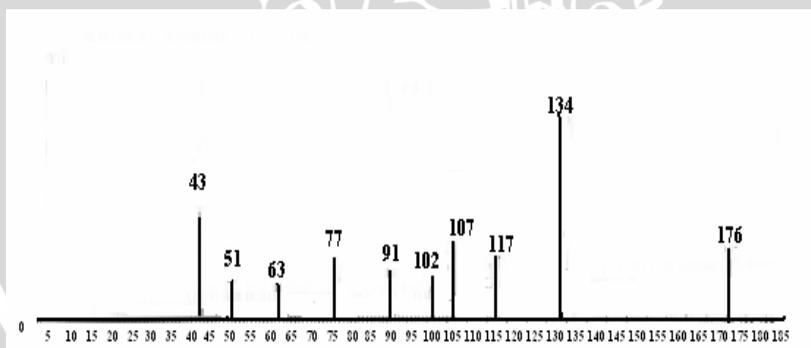
PUSTAKA SPEKTRUM MASSA KOMPONEN DALAM LENGKUAS

L.5.1 Senyawa 4-alilfenol (kavikol)



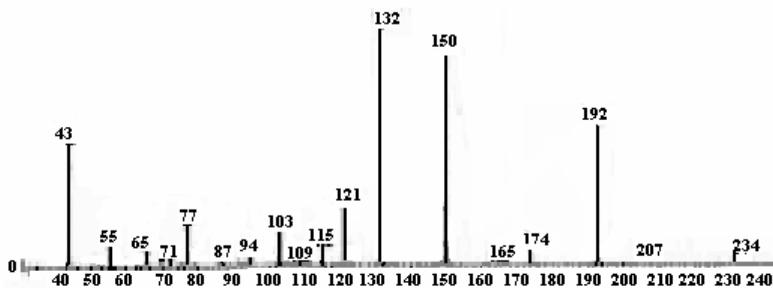
Berat molekul : 134
Rumus molekul : $C_9H_{10}O$
Nama komponen : 4-Alilfenol
Pustaka : WILLEY7.LIB

L.5.2 Senyawa kavikol asetat

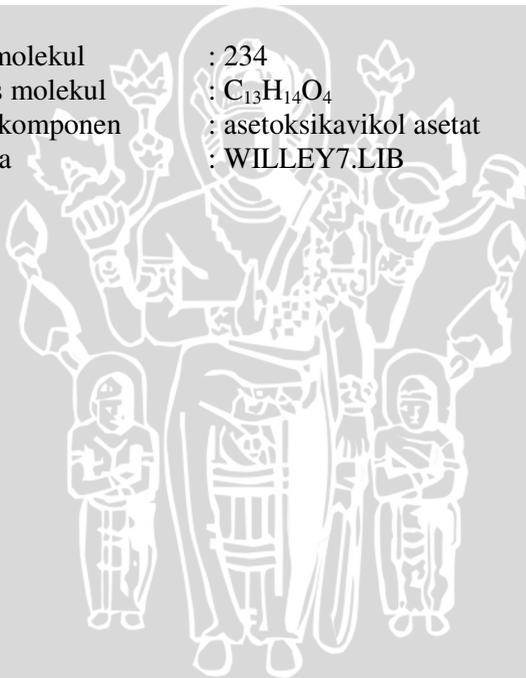


Berat molekul : 178
Rumus molekul : $C_{11}H_{14}O_2$
Nama komponen : kavikol asetat
Pustaka : WILLEY7.LIB

L.5.3 Senyawa asetoksikavikol asetat



Berat molekul : 234
Rumus molekul : $C_{13}H_{14}O_4$
Nama komponen : asetoksikavikol asetat
Pustaka : WILLEY7.LIB



LAMPIRAN 6

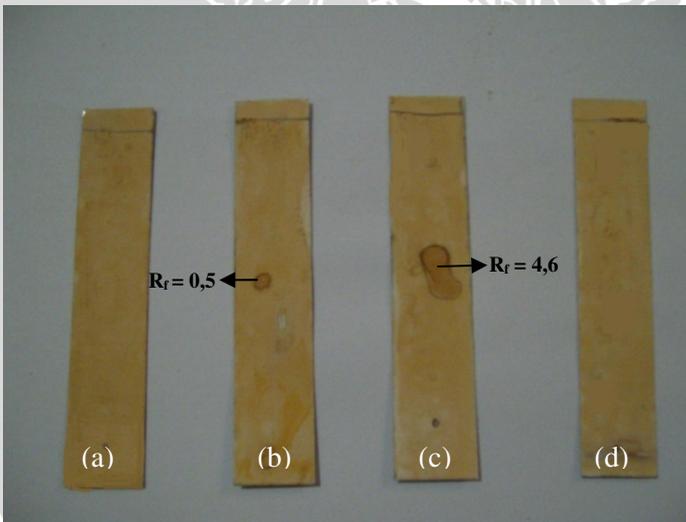
FOTO-FOTO

L.6.1 Oleoresin Lengkuas Merah



→ Oleoresin lengkuas merah

L.6.2 Plat KLT pada Uji Fenolik

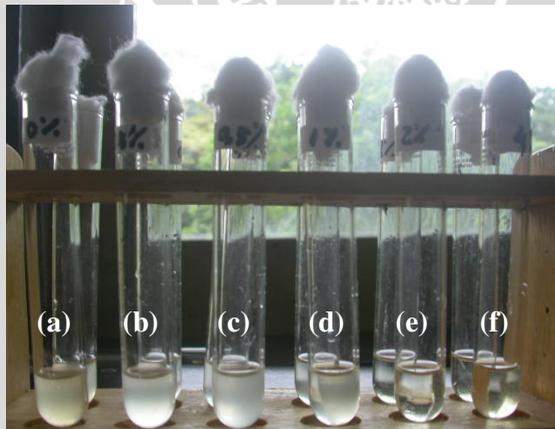


Keterangan: Perbandingan toluen:etil asetat : (a) 1:9, (b) 3:7, (c) 9:1, (d) 7:3

L.6.3 Alat KC-SM Merk Shimadzu LC 10 AD-QP 8000

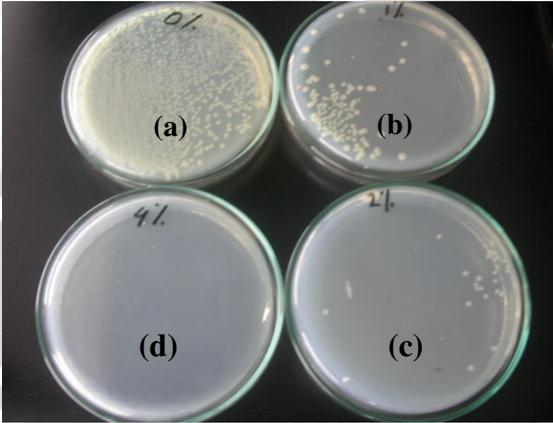


L.6.4 Larutan Oleoresin dengan Berbagai Konsentrasi setelah Ditambahkan Suspensi *A. hydrophila*



Keterangan : Konsentrasi (a) 0 %, (b) 0,25 %, (c) 0,5 %, (d) 1 %, (e) 2 %, dan (f) 4 %

L.6.5 Zona hambat *A. hydrophila* pada Berbagai Variasi Konsentrasi Oleoresin



Keterangan : Konsentrasi : (a) 0 %, (b) 1 %, (c) 2 %, dan (d) 4 %