

**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK *Sargassum cristaefolium*  
DENGAN BERBAGAI PELARUT TERHADAP *Escherichia coli*  
DAN *Vibrio parahaemolyticus***

**SKRIPSI**

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI INDUSTRI HASIL PERIKANAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

**DISUSUN OLEH :  
WAKHIDATUR ROHMAH  
NIM. 0610830088**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
MALANG  
2010**

## RINGKASAN

**WAKHIDATUR ROHMAH.** Daya Antibakteri Ekstrak *Sargassum cristaefolium* Dengan Berbagai Pelarut Terhadap *Escherechia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus* (di bawah bimbingan Ir. Bambang Budi Sasmito, MS. dan Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS.)

---

Algae coklat adalah salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh algae coklat telah banyak diketahui manfaatnya antara lain adalah sebagai antibakteri, antitumor, antivirus, antioksidan dan menghambat aktivitas enzim. *Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu spesies algae coklat yang menghasilkan senyawa bioaktif bersifat antibakteri. Untuk mendapatkan zat antibakteri diperlukan metode ekstraksi yang tepat. Metode ekstraksi yang tepat memerlukan adanya pelarut yang sesuai tingkat kepolarannya sehingga diperoleh senyawa bioaktif sesuai dengan kualitas dan kuantitas yang diinginkan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui jenis pelarut yang paling baik digunakan untuk mengekstrak komponen antibakteri pada algae coklat *Sargassum cristaefolium*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta pada bulan April sampai Juli 2010.

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yang dilanjutkan dengan identifikasi komponen antibakteri dengan metode GC-MS. Metode eksperimen menggunakan metode RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 3 kali ulangan. Rumput laut diekstrak dengan 3 macam pelarut yakni metanol (polar), acetone (semi polar), dan heksan (non polar) lalu dipisahkan dengan *vacuum rotary evaporator*. Ekstrak masing-masing pelarut diujikan secara duplo terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus* kepadatan 0,1 CFU/ml. Parameter uji yang digunakan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri. Sebagai pembanding (kontrol) dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing pelarut untuk mengetahui apakah zona bening yang dihasilkan berasal dari daya antibakteri ekstrak itu sendiri atau berasal dari pelarutnya yang notabene sudah memiliki daya antibakteri. Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1% dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNJ pada taraf 5 % untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini jenis pelarut yang digunakan. Identifikasi lanjutan dilakukan dengan menggunakan uji Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS) terhadap ekstrak algae coklat yang memiliki daya antibakteri terbaik untuk mengidentifikasi komponen antibakteri yang terkandung di dalamnya berdasarkan kesamaan *peak* hasil GC-MS dengan *peak* standar pada luas dan retensi waktu tertentu.

Hasil penelitian menunjukkan dari ketiga pelarut yakni metanol, aceton, dan heksan, heksan merupakan pelarut yang paling baik digunakan untuk ekstraksi senyawa antibakteri *Sargassum cristaefolium*. Ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut heksan lebih efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* daripada bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Rata-rata diameter zona bening ekstrak heksan terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 8,18 mm sedangkan rata-rata diameter zona bening terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* adalah 7,73 mm.

Berdasarkan kromatogram yang dapat terbaca melalui uji GC-MS, diketahui bahwa ekstrak *Sargassum cristaefolium* yang dimaserasi dengan heksan mengandung 29 jenis senyawa bioaktif dengan 18 senyawa dianggap dominan. Senyawa-senyawa tersebut antara lain: *cyclotetracosane*, *heneicosane*, *tetracosane*, *octadecane*, *nonadecane*, *eicosane*, *docosane*, *tetratetracontane*, *heptacosane*, *nonacosane*, *1-octadecene*, *1-pentadecene*, *1-heptadecene*, *1-hexadecene*, *1-nonadecene*, *1-docosene*, *3-eicosene*, serta *nonadecyl alcohol*. Secara keseluruhan, 29 senyawa bioaktif diklasifikasikan dalam kelompok alkana, alkena, alkanol dan asam karboksilat berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap dan jenis gugus fungsi. Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri berasal dari golongan alkena, alkanol dan asam karboksilat.



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah dan puji syukur yang tidak terhingga penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat, hidayah dan inayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan kegiatan penelitian dan penulisan laporan skripsi dengan judul "**Daya Antibakteri Ekstrak *Sargassum cristaefolium* Dengan Berbagai Pelarut Terhadap *Escherechia coli* Dan *Vibrio parahaemolyticus***". Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Skripsi ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang terdapat pada algae coklat *Sargassum cristaefolium* yang hidup di perairan Kabupaten Sampang Pulau Madura serta jenis pelarut yang sesuai digunakan untuk mengekstraksi senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya. Pokok bahasan dalam penelitian ini meliputi: pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan senyawa bioaktif ekstrak terhadap diameter zona penghambatan serta analisa senyawa aktif antibakteri yang terdapat dalam ekstrak dengan zona hambat terbaik menggunakan metode *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS).

Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, penulis sangat mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun guna perbaikan skripsi ini. Akhirnya semoga apa yang ada di dalam skripsi ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Malang, Oktober 2010

Penulis

## DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN .....	i
KATA PENGANTAR .....	iii
DAFTAR ISI .....	iv
DAFTAR GAMBAR .....	vi
DAFTAR TABEL .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Hipotesis .....	5
1.5 Kegunaan Penelitian .....	5
1.6 Tempat dan Waktu .....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Algae Coklat ( <i>Phaeophyta</i> ) .....	6
2.2 <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	7
2.3 Pelarut .....	10
2.3.1 Metanol .....	11
2.3.2 Aceton .....	13
2.3.3 Heksan .....	16
2.4 Ekstraksi .....	17
2.5 Antibakteri .....	18
2.5.1 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram) .....	19
2.5.2 Bakteri Uji Gram Negatif .....	20
2.5.2.1 <i>Echerichia coli</i> .....	21
2.5.2.2 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	23
2.6 Uji GC-MS .....	25
2.6.1 Sistem Peralatan GC .....	25

2.6.1.1 Fase Gerak pada GC.....	27
2.6.1.2 Ruang Suntik Sampel pada GC.....	27
2.6.1.3 Kolom pada GC.....	28
2.6.1.4 Detektor pada KG.....	28
2.6.2 Spektrometri Massa (SM).....	29
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....	31
3.1 Materi Penelitian.....	31
3.1.1 Bahan Penelitian.....	31
3.1.1.1 Algae Coklat.....	31
3.1.1.2 Bahan Pelarut Maserasi.....	32
3.1.1.3 Bahan Uji Cakram.....	32
3.1.2 Alat Penelitian.....	32
3.2 Metode Penelitian.....	33
3.2.1 Metode Eksperimen.....	32
3.2.2 Variabel Penelitian.....	34
3.2.3 Rancangan Penelitian.....	34
3.2.4 Parameter Uji.....	35
3.2.5 Analisis Data.....	35
3.3 Prosedur Penelitian.....	35
3.3.1 Pembuatan Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	35
3.3.2 Uji Cakram.....	37
3.3.3 Uji <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS).....	39
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	40
4.1 Hasil Penelitian.....	40
4.1.1 Ekstraksi Rumput Laut Coklat <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	40
4.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri.....	40
4.1.3 Analisis GC-MS.....	44
4.2 Pembahasan.....	43
4.2.1 Pengaruh Pelarut Terhadap Kkandungan Senyawa Antibakteri Dalam <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	48
4.2.2 Intensitas Kepekaan Bakteri.....	49

4.2.3 Senyawa Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri Dan Mekanisme  
Penghambatan Pertumbuhan Bakteri..... 52

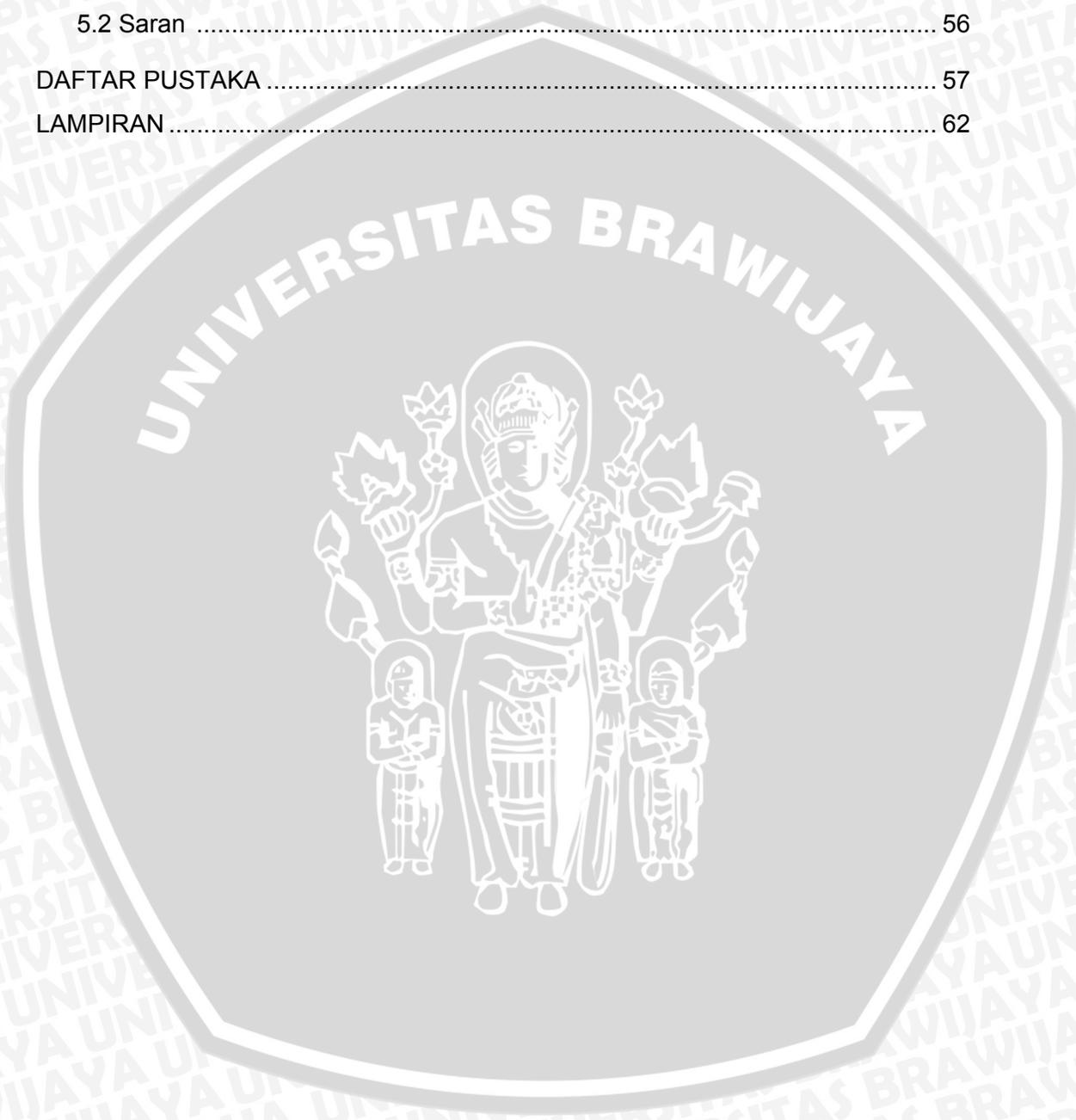
5. KESIMPULAN DAN SARAN ..... 56

5.1 Kesimpulan ..... 56

5.2 Saran ..... 56

DAFTAR PUSTAKA ..... 57

LAMPIRAN ..... 62



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	7
2. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Metanol .....	12
3. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Aceton .....	14
4. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Heksan .....	16
5. Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	22
6. Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	24
7. Sistem Peralatan Kromatografi Gas .....	25
8. Sampel Penelitian <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	31
9. <i>Flowchart</i> Pembuatan Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	36
10. Hasil Ekstraksi dari <i>Sargassum cristaefolium</i> dengan Pelarut Aceton Metanol dan Heksana .....	40
11. Perbandingan Zona Hambat Ekstrak Antibakteri <i>Sargassum cristaefolium</i> yang Dimaserasi dengan Pelarut Heksana, Aceton dan Metanol Terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	42
12. Perbandingan Zona Hambat Ekstrak Antibakteri <i>Sargassum cristaefolium</i> yang Dimaserasi dengan Pelarut Heksana, Aceton dan Metanol Terhadap <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	43
13. Hasil GC-MS Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> dengan Pelarut Heksan .....	44
14. Persentase % Area Alkana, Alkena, Alkanol dan Asam Karboksilat Dalam Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	45
15. Struktur Kimia Senyawa Alkanol Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	45
16. Struktur Kimia Senyawa Alkana Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	46
17. Struktur Kimia Senyawa Alkena Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> .....	47
18. Struktur Kimia Asam Ftalat .....	47

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sifat-Sifat Pelarut Umum .....	10
2. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut .....	11
3. Sifat-Sifat Pelarut Metanol .....	13
4. Sifat Fisik Pelarut Aceton .....	15
5. Sifat Fisik Pelarut Heksan .....	17
6. Kondisi Pengoperasian GC-MS Untuk Analisis Sampel .....	26
7. Rancangan Penelitian (RAL) .....	34
8. Notasi BNJ 5% Perbandingan Diameter Zona Hambat Pelarut dan Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> Terhadap <i>Escherichia coli</i> .....	41
9. Notasi BNJ 5% Perbandingan Diameter Zona Hambat Pelarut dan Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> Terhadap <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	41
10. Senyawa Antibakteri Hasil GC-MS Ekstrak <i>Sargassum cristaefolium</i> dengan Pelarut Heksan .....	44
11. Diameter Zona Hambatan Berbagai Antibiotika dan Khemoteraptika .....	50

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan Media TCBSA.....	62
2. Prosedur Pembuatan Media TSA.....	63
3. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	64
4. Analisis Sidik Ragam (ANOVA) Uji Cakram <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	68
5. Hasil GC-MS.....	72
6. Penggolongan Senyawa Alkana, Alkena, Alkanol, dan Asam Karboksilat.....	92
7. Dokumentasi Penelitian.....	95



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Algae merupakan salah satu sumberdaya alam Indonesia yang sangat potensial. Algae merupakan tumbuhan tingkat rendah dan dibagi dalam empat kelas yaitu kelas *Rhodophyta* atau ganggang merah, kelas *Phaeophyta* atau ganggang coklat, *Chlorophyta* atau ganggang hijau, dan *Cyanophyta* atau ganggang hijau biru (Mulyo, 2010).

Potensi *Sargassum* yang berasal dari kelas *Phaeophyta* di Indonesia pada tahun 1999 adalah 52 juta ton, pada tahun 2000 adalah 76,53 juta ton, sedangkan pada tahun 2004 adalah 139,74 juta ton (Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia, 2005). Potensi *Sargassum* di Kepulauan Madura pada tahun 2005 menurut data DKP Sumenep adalah 7,1 juta ton per tahun (DKP Sumenep, 2007).

*Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu spesies algae yang berasal dari marga *Sargassum*. *Sargassum* yang tergolong ke dalam kelas algae coklat mengandung berbagai *trace element* antara lain kalsium, vitamin, mineral (kalsium, kalium, magnesium, natrium, Fe, Iod, Cu, Zn, S, P dan N), alkohol, dan polisakarida. Kandungan polisakarida berupa alginat, laminaran dan fukoidan. Kandungan lainnya yaitu mannitol, pigmen beta karoten, xanthin dan picoxanthin yang berwarna merah dan dipakai sebagai zat warna untuk lipstik. Kandungan metabolit sekunder dalam algae coklat juga sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkaloid, fenol, dan vitamin. Ternyata algae coklat sangat kaya akan kandungan steroid, alkaloid dan fenol. Beberapa algae coklat telah diteliti aktivitasnya sebagai antibakteri,

kemungkinan yang berkhasiat disini adalah senyawa fenol yang dikandungnya (Rahmat, 1999).

Ma Jing Wend dan Tan Wei-ci (1984) dalam Yunizal (2004) melaporkan bahwa *Sargassum sp.* memiliki aktivitas antimikroba terhadap empat jenis bakteri yaitu, *Bacillus substillis*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* dan *Vibrio sp.* Matanjun, *et al.* (2008) melaporkan dari hasil penelitian di Kalimantan Utara bahwa kandungan fenol dari 8 spesies rumput laut yang diuji menunjukkan bahwa *Sargassum* memiliki kandungan fenol lebih besar (45,16 mg PGE/g dry ekstrak).

*Sargassum sp.* menghasilkan senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang tidak mengikat halogen dan mampu bertindak sebagai antimikrobia. Komponen bioaktif yang dihasilkan berupa senyawa kompleks diterpenoid dan senyawa campuran terpenoid-aromatik yang mempunyai aktivitas biologi sebagai antibiotik (Rahman dan Choudhary, 2001). Penelitian lain menyebutkan bahwa *Sargassum* memproduksi beberapa jenis senyawa sekunder, seperti florotanin (Keusge, *et al.*, 1997), steroid dan sterol (Faulkner, 1984). Florotanin mempunyai sifat antibakteri (Hay dan Fenical, 1988). Florotanin juga bersifat polar, sehingga larut dalam air dan bersifat tidak stabil. Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, diduga senyawa aktif dalam ekstrak air dari *Sargassum* adalah florotanin (Glombitza dan Keusgen, 1995). *Sargassum* yang telah dikeringkan tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Senyawa bioaktif umumnya diekstraksi dari sampel rumput laut yang masih segar (Ballantine, *et al.*, 1987).

Proses ekstraksi merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok. Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueus phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueus phase* dilakukan dengan pelarut air,

sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organik. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1978). Dalam tabel sifat-sifat umum pelarut, pelarut metanol tergolong ke dalam pelarut *polar protic*, etanol tergolong *polar aprotic* atau bersifat semi polar, sedangkan heksana tergolong sebagai pelarut nonpolar (Anonymous, 2007).

Suatu ekstrak tumbuhan dapat diekstraksi secara maksimal dengan suatu seri pelarut yang meningkat kepolarannya, yaitu heksana, etil asetat dan metanol, maka fraksi bobot ekstrak yang paling besar pada umumnya adalah metanol (Munifah, *et al.*, 2005). Hasil penelitian mengenai algae coklat telah banyak dilaporkan, yaitu: Wiyanto (2008), yang mengekstrak lima algae coklat dengan pelarut metanol, diklorometana dan heksana dan didapatkan hasil bahwa *D. dichofoma* var. *implexa* yang diekstrak dengan heksana mengandung komponen fenol yang paling tinggi dan memiliki daya antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*. Juneidi (2008) melaporkan tiga ekstrak rumput laut *S. polycystum*, *C. racemosa* dan *G. verrucosa* yang diekstrak dengan pelarut berbeda-beda yakni etanol, metanol, dan dietil eter, didapatkan hasil bahwa ekstrak *S. polycystum* yang diekstrak dengan etanol menunjukkan zona penghambatan yang paling besar terhadap bakteri *A. alginolyticus*.

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran (Pharmacopeial, 1993). Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada

tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2006). Bakteri indikator yang digunakan adalah *Vibrio parahaemolyticus* dan *Escherichia coli*. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri yang bersifat patogen pada ikan dan invertebrata laut. Bakteri *Escherichia coli* merupakan indikator adanya pencemaran di lingkungan dan bersifat patogen terhadap manusia (Izzati, 2007).

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk diversifikasi pemanfaatan biota laut yang jenisnya sangat beragam di perairan Indonesia melalui pengetahuan mengenai kandungan kimia dan metode ekstraksinya. Penggunaan pelarut yang tepat dapat mengoptimalkan proses ekstraksi dan senyawa antibakteri yang didapatkan. Di masa depan, senyawa antibakteri algae coklat diharapkan dapat menjadi bakterisida baku di bidang perikanan dan dapat diterapkan penggunaannya untuk bahan pangan. Oleh karena itu diperlukan kajian yang lebih mendalam mengenai jenis pelarut yang tepat digunakan pada proses ekstraksi antibakteri algae coklat.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan studi pustaka, algae coklat adalah salah satu biota laut yang menghasilkan senyawa antibakteri. Senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh algae coklat telah banyak diketahui manfaatnya. Manfaat tersebut antara lain adalah sebagai antibakteri, antitumor, antivirus, antioksidan dan menghambat aktivitas enzim (Satari, 1996). Untuk mendapatkan zat antibakteri diperlukan metode ekstraksi yang tepat. Metode ekstraksi yang tepat memerlukan adanya pelarut yang sesuai tingkat kepolarannya sehingga diperoleh senyawa antibakteri sesuai dengan kualitas dan kuantitas yang diinginkan. Pelarut yang digunakan antara lain metanol yang bersifat polar, aceton yang bersifat semi polar dan heksana yang bersifat non

polar. Dari uraian tersebut didapat permasalahan sebagai berikut: pelarut manakah yang paling baik digunakan untuk mengekstrak komponen antibakteri pada algae coklat *Sargassum cristaefolium* ?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian dilakukan adalah untuk mengetahui jenis pelarut yang paling baik digunakan untuk mengekstrak komponen antibakteri pada algae coklat *Sargassum cristaefolium*.

### 1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Jenis pelarut berpengaruh terhadap komponen antibakteri yang diekstraksi dari *Sargassum cristaefolium*.

### 1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

- Memberikan informasi kepada masyarakat, lembaga, dan institusi lain mengenai manfaat antibakteri yang ada pada algae coklat.
- Masyarakat dapat memanfaatkan algae coklat sebagai alternatif bakterisidal alami yang sangat potensial.

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Pengujian Mutu dan Keamanan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta pada bulan April - Juli 2010.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Algae Coklat (*Phaeophyta*)

Algae merupakan tumbuhan tingkat rendah dan dibagi dalam empat kelas yaitu kelas *Rhodophyta* atau ganggang merah, kelas *Phaeophyta* atau ganggang coklat, *Chlorophyta* atau ganggang hijau, dan *Cyanophyta* atau ganggang hijau biru. Algae coklat merupakan anggota *Phaeophyta*, algae khas daerah tropik, mengandung pigmen klorofil a dan c, alfa dan beta karoten, alginat dan lain-lain. Algae coklat dapat tumbuh subur di sebagian besar pantai perairan laut Indonesia, contohnya di pantai selatan Gunung Kidul D.I. Yogyakarta. *Sargassum*, terutama *Sargassum cristaefolium* mengandung protein 2,97%, lemak 0,26%, zat anti tumor, algin serta mineral (Ca, K, Na, Cu, Zn, Mg, I, S dan P). Algae ini juga mengandung zat anti bakteri dan anti virus (Mulyo, 2010).

Jenis algae coklat yang banyak digunakan untuk pembuatan obat adalah *Sargassum* dan *Turbinaria*. Pengolahan rumput laut jenis tersebut menghasilkan ekstrak berupa senyawa natrium alginat. Senyawa alginat inilah yang dimanfaatkan dalam pembuatan obat antibakteri, antitumor, penurunan darah tinggi dan mengatasi gangguan kelenjar. Rumput laut coklat mengandung besi, yodium, dan mineral-mineral lainnya (Junanto, 2009)

Potensi *Sargassum* yang berasal dari kelas *Phaeophyta* di Indonesia pada tahun 1999 adalah 52 juta ton, pada tahun 2000 adalah 76,53 juta ton, sedangkan pada tahun 2004 adalah 139,74 juta ton (Statistik Kelautan dan Perikanan Indonesia, 2005). Potensi *Sargassum* di Kepulauan Madura pada tahun 2005 menurut data DKP Sumenep adalah 7,1 juta ton per tahun (DKP Sumenep, 2007).

## 2.2 *Sargassum cristaefolium*

*Sargassum cristaefolium* berdasarkan Ipteknet (2005) memiliki karakteristik antara lain: batang utama silindris pendek dengan panjang sekitar satu sentimeter dan diameter tiga milimeter, melekat dengan *holdfast* berbentuk *discoidal* atau *conical*, *thalli* pada percabangan adalah gepeng, berselang-seling teratur, lebar *thalli* mencapai 4 mm, serta daun lonjong, pinggir bergerigi, panjang 5 cm, lebar 1 cm, ujung runcing. *Sargassum cristaefolium* tumbuh pada substrat batu di daerah ujung luar rataan terumbu yang terkena ombak. Sebaran algae adalah di pantai selatan Jawa dan pantai Kepulauan Seribu. Klasifikasi ilmiah *Sargassum cristaefolium* menurut Limukala (2009) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Chromista
Sub kingdom	: Chromobiota
Filum	: Ochrophyta
Sub filum	: Phaeista
Infra filum	: Chryista
Kelas	: Phaeophyceae
Ordo	: Fucales
Famili	: Sargassaceae
Genus	: Sargassum
Spesies	: <i>Sargassum cristaefolium</i>



Gambar 1. *Sargassum cristaefolium* (Ipteknet, 2005)

*Sargassum cristaefolium* merupakan salah satu spesies algae yang berasal dari marga *Sargassum* kelas Phaeophyta. Kelas Phaeophyta atau lebih dikenal sebagai algae coklat mengandung berbagai trace element antara lain kalsium, vitamin, mineral (kalsium, kalium, magnesium, natrium, Fe, Iod, Cu, Zn, S, P dan N), alkohol, dan polisakarida. Kandungan polisakarida berupa alginat, laminaran dan fukoidan. Kandungan lainnya yaitu mannitol, pigmen beta karoten, xanthin dan picoxanthin yang berwarna merah dan dipakai sebagai zat warna untuk lipstik. Kandungan metabolit sekunder dalam algae coklat juga sudah mulai diteliti antara lain kandungan steroid, alkaloid, fenol, dan vitamin. Ternyata algae coklat sangat kaya akan kandungan steroid, alkaloid dan phenol. Beberapa algae coklat telah diteliti aktivitasnya sebagai antibakteri, kemungkinan yang berkhasiat disini adalah senyawa fenol yang dikandungnya (Rahmat, 1999).

*Sargassum sp.* menghasilkan senyawa bioaktif hasil metabolisme sekunder yang tidak mengikat halogen dan mampu bertindak sebagai antimikrobia. Komponen bioaktif yang dihasilkan berupa senyawa kompleks diterpenoid dan senyawa campuran terpenoid-aromatik yang mempunyai aktivitas biologi sebagai antibiotik (Rahman dan Choudhary, 2001). Penelitian lain menyebutkan bahwa *Sargassum* memproduksi beberapa jenis senyawa sekunder, seperti florotanin (Keusge, *et al.*, 1997), steroid dan sterol (Faulkner, 1984). Florotanin mempunyai sifat antibakteri (Hay dan Fenical, 1988). Florotanin juga bersifat polar, sehingga larut dalam air dan bersifat tidak stabil. Berdasarkan hasil pengujian yang telah dilakukan, diduga senyawa aktif dalam ekstrak air dari *Sargassum* adalah florotanin (Glombitza dan Keusgen, 1995). *Sargassum* yang telah dikeringkan tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Senyawa bioaktif umumnya diekstraksi dari sampel rumput laut yang masih segar (Ballantine, *et al.*, 1987).

Menurut Sastrohamidjojo (1985), senyawa metabolit sekunder dari alga coklat yang bersifat polar adalah flavonoid dan alkaloid, sedangkan senyawa yang bersifat nonpolar adalah terpenoid dan steroid. Flavonoids merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar yang terdapat dalam semua tumbuhan berpembuluh. Semua flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon yang mempunyai sejumlah sifat yang sama. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung atom karbon dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi  $C_6-C_3-C_6$ , yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid dalam tumbuhan umumnya terikat sebagai glikosida, baik O-glikosida maupun C-glikosida. Alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid sering kali beracun bagi manusia dengan bahaya yang mempunyai aktivitas fisiologi yang menonjol sehingga digunakan secara luas dalam pengobatan. Alkaloid biasanya tak berwarna, seringkali bersifat aktif optik kebanyakan berbentuk kristal pada suhu kamar. Prazat alkaloid yang paling umum adalah asam amino, meskipun sebenarnya biosintesis kebanyakan asam amino lebih rumit. Secara kimia alkaloid merupakan suatu golongan heterogen. Banyak alkaloid bersifat terpenoid dan beberapa diantaranya dari segi biosintesis merupakan terpenoid termodifikasi alkaloid lain terutama berupa senyawa aromatik dengan gugus basa sebagai rantai samping.

### 2.3 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan hasil ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan. Pemilihan pelarut didasarkan pada

kemampuannya melarutkan ekstrak yang diinginkan saja serta mempunyai kelarutan yang besar (Guenther, 1987). Proses melarutkan suatu zat ke dalam pelarut memperlihatkan adanya zat yang sangat mudah larut dalam pelarut tanpa dipaksakan. Hal ini disebabkan adanya sifat *like dissolve like*. Sifat tersebut menentukan faktor kecocokan antara zat terlarut dan pelarut yang menyebabkan keduanya dapat bercampur menjadi satu, misalnya pelarut dan zat terlarut sama-sama bersifat polar (Pujaatmaka, 1990).

**Tabel 1. Sifat-Sifat Pelarut Umum**

Solvent	Rumus kimia	Titik didih	Konstanta Dielektrik	Massa jenis
<b>Pelarut Non-Polar</b>				
Heksana	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69 °C	2.0	0.655 g/ml
Benzena	$\text{C}_6\text{H}_6$	80 °C	2.3	0.879 g/ml
Toluena	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Dietil eter	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35 °C	4.3	0.713 g/ml
Kloroform	$\text{CHCl}_3$	61 °C	4.8	<b>1.498 g/ml</b>
Etil asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77 °C	6.0	0.894 g/ml
<b>Pelarut Polar Aprotic</b>				
1,4-Dioksana	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$	101 °C	2.3	<b>1.033 g/ml</b>
Tetrahidrofuran (THF)	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Diklorometana (DCM)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	40 °C	9.1	<b>1.326 g/ml</b>
Acetona	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56 °C	21	0.786 g/ml
Acetonitril (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimetilformamida (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimetil sulfoksida (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189 °C	47	<b>1.092 g/ml</b>
<b>Pelarut Polar Protic</b>				
Asam asetat	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6.2	<b>1.049 g/ml</b>
<i>n</i> -Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol (IPA)	$\text{CH}_3\text{-CH(-OH)-CH}_3$	82 °C	18	0.785 g/ml
<i>n</i> -Propanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	97 °C	20	0.803 g/ml
Etanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-OH}$	79 °C	30	0.789 g/ml
Metanol	$\text{CH}_3\text{-OH}$	65 °C	33	0.791 g/ml
Asam format	$\text{H-C(=O)OH}$	100 °C	58	<b>1.21 g/ml</b>
Air	$\text{H-O-H}$	100 °C	80	1.000 g/ml

Sumber: Wikipedia (2007)

Pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi

tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non polar larut dalam pelarut non polar (Vogel, 1987). Sifat-sifat umum pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Menurut Rivai (1995), salah satu ciri penting dari pelarut yang akan digunakan untuk mengekstraksi suatu zat/ senyawa adalah tetapan dielektriknya. Tetapan dielektrik pelarut adalah nisbah gaya yang bekerja pada dua muatan atau kutub dalam ruangan hampa dengan gaya bekerja pada dua muatan tersebut dalam pelarut. Jadi umumnya pelarut–pelarut yang berkutub (polar) dapat melarutkan zat–zat yang berkutub, dan pelarut yang tak berkutub dapat melarutkan zat–zat yang tidak berkutub. Beberapa tetapan dielektrik bahan-bahan pelarut dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2. Konstanta Dielektrik Beberapa Bahan Pelarut**

Pelarut	Konstanta Dielektrik (D)	Tingkat Kelarutan Dalam Air
Kloroform	4,806	Sedikit
Etil asetat	6,02	Sedikit
n-butanol	17,80	Sedikit
2-propanol	18,30	Misibel
1-propanol	20,10	Sedikit
Aceton	20,70	Misibel
Etanol	24,30	Misibel
Metanol	33,60	Misibel
Air	80,40	Misibel

Keterangan : Misibel = dapat bercampur dengan air dalam berbagai proporsi

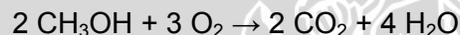
Sumber : Sudarmadji, *et al.* (1997)

Menurut Susanto (1999), jumlah pelarut berpengaruh terhadap efisiensi ekstraksi, tetapi jumlah yang berlebihan tidak akan mengekstrak lebih banyak, dalam jumlah tertentu pelarut dapat bekerja optimal. Ditambahkan Komara (1991), banyaknya pelarut yang akan digunakan mempengaruhi konsentrasi jenuh larutan

selama ekstraksi, makin banyak pelarut yang digunakan makin banyak zat terlarut yang terekstrak.

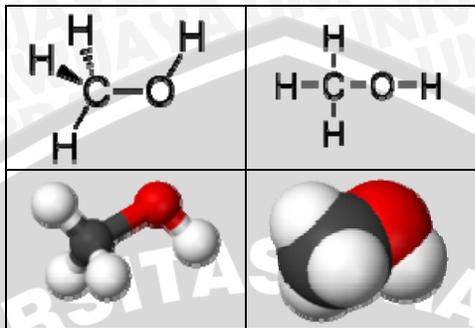
### 2.3.1 Metanol

Menurut Vogel (1987), metanol atau yang lebih dikenal dengan alkohol kayu atau metil alkohol adalah asam lemah turunan alkohol yang paling sederhana. Metanol adalah cairan yang tidak berwarna, volatil, mudah terbakar serta dapat diubah menjadi formaldehid. Rumus kimia metanol adalah  $\text{CH}_3\text{OH}$ . Pada keadaan atmosfer metanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Reaksi kimia metanol yang terbakar di udara dan membentuk karbon dioksida dan air adalah sebagai berikut:



Metanol memiliki toksisitas yang tinggi pada manusia. Jika tertelan sebanyak minimal 10 mL dapat menyebabkan kebutaan permanen yang disebabkan oleh perusakan saraf optik dan bila tertelan sebanyak 30 mL dapat berpotensi fatal, meskipun dosis fatal biasanya 100-125 mL (4 fl oz). Efek racun berlangsung berjam-jam. Toksisitas metanol berlangsung melalui dua mekanisme. Pertama, metanol memasuki tubuh dengan ingestioin, inhalasi, atau penyerapan melalui kulit. Kedua, metanol yang telah diserap tubuh akan dimetabolisme menjadi asam format (yang hadir sebagai ion format) melalui formaldehid dalam proses yang dikatalis oleh enzim alkohol dehidrogenase di dalam hati. Formate beracun karena menghambat mitokondria sitokrom c oksidase, menyebabkan gejala hipoksia di tingkat sel, dan juga menyebabkan asidosis metabolik di antara berbagai gangguan metabolisme lainnya. Fatal jaringan tidak akan mentolerir metanol (Yuharmen, *et al.*,

2002). Rumus molekul dan rumus bangun metanol dapat dilihat pada Gambar 2, sedangkan sifat-sifat pelarut metanol dapat dilihat pada Tabel 3.



Gambar 2. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Metanol (Wikipedia, 2009)

Sifat Metanol	
Nama IUPAC	Metanol
Nama lain	Hydroxymethane, metil alkohol, metil hidrat kayu, alkohol carbinol
Molecular formula	CH <sub>4</sub> O
Massa molar	32,04 g mol <sup>-1</sup>
Penampilan	cair berwarna
Kepadatan	0,7918 g / cm <sup>3</sup>
Titik lebur	-97 ° C, -142,9 ° F (176 K)
Titik didih	64,7 ° C, 148,4 ° F (337,8 K)
Kelarutan dalam air	<i>miscible</i>
Keasaman (p K <sub>a</sub> )	15,5 ~
Kelekatkan	0,59 MPa ° S pada 20 ° C
Momen dipol	1,69 D (gas)
Klasifikasi EU	Mudah terbakar (F) <i>Toxic</i> (T)
Titik nyala	12 ° C (54 ° F) (ditutup cangkir)
Terkait alkohol	Etanol, Propanol, Butanol
Terkait senyawa	Klorometana, Methoxymethane

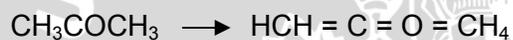
Sumber: Wikipedia (2009)

### 2.3.2 Aceton

Aceton merupakan keton yang paling sederhana. Aseton juga dikenal sebagai propanon, dimetil keton, 2-propanon, dimetilformaldehida, propan-2-on, dan β-ketopropana yang merupakan senyawa berbentuk cairan yang tidak berwarna dan mudah terbakar. Aceton larut dalam berbagai perbandingan dengan air, etanol, dietil

eter dan juga merupakan pelarut yang penting. Aceton secara umum dibuat melalui proses kumena, yakni benzena dialkylasi dengan propena dan produk proses kumena (isopropilbenzena) dioksidasi untuk menghasilkan fenol dan aseton (Anonymous, 2009).

Menurut Day and Underwood (1999), aceton merupakan larutan organik yang mudah menguap dengan gugus kimia  $\text{CH}_3\text{COCH}_3$ . Di laboratorium, aceton digunakan sebagai kutub pelarut aprotik dalam berbagai reaksi organik. Pelarut organik aceton dipilih dengan pertimbangan kemampuan mengekstraksi senyawa-senyawa polar dan non polar dengan meminimalkan kontaminasi garam laut. Aceton dalam proses pirolisa akan membentuk ketena dengan reaksi sebagai berikut:



Aceton dapat dikondensasi dengan asetilen membentuk 2 metil 3 butynediol, suatu intermediate untuk Isoprene melalui reaksi:

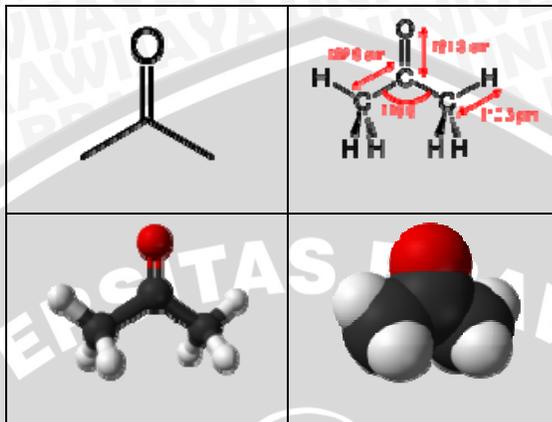


Aceton bila direaksikan dengan Hidrogen Sianida dalam kondisi basa akan menghasilkan Aceton Sianohidrin melalui reaksi:



Aceton mempunyai harga konstanta dielektrik 20,7 dan momen dipol 2,91 yang menyebabkan aceton dapat berikatan hidrogen dengan senyawa lain. Ikatan hidrogen adalah tarikan atom hidrogen yang parsial positif ( $\delta^+$ ) dari satu molekul ditarik oleh pasangan elektron menyendiri dari atom suatu molekul lain yang elektronegatif. Pelarut aceton memiliki pasangan elektron menyendiri yang elektronegatif, sehingga dapat membentuk ikatan hidrogen Pada pelarut aceton ikatan hidrogen yang terbentuk cukup kuat. Hal ini dikarenakan aceton agak polar

(Yowani dan Hayatti, 2006). Rumus molekul dan rumus bangun aceton dapat dilihat pada Gambar 3, sedangkan sifat-sifat pelarut aceton dapat dilihat pada Tabel 4.



Gambar 3. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Aceton (Wikipedia, 2009)

Tabel 4. Sifat Fisik Pelarut Aceton

Sifat Aceton	
Nama IUPAC	Propanon
Nama lain	$\beta$ -ketopropane, dimetil keton, dimethylformaldehyde, DMK, propanon, 2-propanon, Propan-2 satu
Molecular formula	$C_3H_6O$
Massa molar	$58,08 \text{ g mol}^{-1}$
Penampilan	Berwarna cair (bentuk seperti salju putih ketika padat)
Kepadatan	$0,7925 \text{ g / cm}^3$
Titik lebur	$-94,9^\circ \text{ C}$ , $178 \text{ K}$ , $-139^\circ \text{ F}$
Titik didih	$56,53^\circ \text{ C}$ , $330 \text{ K}$ , $134^\circ \text{ F}$
Titik nyala	$-17^\circ \text{ C}$
Kelarutan dalam air	miscible
Keasaman ( $p K_a$ )	24,2
Momen dipol	2,91 D
Temperatur kritis	$235,05^\circ \text{ C}$
Tekanan kritis ( $20^\circ \text{ C}$ )	4.701 kPa
Klasifikasi EU	Mudah terbakar (F)
Terkait pelarut	Air (sangat larut dalam air), Etanol, Isopropanol, Toluena
Ambang Batas Nilai	500 ppm (TWA), 750 ppm (stel)
LD <sub>50</sub>	> 2000 mg / kg, oral (tikus)

Sumber: Wikipedia (2009)

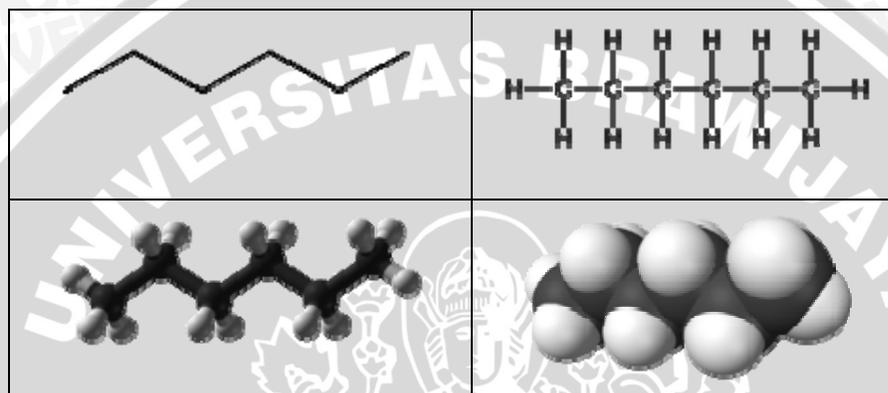
Aceton telah dipelajari secara ekstensif dan umumnya diakui memiliki toksisitas akut dan kronis rendah jika tertelan dan atau terhirup. Penghirupan pada konsentrasi tinggi (sekitar 9.200 ppm) di udara menyebabkan iritasi pada tenggorokan pada manusia walaupun hanya terpapar selama 5 menit. Pada konsentrasi 1000 ppm menyebabkan iritasi mata dan tenggorokan dalam waktu kurang dari 1 jam. Namun, paparan aceton 500 ppm di udara tidak menyebabkan gejala iritasi pada manusia bahkan setelah 2 jam pemaparan. Aceton saat ini tidak dianggap sebagai karsinogen, zat kimia mutagenik atau agen penyebab efek neurotoksisitas kronis. Aceton diyakini hanya memperlihatkan sedikit toksisitas dalam penggunaan normal, dan tidak ada bukti kuat efek kesehatan kronis jika tindakan pencegahan dasar diikuti. LD<sub>50</sub> untuk konsumsi manusia pada 1,159 g / kg; LD<sub>50</sub> terhirup oleh tikus adalah 44 g / m<sup>3</sup> dan berlangsung sekitar lebih dari 4 jam. LD<sub>50</sub> aceton untuk ikan adalah 8,3 g / l air (atau sekitar 0,8%) selama 96 jam. Aceton dapat menimbulkan risiko signifikan deplesi oksigen dalam sistem akuatik karena mengkonsumsi mikroba yang terpapar aceton (Setiadi, 2005).

### 2.2.3 Heksan

Heksan adalah hidrokarbon dengan rumus kimia C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, merupakan sebuah alkana dengan enam atom karbon. Heksan memiliki isomer yang tidak bercabang yang disebut normal heksan (n-heksan). Heksan berupa cairan tidak berwarna pada suhu kamar, dengan titik didih antara 50 dan 70 °C, dengan bau mirip bensin. Heksan banyak digunakan karena murah, relatif aman, sebagian besar tidak reaktif, dan mudah menguap (non-polar pelarut) (Day and Underwood, 1999).

Heksan adalah konstituen yang berpengaruh nyata dalam bensin. Heksan adalah cairan yang tidak berwarna pada suhu ruang, dengan titik didih antara 50-

70°C, dengan bau seperti bensin. Heksan digunakan secara luas sebagai barang yang murah, relatif aman, sebagian besar tidak reaktif, dan sangat mudah menguap, merupakan pelarut non polar (Wikipedia, 2009). Rumus molekul dan rumus bangun heksan dapat dilihat pada Gambar 4, sedangkan sifat-sifat pelarut heksana dapat dilihat pada Tabel 5.



Gambar 4. Rumus Molekul dan Rumus Bangun Heksan (Wikipedia, 2009)

Tabel 5. Sifat Fisik Pelarut Heksan

Sifat Heksana	
Nama IUPAC	propanon Heksan
Nama lain	<i>n-Hexane</i>
Angka RTECS	MN9275000
Molecular formula	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>
Massa molar	86,18 g / mol
Penampilan	Cair berwarna
Kepadatan	0,6548 g / mL, cairan
Titik lebur	-95 ° C (178 K)
Titik didih	69 ° C (342 K)
Titik nyala	-23,3 ° C
Kelarutan dalam air	13 mg / L pada 20 ° C
Kelekatatan	0,294 cP pada 25 ° C
Klasifikasi EU	Mudah terbakar (F) Berbahaya (X) Berbahaya bagi lingkungan (N)

Sumber: Wikipedia (2009)

## 2.4 Ekstraksi

Proses ekstraksi merupakan isolasi senyawa yang terdapat dalam campuran larutan atau campuran padat dengan menggunakan pelarut yang cocok. Salah satu teknik ekstraksi adalah maserasi. Maserasi merupakan proses dimana simplisia yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam menstrum sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut akan melarut. Maserasi merupakan cara penyarian yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat akan didesak keluar. Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel (Ansel, 1989).

Maserasi digunakan untuk penyarian simplisia yang mengandung zat aktif mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung zat mudah mengembang dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, stirik dan lain-lain. Keuntungan cara penyarian dengan maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Kerugian cara maserasi adalah pengerjaannya lama dan penyariannya kurang sempurna (Anonymous, 1986). Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organik. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1978).

Suatu ekstrak tumbuhan dapat diekstraksi secara maksimal dengan suatu seri pelarut yang meningkat kepolarannya, yaitu heksan, etil asetat dan metanol, maka fraksi bobot ekstrak yang paling besar pada umumnya adalah metanol (Munifah, *et al.*, 2005). Hasil penelitian mengenai algae coklat telah banyak dilaporkan, yaitu: Wiyanto (2008) yang mengekstrak lima algae coklat dengan pelarut metanol, diklorometana dan heksan dan didapatkan hasil bahwa *D. dichofoma* var. *implexa* yang diekstrak dengan heksan mengandung komponen fenol yang paling tinggi dan memiliki daya antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*. Juneidi (2008) melaporkan tiga ekstrak rumput laut *S. polycystum*, *C. racemosa* dan *G. verrucosa* yang diekstrak dengan pelarut berbeda-beda yakni etanol, metanol, dan dietil eter, didapatkan hasil bahwa ekstrak *S. polycystum* yang diekstrak dengan etanol menunjukkan zona penghambatan yang paling besar terhadap bakteri *A. alginolyticus*.

## 2.5 Antibakteri

Antibakteri menurut Ganiswarna (1995) adalah obat atau senyawa yang digunakan untuk membunuh bakteri, khususnya bakteri yang merugikan manusia. Definisi ini berkembang bahwa antibakteri merupakan senyawa kimia yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh suatu mikroorganisme. Antimikrobia yang ideal menunjukkan sifat toksisitas selektif, toksisitas yang selektif merupakan fungsi reseptor yang spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat atau karena hambatan biokimia yang terjadi bagi organisme namun tidak bagi inang

Antimikroba yang ideal menurut Jawetz, *et al.* (1995) harus memenuhi syarat-syarat sebagai berikut; (1) mempunyai kemampuan untuk mematikan atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang luas (*broad spectrum antibacteria*),

(2) tidak menimbulkan terjadinya resistensi dari mikroorganisme patogen, (3) tidak menimbulkan efek samping (*side effect*) yang buruk pada tubuh, seperti reaksi alergi, kerusakan syaraf, iritasi lambung, dan sebagainya, serta (4) tidak mengganggu keseimbangan flora normal seperti flora usus atau flora kulit.

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri menurut Pradhika (2008) antara lain sebagai berikut; (1) menghambat sintesis dinding sel, (2) merusak permeabilitas membran sel, (3) menghambat sintesis RNA (proses transkripsi), serta (4) menghambat sintesis protein (proses translasi) dan replikasi DNA.

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

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran (Pharmacopeial, 1993). Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas (Kusmiyati dan Agustini, 2006).

Prosedur difusi-kertas cakram-agar (metode Kirby-Bauer, 1966) yang distandardisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran

sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

Menurut Jawetz, *et al.* (1995), semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer (1966) antara lain; (1) konsentrasi mikroba uji, (2) konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium.

### 2.5.2 Bakteri Uji Gram Negatif

Bakteri gram negatif umumnya lebih tidak peka terhadap daya kerja antibakteri bila dibandingkan dengan bakteri gram positif. Struktur dinding sel bakteri gram negatif kemungkinan berpengaruh terhadap masuknya molekul besar ke dalam sel. Struktur dinding sel bakteri gram positif hanya terdiri dari lapisan peptidoglikan dan asam teikoat. Struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks, yakni pada bagian luar peptidoglikan terkandung tiga polimer yaitu lipoprotein, selaput luar dan lipopolisakarida (Jawetz, *et al.*, 1995).

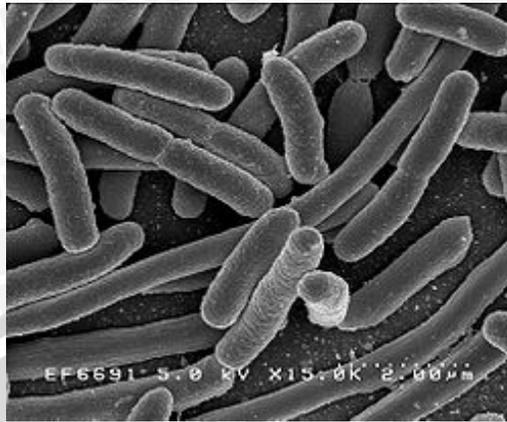
Hasil penelitian dengan menggunakan bakteri uji *Staphylococcus aureus* sebagai gram positif dan *Escherichia coli* sebagai gram negatif menunjukkan bahwa *E.coli* lebih tahan terhadap aktivitas antibakteri produk asam palmitat. Struktur dinding sel bakteri gram positif yang lebih sederhana memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Dinding sel yang kompleks menimbulkan hambatan bagi senyawa antibakteri seperti alkohol untuk menembus membran sel bakteri, hal ini dapat dilihat dari perbedaan

lebar zona hambat antara bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Nufailah, *et al.*, 2002).

### 2.5.2.1 *Echerichia coli*

*Eschericia Coli* adalah salah satu kelompok bakteri koliform yang berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob, dan tidak mampu untuk membentuk spora. *Echerichia coli* dapat memfermentasikan laktosa dengan menghasilkan asam dan gas pada suhu 40°C, bersifat indol positif tidak dapat menggunakan sitrat, menghasilkan asam dari manitol pada suhu 37°C, bersifat merah metil (*methyl red*) positif, *voges-proskauer* (VP) negatif. Suhu optimum pertumbuhan adalah 37 °C (Susanty, 2009). *Escherichia coli* memproduksi lebih banyak asam di dalam medium glukosa, memproduksi indol tetapi tidak memproduksi aceton, bakteri ini memproduksi CO<sub>2</sub> dan H<sub>2</sub> dengan perbandingan 1:1 dan tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Fardiaz, 1992). Klasifikasi ilmiah bakteri *Escherichia coli* menurut Brooks, *et al.* (2005) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Protophyta
Subdivisio	: Schizomycetea
Classis	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>



**Gambar 5. Bakteri *Escherichia coli* (Wikipedia, 2010)**

Menurut Supardi dan Sukanto (1999), *Escherichia coli* tumbuh pada suhu antara 10-40°C, dengan suhu optimum 37°C. pH optimum untuk pertumbuhannya adalah pada 7,0-7,5, pH minimum pada 4,0 dan maksimum pada pH 9,0. Nilai  $a_w$  minimum untuk pertumbuhan *Escherichia coli* adalah 0,96. Bakteri ini relatif sangat sensitif terhadap panas dan dapat dinonaktifkan pada suhu pasteurisasi makanan atau selama pemasakan makanan.

Selang waktu yang dibutuhkan sel untuk membelah diri disebut dengan waktu generasi. Tiap spesies bakteri memiliki waktu generasi yang berbeda-beda, seperti *Escherichia coli*, bakteri umum yang dijumpai di saluran pencernaan dan di tempat lain, memiliki waktu generasi 15-20 menit. Hal ini artinya bakteri *Escherichia coli* dalam waktu 15-20 menit mampu menggandakan selnya menjadi dua kali lipat. Hal ini menunjukkan hubungan antara pertambahan sel dengan waktu adalah berbentuk geometrik eksponensial dengan rumus  $2^n$ . Jadi, bakteri *Escherichia coli* dalam waktu 10 jam berkembang dari satu sel menjadi  $1,09 \times 10^{12}$  sel atau lebih dari 1 triliun sel (Prasetyo, 2009).

*Escherichia coli* berdasarkan Anonymous (2010) merupakan organisme yang normal terdapat dalam usus manusia sehingga keberadaannya bukan merupakan

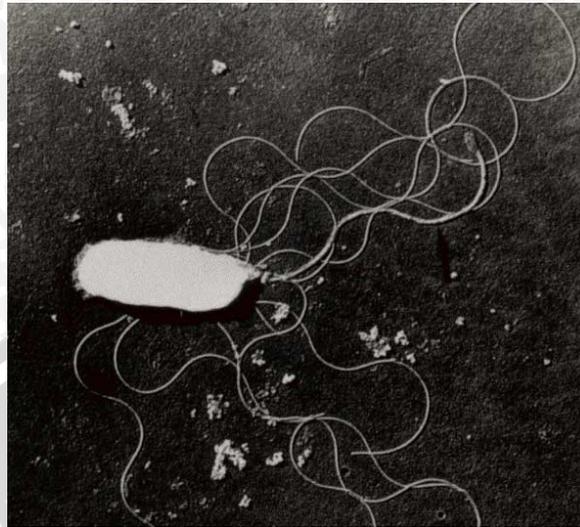
masalah. Namun beberapa strain tertentu dari bakteri ini dapat menimbulkan penyakit seperti diare dan muntaber, Hal ini berkaitan dengan kemampuan membentuk enterotoksit yang berperan dalam pengeluaran cairan dan elektrosit.

*Escherichia coli* patogen menimbulkan sindroma klinik yaitu: 1) gastroenteritis akut yang menyerang terutama anak-anak di bawah 2 tahun, dan 2) infeksi di luar saluran pencernaan yaitu: infeksi saluran kemih, abses usus buntu, peritonitis, radang empedu dan infeksi pada luka bakar.

#### 2.5.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio* merupakan jenis bakteri yang hidupnya saprofit di air, air laut, dan tanah. Sebagian besar bersifat halofil dan tumbuh optimal pada air laut bersalinitas 20-40%. Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang kecil-kecil yang mampu bergerak dan bersifat fakultatif anaerobik. *Vibrio parahaemolyticus* merupakan bakteri halofilik gram negatif. Bakteri ini tumbuh pada kadar NaCl optimum 3%, kisaran suhu 5–43 °C, pH 4.8–11 dan aw 0.94–0.99. Pertumbuhan berlangsung cepat pada kondisi suhu optimum (37 °C) dengan waktu generasi hanya 9–10 menit. *Vibrio* juga termasuk bakteri yang bersifat halofil, yaitu tumbuh dengan rentang toleransi salinitas 5-80 ppt dan tumbuh optimal pada salinitas 20-40 ppt. Masa inkubasi biasanya antara 12–24 jam, tetapi dapat berkisar antara 4 – 30 jam (Taslihan, 1992). Klasifikasi *Vibrio parahaemolyticus* menurut Anonymous (2008) adalah sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Proteobacteria
Phylum	: Gammaproteobacteria
Class	: Vibrionales
Ordo	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Species	: <i>Vibrio parahaemolyticus</i>



**Gambar 6. *Vibrio parahaemolyticus* (Tokyo Institute of Technology, 2009)**

*Seafood* yang merupakan produk hasil laut, memberikan semua kondisi yang dibutuhkan oleh *Vibrio parahaemolyticus* untuk tumbuh dan berkembang biak yakni keberadaan garam, nutrisi yang baik serta pH dan aw yang cocok sehingga *Vibrio parahaemolyticus* sering terdapat sebagai flora normal di dalam *seafood*. Mereka terkonsentrasi dalam saluran pencernaan moluska, seperti kerang, tiram dan mussel yang mendapatkan makanannya dengan cara mengambil dan menyaring air laut. Strain *Vibrio parahaemolyticus* patogen merupakan penyebab penyakit gastroenteritis yang disebabkan oleh produk hasil laut (*seafood*), terutama yang dimakan mentah, dimasak tidak sempurna atau terkontaminasi dengan *seafood* mentah setelah pemasakan. Gastroenteritis berlangsung akut, diare tiba-tiba dan kejang perut yang berlangsung selama 48 – 72 jam dengan masa inkubasi 8 – 72 jam. Gejala lain adalah mual, muntah, sakit kepala, badan agak panas dan dingin. Pada sebagian kecil kasus, bakteri juga menyebabkan septisemia (Syamsir, 2008).

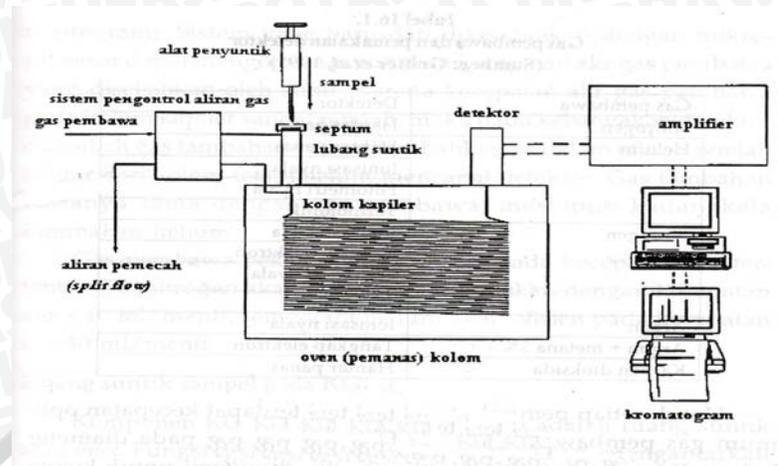
Menurut Elfahrybimantara (2009), banyak *Vibrio* yang merupakan *zoonotic*, menyebabkan penyakit pada ikan dan *shellfish*. *Vibriosis* adalah salah satu penyakit paling utama pada budidaya ikan dan *shellfish* laut. *Vibrio* menyerang benih (*fingerlings*), juvenil dan ikan dewasa; serangan terjadi ketika temperatur air berkisar 24-26°C. Gejala ditandai oleh *exophthalmia*, *rosacea* dan luka pada dasar sirip dada dan *hemorrhagic gonads*.

## 2.5 Uji GC-MS

Teknik analisis GC-MS merupakan gabungan dari teknik kromatografi gas dan teknik spektrometri massa. Kromatografi gas berfungsi sebagai pemisah senyawa-senyawa yang terdapat pada sampel yang dianalisis dengan resolusi tinggi, sedangkan bagian spektrometri massa berfungsi mengidentifikasi senyawa-senyawa yang telah dipisahkan oleh kromatografi gas dimana senyawa akan dibombardir dengan elektron sehingga senyawa terpecah dalam fragmen-fragmen molekuler. Pola pecahannya menunjukkan karakteristik, dan disebut "sidik jari molekuler" dari suatu senyawa (Putra, 2007)

### 2.6.1 Sistem Peralatan GC

Diagram skematik peralan GC ditunjukkan oleh Gambar 7 di bawah ini, dengan komponen utama adalah: kontrol dan penyedia gas pembawa, ruang suntik sampel, kolom yang diletakkan dalam oven yang dikontrol secara termostatik; sistem deteksi dan pencatat (detektor dan *recorder*); serta komputer yang dilengkapi dengan perangkat pengolah data. (Gandjar dan Rohman, 2007).



Gambar 7. Sistem Peralatan Kromatografi Gas (Wikipedia, 2006)

Prinsip kerja kromatografi didasarkan pada pemisahan campuran dua atau lebih senyawa yang berbeda yang terdistribusi antara dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Solut-solut yang mudah menguap (dan stabil terhadap panas) bermigrasi melalui kolom yang memiliki fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya. Fase gerak yang berupa gas akan mengelusi solut dari ujung kolom lalu menghantarkannya ke detektor. Pemisahan pada kromatografi gas didasarkan pada titik didih suatu senyawa dikurangi dengan semua interaksi yang mungkin terjadi antara solut dengan fase diam. Penggunaan suhu yang meningkat (biasanya pada kisaran 50-350°C) bertujuan untuk menjamin bahwa solut akan menguap dan karenanya akan cepat terelusi. Gas membawa sampel melalui kolom-kolom *chromatographic*, dan sampel dipisahkan pada temperatur mendidih dan afinitasnya pada kolom. Campuran diidentifikasi oleh timing pemisahan, dikenal dengan *retention time*. *Retention time* ini bersifat unik pada berbagai jenis sampel dan itu ditunjukkan pada kolom *chromatographic* (Gandjar dan Rohman, 2007). Kondisi pengoperasian alat GC-MS dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6. Kondisi Pengoperasian GC-MS Untuk Analisis Sampel**

Syarat Kondisi Gas Chromatography	
Kolom	DB-5ms; 25 m x 30 mm ID x 0,25 $\mu$ m
Arus Initial Mode	1 ml / menit, terus mengalir (fase gas)
Injeksi Mode	Berdenyut splitless
Jumlah injeksi	1 $\mu$ l
Temperatur Injeksi Port	290 ° C
Pulse Pressure & Time	35 psi, 0.5 min
Purge Flow & Sisa	20 ml / menit, 2 menit
Solvent Delay	5 menit
Temperatur Oven awal, Tunggu Sisa	50 ° C, 1 menit
Temperatur ramp 1, Plateau	30 ° C / menit, 280 ° C
Ramp Temperatur 2, Plateau	15 ° C / menit, 310 ° C
Final Tahan Sisa	4 menit

Sumber: (Arnestown and Gattersburg, 2009)

#### 2.6.1.1 Fase Gerak pada GC

Fase gerak pada GC juga disebut gas pembawa karena tujuan awalnya adalah untuk membawa solut ke kolom, karenanya gas pembawa tidak berpengaruh pada selektifitas. Syarat gas pembawa adalah: tidak reaktif, murni/ kering karena kalau tidak murni akan berpengaruh pada detektor; dan dapat disimpan pada tangki yang bertekanan tinggi (biasanya merah untuk hidrogen, dan abu-abu untuk nitrogen) (Nazir, 1989).

Helium merupakan tipe gas pembawa yang sering digunakan karena memberikan efisiensi kromatografi yang lebih baik (mengurangi pelebaran pita). Pada dasarnya kecepatan aliran gas pembawa berbanding lurus dengan penampang kolom. Kecepatan aliran gas kira-kira 50-70 ml/menit untuk kolom dengan diameter dalam 6 mm, 25-30 ml/menit untuk kolom dengan diameter dalam 3 mm. Kolom kapiler memakai kecepatan gas yang rendah, yakni antara 0,2-2 ml/menit (Gandjar dan Rohman, 2007).

### 2.6.1.2 Ruang Suntik Sampel pada GC

Komponen GC yang utama selanjutnya adalah ruang suntik atau *inlet*. Fungsi dari ruang suntik adalah untuk mengantarkan sampel ke dalam aliran gas pembawa. Ruang suntik harus dipanaskan terlebih dahulu (terpisah dari kolom) dan biasanya 10<sup>o</sup>-15<sup>o</sup>C lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum. Jadi seluruh sampel akan menguap segera setelah sampel disuntikkan (Nazir, 1989).

Pada kolom kapiler, sampel yang diperlukan sangat sedikit, bahkan sampai 0,01 µl. Karena pengukuran secara akurat sulit dilakukan jika sampel yang disuntikkan terlalu kecil, maka ditempuh suatu cara untuk memperkecil ukuran sampel setelah penyuntikan. Salah satu cara yang dilakukan adalah dengan menggunakan teknik pemecah suntikan (*split injection*). Sampel yang ideal dalam kromatografi gas adalah sampel yang hanya mengandung senyawa yang akan dipisahkan dalam kolom, dan dalam banyak hal juga pelarut yang mudah menguap yang melarutkan sampel tersebut. Konsentrasi sampel biasanya berkisar antara 1-10% (Gandjar dan Rohman, 2007).

### 2.6.1.3 Kolom pada GC

Kolom menurut Nazir (1989) merupakan tempat terjadinya proses pemisahan karena di dalamnya terdapat fase diam. Oleh karena itu, kolom merupakan komponen sentral pada GC. Ada dua jenis kolom pada GC yaitu kolom kemas dan kolom kapiler. Kolom kemas terbuat dari gelas atau logam yang tahan karat atau dari tembaga dan aluminium. Panjang kolom jenis ini adalah 1-5 meter dengan diameter dalam 1-4 mm. Efisiensi kolom akan meningkat dengan semakin bertambah halus partikel fase diam ini. Ukuran partikel fase diam biasanya berkisar antara 60-80 mesh (250-170 µm). Kolom kapiler memiliki rongga pada

bagian dalam kolom yang menyerupai pipa (tube). Fase diam melekat mengelilingi dinding dalam kolom. Fase diam yang dipakai di kolom kapiler dapat bersifat polar, semi polar maupun non polar.

Banyak bahan kimia yang digunakan sebagai fase diam antara lain: squalen, DEGS (Dietilglukogen suksinat), OV-17 (*phenil methyl silicone oil*). Semakin tipis lapisan yang menyalut sebagai fase diam, maka semakin tinggi suhu operasionalnya. Untuk lapisan salut  $< 1\mu\text{m}$ , suhu operasional dapat mencapai  $460^\circ\text{C}$ , sementara itu suhu minimalnya dapat mencapai  $-60^\circ\text{C}$  (Gandjar dan Rohman, 2007).

#### 2.6.1.4 Detektor pada GC

Detektor merupakan perangkat yang diletakkan pada ujung kolom tempat keluar fase gerak (gas pembawa) yang membawa komponen hasil pemisahan. Detektor pada kromatografi adalah suatu sensor elektronik yang berfungsi mengubah sinyal gas pembawa dan komponen-komponen di dalamnya menjadi sinyal elektronik (Nazir, 1989).

Pada garis besarnya detektor pada GC termasuk detektor deferensial, dalam arti respon yang keluar dari detektor memberikan relasi yang linier dengan kadar atau laju aliran massa komponen yang teresolusi. Kromatogram yang merupakan hasil pemisahan fisik komponen-komponen disajikan oleh detektor sebagai deretan luas puncak terhadap waktu. Waktu tambat tertentu dalam kromatogram dapat digunakan sebagai data kualitatif, sedangkan luas puncak dalam kromatogram dapat digunakan sebagai data kualitatif yang keduanya telah dikonfirmasi dengan senyawa baku (Gandjar dan Rohman, 2007).

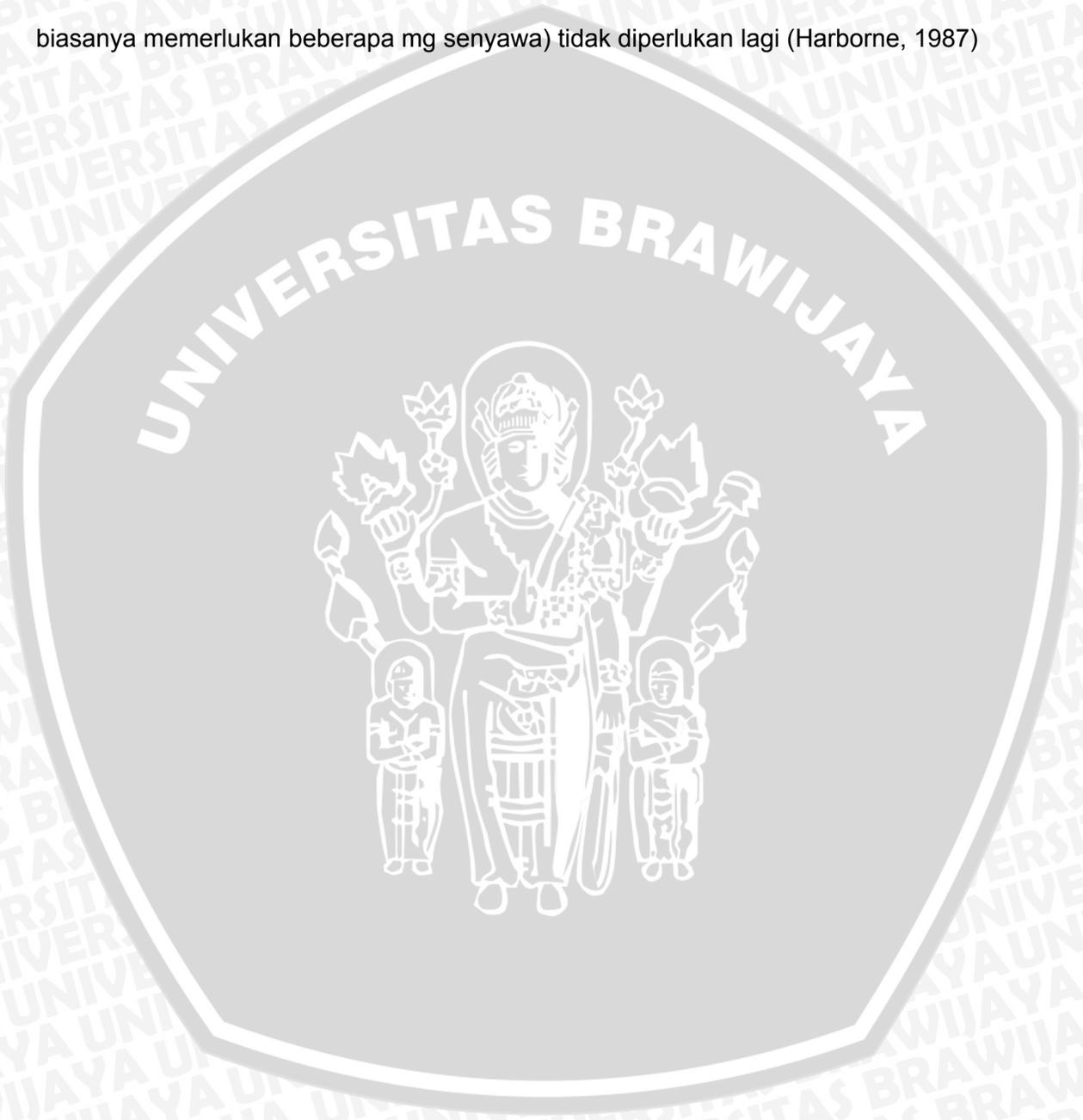
### 2.6.2 Spektrometri Massa (SM)

Pada dasarnya spektrometri massa adalah penguraian sesepora senyawa organik dan perekaman pola fragmentasi menurut massanya. Uap cuplikan berdifusi ke dalam system spectrometer massa yang bertekanan rendah, lalu diionkan dengan energi yang cukup untuk memutuskan ikatan kimia. Ion bermuatan positif yang terbentuk dipercepat dalam medan magnet yang menyebarkan ion tersebut dan memungkinkan pengukuran kelimpahan nisbi ion yang mempunyai nisbah massa terhadap muatan tertentu. Rekaman kelimpahan ion terhadap massa merupakan grafik spectrum massa yang terdiri atas sederetan garis yang intensitasnya berbeda-beda pada satuan massa yang berlainan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Sebagai pelengkap perangkat analisis GC-MS, spektrometri massa berfungsi menembaki bahan yang sedang diteliti dengan berkas elektron dan secara kuantitatif mencatat hasilnya sebagai suatu fragmen. Terpisahnya fragmen didasarkan pada massanya (lebih tepat, massa dibagi muatan). Keuntungan utama spektrometri massa sebagai metode analisis yaitu metode ini lebih sensitif dan spesifik untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui. Hal ini disebabkan adanya pola fragmentasi yang khas sehingga dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dan rumus molekul. Puncak ion molekul penting dikenali karena memberikan bobot molekul senyawa yang diperiksa. Puncak paling kuat pada spektrum disebut puncak dasar (*base peak*) dan dinyatakan dengan nilai 100% (Silverstein, 1991).

Pada kebanyakan proses analisa senyawa dengan menggunakan spektrometri massa, sebagian kecil dari senyawa induk tahan terhadap proses penguapan dan akan direkam sebagai puncak ion molekul atau ion induk. Lalu,

massa ion induk dan ion lainnya dapat diukur dengan sangat tepat (sampai 0,0001 satuan massa). Ketepannya sedemikian rupa sehingga dapat menunjukkan rumus molekul senyawa secara tepat dan dengan demikian analisis unsur yang lazim (yang biasanya memerlukan beberapa mg senyawa) tidak diperlukan lagi (Harborne, 1987)



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan Penelitian

###### 3.1.1.1 Algae coklat

Algae coklat *Sargassum cristaefolium* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Rumput laut dipanen dari daerah budidaya dan pada saat pemanenan bahan dicuci dengan air laut. Sampel dicuci untuk membersihkan sisa lumpur, pasir dan kotoran lainnya yang masih melekat. Gambar algae coklat *Sargassum cristaefolium* yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 8. Sampel Penelitian *Sargassum cristaefolium***

Sampel dimasukkan ke dalam kantong plastik warna hitam untuk menghindari kontak dengan sinar matahari. Sampel dimasukkan ke dalam coolbox lalu diberi es balok dan bagian luar coolbox disegel dengan *lackban* untuk mempertahankan suhu rendah (*cold chain system*) dalam coolbox selama proses

transportasi. Selang waktu pengangkutan dari tempat pemanenan ke laboratorium adalah semalam (12 jam).

#### 3.1.1.2 Bahan Pelarut Maserasi

Bahan kimia yang digunakan untuk ekstraksi antibakteri algae coklat *Sargassum cristaefolium* yaitu pelarut n-heksan teknis, pelarut acetone teknis, serta pelarut metanol teknis yang merupakan pelarut polar. Ketiga pelarut teknis yang digunakan memiliki konsentrasi yang sama yakni 96%, hal ini bertujuan untuk menghindari pengaruh perbedaan konsentrasi terhadap kadar ekstrak yg didapat (variabel kontrol). Bahan lain yang digunakan adalah aquades yang digunakan pada *waterbath* pada saat proses pengentalan ekstraksi (pemisahan pelarut dari ekstrak) dengan *vacuum rotary evaporator*.

#### 3.1.1.3 Bahan Uji Cakram

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji cakram adalah kertas cakram (*paper disc*) yang masing-masing berdiameter 6 mm, *cotton swap*, biakan murni bakteri *Escherichia coli* dan *Vibrio parahemolyticus*, media TSA (*tripton soy agar*) untuk menumbuhkan *Escherichia coli*, dan media TCBSA (*thiosulfat citrate bile salt agar*) untuk menumbuhkan *Vibrio parahaemolyticus*. Semua bahan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Kepadatan bakteri adalah  $10^9$  cfu/ml.

#### 3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam maserasi (ekstraksi) senyawa antibakteri dari algae coklat *Sargassum cristaefolium* adalah baskom, pisau, talenan, timbangan analitik, *beaker glass* 300 ml, erlenmayer 300ml, gelas corong, spatula, gelas ukur,

inkubator oven untuk pengondisian suhu 40 °C serta lemari es untuk menyimpan sampel. Alat-alat yang digunakan pada saat pemisahan pelarut dari ekstrak adalah 1 unit *rotary vacuum evaporator* dan botol vial. Adapun alat-alat yang digunakan untuk uji cakram adalah autoklaf untuk sterilisasi alat, *micro pipet*, cawan petri, bunsen, dan inkubator. Untuk identifikasi kandungan senyawa-senyawa aktif dalam ekstrak digunakan 1 unit alat GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) yang terdapat pada Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Metode Eksperimen**

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki. Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen. Penelitian eksperimen lebih mudah dilakukan di laboratorium karena alat-alat yang khusus dan lengkap dapat tersedia, dimana pengaruh luar dapat dengan mudah dicegah selama eksperimen. Penelitian dapat dilakukan tanpa atau dengan kelompok pembanding (Nazir,1989).

Metode eksperimen dalam penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan pelarut yang berbeda kepolarannya terhadap kualitas antibakteri hasil ekstraksi. Hipotesis ini dibuktikan dengan melakukan uji daya penghambatan antibakteri dari senyawa yg berhasil diekstraksi oleh jenis pelarut yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli* dan *Vibrio*

*parahaemolyticus*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening (zona di sekitar kertas cakram yang tidak ditumbuhi bakteri dan terlihat jernih) dimana semakin lebar zona bening, maka semakin baik senyawa antibakteri berhasil diekstraksi dari sampel. Ekstrak dengan daya hambat terbaik selanjutnya diidentifikasi komponen antibakterinya dengan metode Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS). Senyawa diidentifikasi berdasarkan kesamaan *peak* hasil GC-MS dengan *peak* standar pada luas dan retensi waktu tertentu.

### 3.2.2 Variabel Penelitian

Menurut Surachmad (1994), ada dua macam variabel dalam penelitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah penggunaan jenis pelarut yang berbeda pada saat ekstraksi yaitu heksan 96%, acetone 96% dan metanol 96%. Variabel terikat penelitian ini adalah perbedaan lebar diameter daerah hambatan antibakteri yang terlihat sebagai zona bening di sekitar kertas cakram dan dinyatakan dalam satuan mm.

### 3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian uji cakram yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 6 perlakuan yakni 3 perlakuan dengan menggunakan ekstrak *Sargassum cristaefolium* yang dimaserasi dengan pelarut yang berbeda-beda dan 3 kontrol pelarut yang digunakan sebagai pembanding. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan diuji daya hambatnya dengan 2 jenis bakteri uji secara duplo.

Tabel 7. Rancangan Penelitian (RAL)

Jenis pelarut	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
E	E1	E2	E3
F	F1	F2	F3

Perlakuan:

- A : Kontrol methanol  
 B : Kontrol aceton  
 C : Kontrol heksana  
 D : Sargassum pengekstrak metanol  
 E : Sargassum pengekstrak aceton  
 F : Sargassum pengekstrak heksana

### 3.2.4 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu berdasarkan data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter daerah hambatan yang tidak ditumbuhi oleh bakteri. Sebagai pembandingan (kontrol) dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing pelarut untuk mengetahui apakah zona hambat yang dihasilkan berasal dari daya antibakteri ekstrak itu sendiri atau berasal dari pelarutnya yang memang hakikatnya sudah memiliki memiliki daya antibakteri.

### 3.2.5 Analisis Data

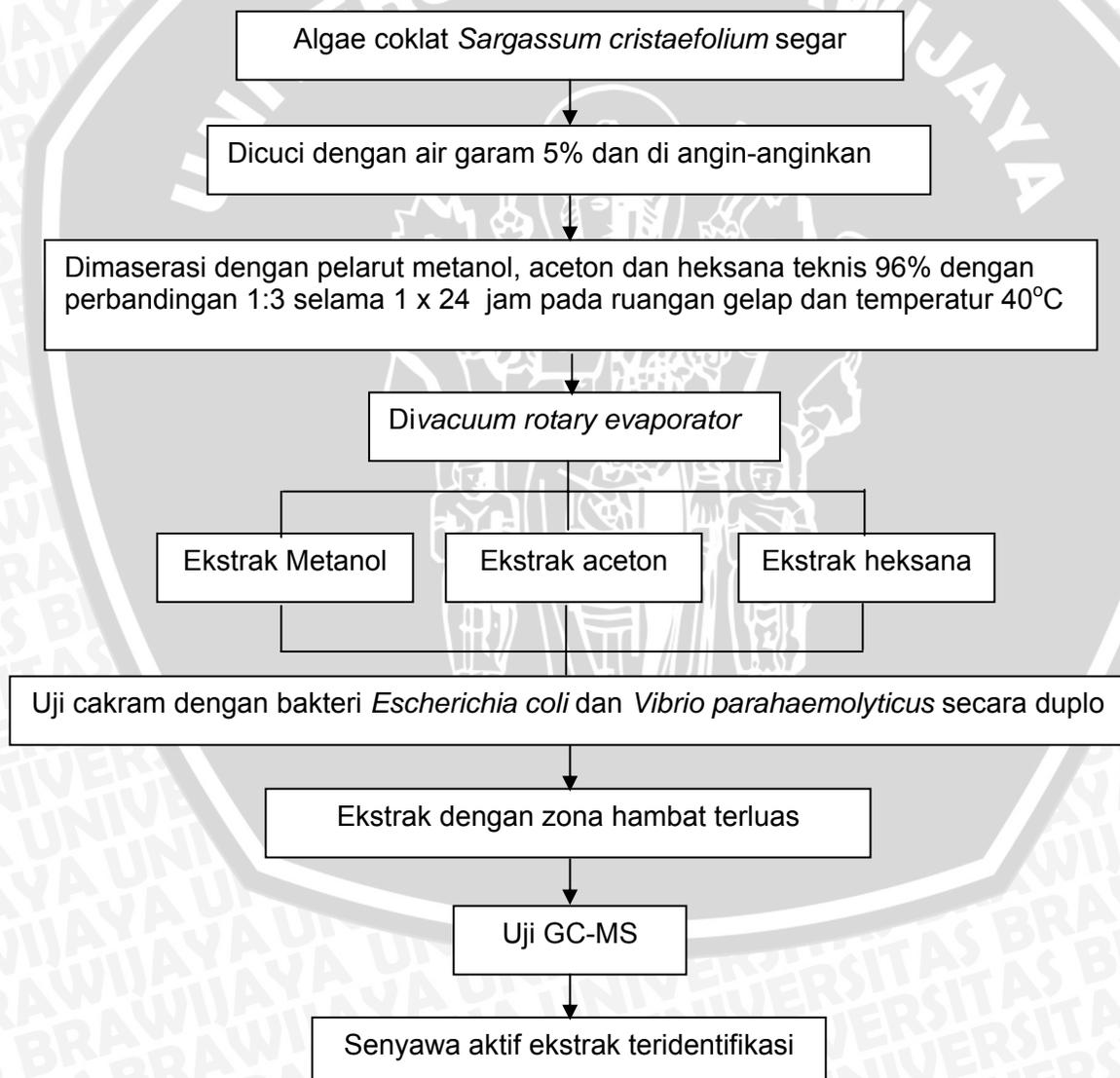
Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1%

dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNJ pada taraf 5% untuk mengetahui perlakuan terbaik, dalam hal ini jenis pelarut yang digunakan.

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1. Pembuatan Ekstrak *Sargassum cristaefolium*

Algae coklat *Sargassum cristaefolium* segar diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Pulau Madura, Jawa Timur. Skema kerja pembuatan ekstrak *Sargassum cristaefolium* dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Flowchart Pembuatan Ekstrak *Sargassum cristaefolium*

Alur proses ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini mengacu pada Zubia *et al.* (2007) dengan sedikit modifikasi pada proses pencucian dan maserasi. Pada penelitian Zubia *et al.* (2007) pencucian dilakukan dengan menggunakan air tawar (air pam) serta melakukan maserasi di ruang gelap dengan menggunakan *stirer* saat pengadukan sampel, sedangkan pada penelitian ini dilakukan pencucian dengan air garam 5% serta maserasi dalam inkubator oven tanpa bantuan *stirer*. Proses pengadukan dilakukan secara manual.

Proses ekstraksi diawali dengan melakukan pencucian terhadap *Sargassum cristaefolium* segar dengan menggunakan air garam 5% untuk menghilangkan kotoran dan pasir yang menempel. Sampel yang telah dicuci diangin-anginkan sekitar 1 jam lalu dipotong kecil-kecil (kira-kira 1 cm) dan di-blender untuk memperkecil ukuran partikel agar mudah diekstraksi. Sampel dimaserasi dengan menggunakan pelarut metanol, aceton dan heksan teknis masing-masing konsentrasi 96% dengan perbandingan 1:3 selama 1 X 24 jam. Pada penelitian ini digunakan sampel *Sargassum cristaefolium* sebanyak 200 gram dan pelarut 600 ml pada tiap-tiap perlakuan.

Maserasi dilakukan pada temperatur 40°C di dalam ruangan gelap (inkubator oven) sambil sesekali dilakukan pengocokan (penghomogenan). Maserasi dilakukan sebanyak 3 kali pengulangan. Sampel yang telah dimaserasi disaring dengan kertas saring lalu dikentalkan dengan cara memisahkan pelarut dari ekstrak dengan menggunakan *vacuum rotary evaporator*.

Proses pemisahan pelarut dilakukan dengan alat *vacuum rotary evaporator* tujuannya agar pelarut dapat dipisahkan pada tekanan tinggi dan suhu yang lebih rendah daripada suhu titik didih masing-masing pelarut yang digunakan sehingga

antibakteri tidak rusak (mendidih). Ekstrak ditampung dalam botol vial sehingga diperoleh ekstrak metanol, aceton dan heksana yang bebas dari pelarut.

### 3.3.2 Uji Cakram

Prosedur uji cakram yang distandardisasikan (Kirby-Bauer, 1966) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Langkah pertama yang dilakukan pada uji cakram adalah menyiapkan media pertumbuhan bakteri uji. Media yang digunakan ada 2, yakni media TCBSA yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dan media TSA yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *Escherichia coli*. Langkah-langkah pembuatan media TCBSA dapat dilihat pada Lampiran 1, sedangkan prosedur pembuatan media TSA dapat dilihat pada Lampiran 2.

Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang tidak ditumbuhi oleh mikroba termasuk adanya daerah jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

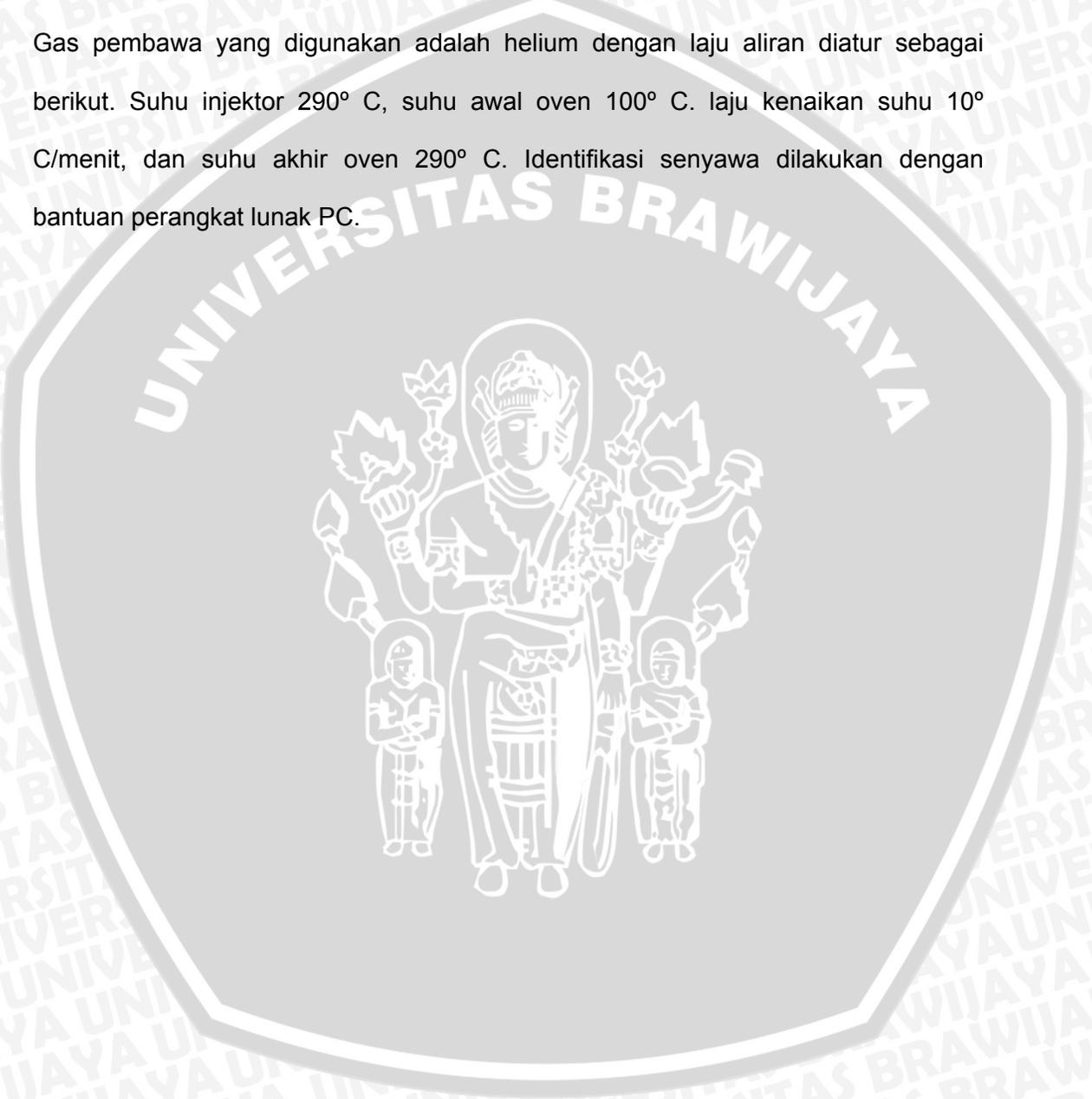
Untuk mengetahui konsentrasi yang memberikan diameter daerah hambatan terbesar dilakukan uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Dengan demikian dapat diketahui efektifitas atau pengaruh perlakuan terhadap diameter daerah hambatan bakteri *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Adapun

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

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

### 3.3.4 Uji Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Uji GC-MS dilakukan terhadap hasil ekstrak yang menunjukkan daya antibakteri tertinggi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Gas pembawa yang digunakan adalah helium dengan laju aliran diatur sebagai berikut. Suhu injektor 290° C, suhu awal oven 100° C. laju kenaikan suhu 10° C/merit, dan suhu akhir oven 290° C. Identifikasi senyawa dilakukan dengan bantuan perangkat lunak PC.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Penelitian

#### 4.1.1 Ekstraksi Algae Coklat *Sargassum cristaefolium*

Proses ekstraksi dengan sampel sebanyak 200 gram dan perbandingan pelarut 1:3 pada 3 kali ulangan menghasilkan ekstrak rata-rata 65 ml pada ekstraksi dengan metanol, 36 ml pada ekstraksi dengan acetone dan 7 ml pada ekstraksi dengan heksan. Proses ekstraksi dengan pelarut metanol menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat keruh agak kehijauan. Proses ekstraksi dengan pelarut acetone menghasilkan ekstrak kental berwarna coklat, sedangkan proses ekstraksi dengan heksan menghasilkan senyawa yang agak kental berwarna kuning cerah. Hasil ekstraksi dari *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut metanol, acetone dan heksana disajikan dalam Gambar 10.



**Gambar 10.** Hasil Ekstraksi dari *Sargassum cristaefolium* dengan Pelarut Aceton (Kiri), Metanol (Tengah) dan Heksana (Kanan)

#### 4.1.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Di antara ketiga pelarut yakni metanol, acetone, dan heksan, heksan merupakan pelarut yang paling baik digunakan untuk ekstraksi senyawa antibakteri

*Sargassum cristaefolium*. Hal ini dapat dilihat dari hasil perhitungan statistik data zona penghambatan terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus* dengan menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Notasi BNJ 5% diameter zona bening ekstrak *Sargassum cristaefolium* terhadap *Escherichia coli* disajikan pada Tabel 8, sedangkan notasi BNJ 5% *Vibrio parahaemolyticus* disajikan pada Tabel 9.

**Tabel 8. Notasi BNJ 5% Perbandingan Diameter Zona Hambat Pelarut dan Ekstrak *Sargassum cristaefolium* Terhadap *Escherichia coli***

Rata-rata Diameter	B (6,00)	A (6,01)	C (6,01)	E (6,31)	D (6,35)	F (8,18)
B (6,00)	-	-	-	-	-	-
A (6,01)	0,01	-	-	-	-	-
C (6,01)	0,01	-	-	-	-	-
E (6,31)	0,31*	0,30*	0,30*	-	-	-
D (6,35)	0,35*	0,34*	0,34*	0,04	-	-
F (8,18)	2,18*	2,17*	2,17*	1,87*	1,83*	-
Notasi BNT <sub>0,05</sub> = 0,07	a	a	a	b	b	c

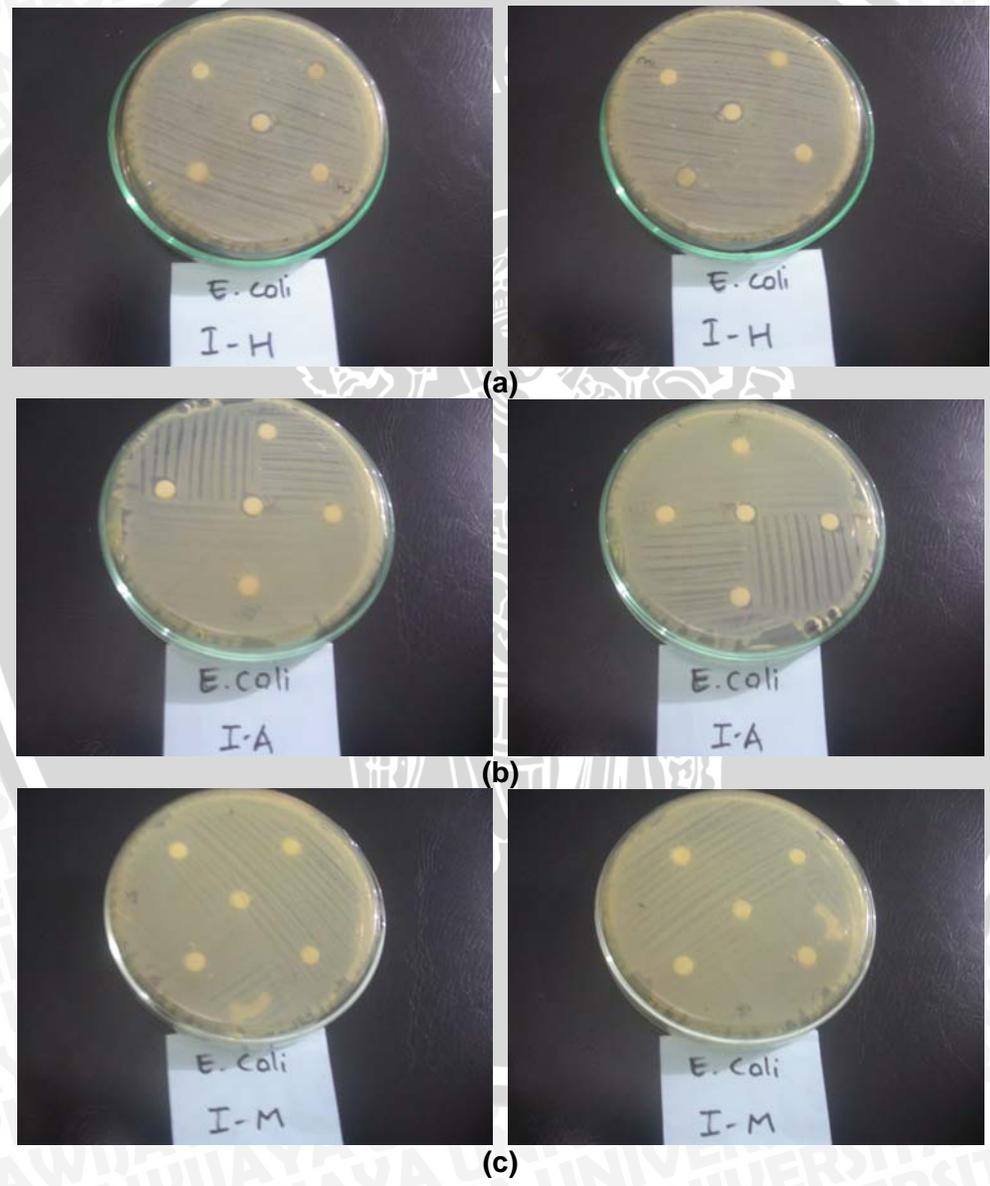
**Tabel 9. Notasi BNJ 5% Perbandingan Diameter Zona Hambat Pelarut dan Ekstrak *Sargassum cristaefolium* Terhadap *Vibrio parahaemolyticus***

Rata-rata diameter	A (6,01)	B (6,01)	C (6,01)	D (6,25)	E (6,42)	F (7,73)
A (6,01)	-	-	-	-	-	-
B (6,01)	-	-	-	-	-	-
C (6,01)	-	-	-	-	-	-
D (6,25)	0,24*	0,24*	0,24*	-	-	-
E (6,42)	0,41*	0,41*	0,41*	0,17*	-	-
F (7,73)	1,72*	1,72*	1,72*	1,48*	1,31*	-
Notasi BNT <sub>0,05</sub> = 0,17	a	a	a	b	c	d

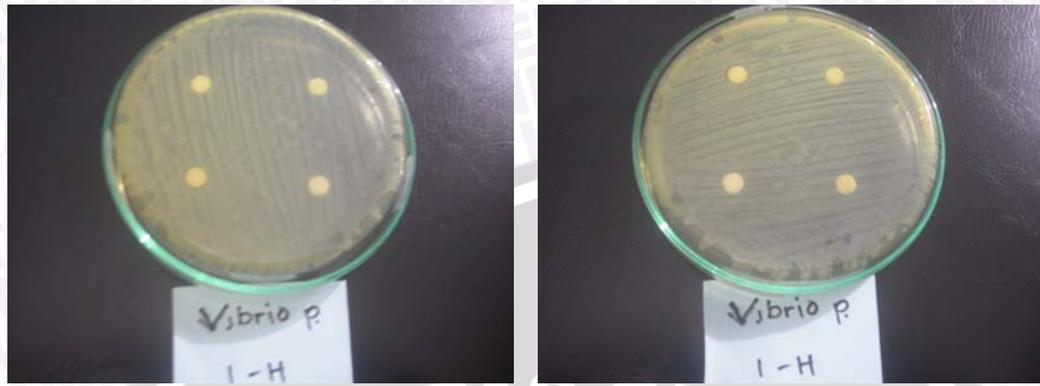
Ket: \* = Selisih sepasang nilai tengah > BNJ<sub>0,05</sub>

- A = Kontrol metanol
- B = Kontrol aceton
- C = Kontrol heksana
- D = *Sargassum* pengekstrak metanol
- E = *Sargassum* pengekstrak aceton
- F = *Sargassum* pengekstrak heksan

Senyawa antibakteri yang diekstraksi dengan metanol, aceton dan heksan lebih efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* dibandingkan *Vibrio parahaemolyticus*. Rata-rata zona bening ekstrak yang dimaserasi dengan heksan menghasilkan zona bening sebesar 8,18 mm terhadap *Escherichia coli* dan hanya menghasilkan rata-rata 7,73 mm terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.



Gambar 11. Perbandingan Zona Hambat Ekstrak Antibakteri *Sargassum cristaefolium* yang Dimaserasi dengan Pelarut Heksan (a), Aceton (b) dan Metanol (c) Terhadap *Escherichia coli*



(a)



(b)

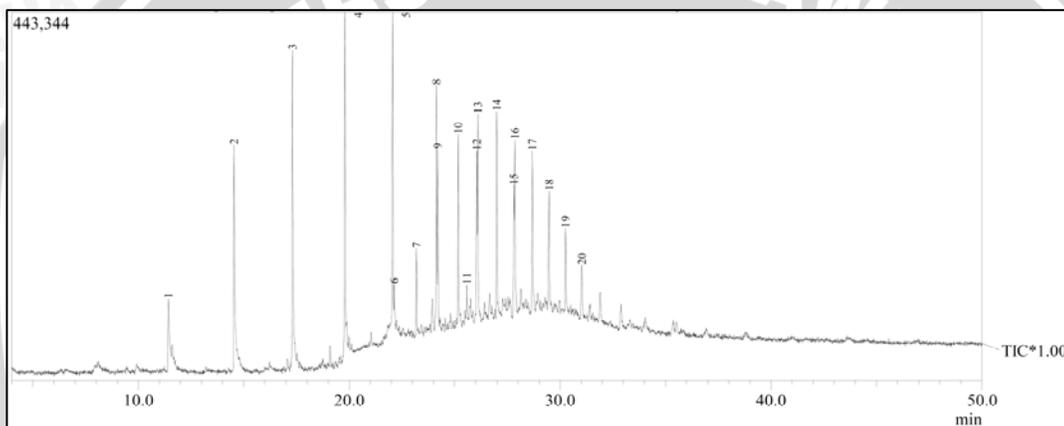


(c)

Gambar 12. Perbandingan Zona Hambat Ekstrak Antibakteri *Sargassum cristaefolium* yang Dimaserasi dengan Pelarut Heksana (a) Aceton (b) dan Metanol (c) Terhadap *Vibrio parahaemolyticus*

#### 4.1.3 Analisis GC-MS

Analisis senyawa antibakteri dengan metode GC-MS terhadap ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut heksan menghasilkan 20 tampilan peak dengan 29 jenis senyawa antibakteri berhasil diidentifikasi dari seluruh peak tersebut. Tampilan kromatogram Hasil GC-MS disajikan pada Gambar 13, sedangkan jenis-jenis senyawa yang berhasil teridentifikasi disajikan pada Tabel 10.

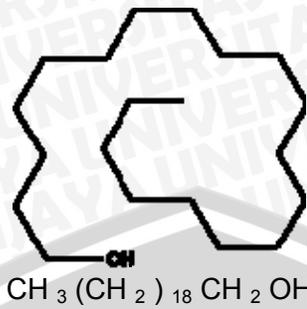


Gambar 13. Hasil GC-MS Ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan Pelarut Heksan

Tabel 10. Senyawa Antibakteri Hasil GC-MS Ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan Pelarut Heksan

No	Jenis Senyawa	No	Jenis Senyawa
1	Undecane	16	Heneicosane
2	1-Tetradecene	17	1-Docosene
3	1-Pentadecene	18	Docosane
4	1-Hexadecene	19	Cyclotetracosane
5	Hexadecane	20	Cyclodocosane
6	1-Heptadecene	21	Tetracosane
7	Heptadecane	22	1,2-Benzenedicarboxylic acid
8	1-Octadecene	23	Heptacosane
9	Octadecane	24	Nonacosane
10	1-Nonadecene	25	Pentatriacontane
11	Nonadecane	26	Hexatriacontane
12	Nonadecyl alcohol	27	Hexatriacontane
13	3-Eicosene	28	Tritetracontane
14	Eicosane	29	Tetratetracontane
15	1-Eicosanol		

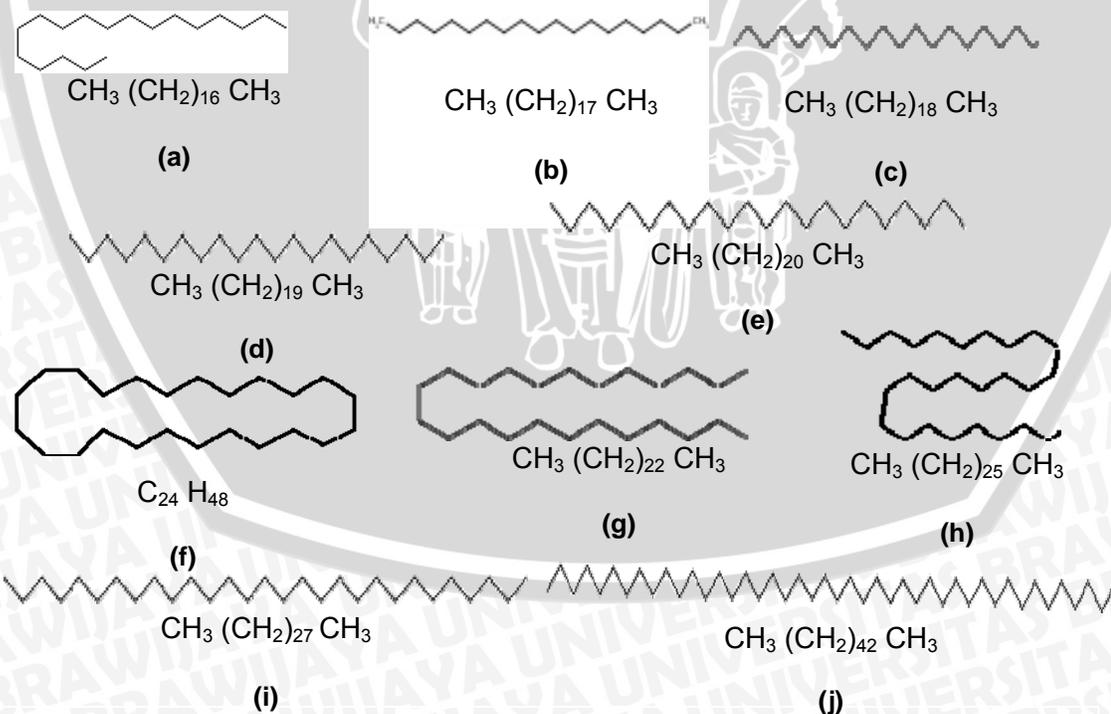




(b)

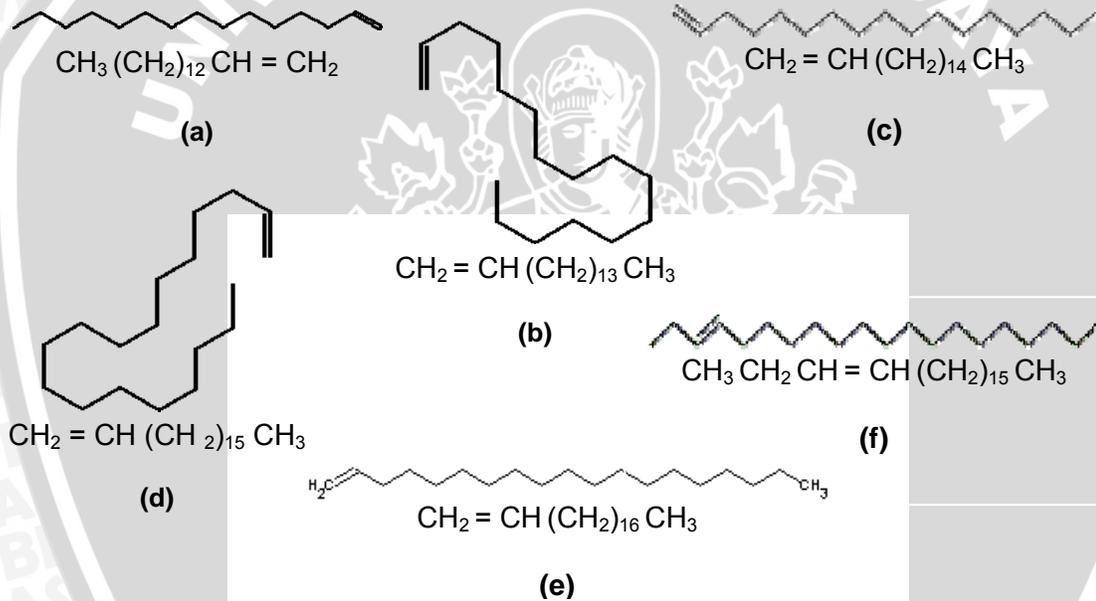
Gambar 15 Struktur Kimia Senyawa Alkanol Ekstrak *Sargassum cristaefolium*: (a) *nonadecyl alcohol* dan (b) *1-eicosanol* (Chemicaland21, 2009).

Senyawa antibakteri *Sargassum cristaefolium* hasil GC-MS yang tergolong ke dalam kelompok alkana berjumlah 18 jenis dengan kisaran jumlah atom karbon (C) bervariasi mulai dari 13 atom C pada senyawa *undecane* hingga 44 atom C pada senyawa *tetratetracontane*. Struktur kimia senyawa-senyawa alkana tersebut disajikan pada Gambar 16.



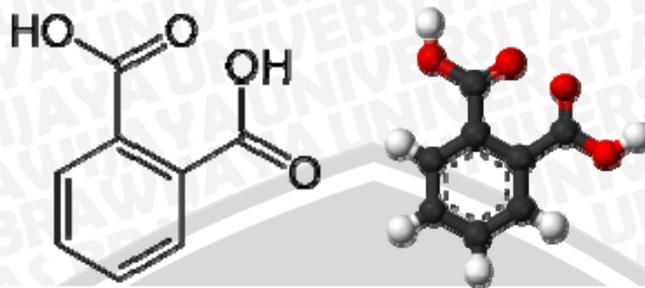
Gambar 16. Struktur Kimia Senyawa Alkana Ekstrak *Sargassum cristaefolium*: (a) *Octadecane*, (b) *Nonadecane*, (c) *Eicosane*, (d) *Heneicosane*, (e) *Docosane*, (f) *Cyclotetracosane*, (g) *Tetracosane*, (h) *Heptacosane*, (i) *Nonacosane* dan (j) *Tetratetracontane* (Chemicalbook, 2006).

Senyawa antibakteri *Sargassum cristaefolium* yang tergolong ke dalam kelompok alkena berjumlah 8 jenis dengan kisaran jumlah atom karbon (C) bervariasi mulai dari 14 atom C pada senyawa 1-tetradecene hingga 22 atom C pada senyawa 1-docosene. Dari 8 senyawa yang memiliki luas area terbesar antara lain 1-octadecene, 1-pentadecene, 1-heptadecene, 1-hexadecene, 1-nonadecene dan 3-eicosene. Struktur kimia senyawa-senyawa alkena tersebut disajikan pada Gambar 17.



**Gambar 17. Struktur Kimia Senyawa Alkena Ekstrak *Sargassum cristaefolium*: (a) 1-pentadecene, (b) 1-hexadecene, (c) 1-heptadecene, (d) 1-octadecene, (e) 1-nonadecene dan (f) 3-eicosene (Chemicalbook, 2006).**

Ekstrak *Sargassum cristaefolium* yang dimaserasi dengan heksana mengandung satu senyawa yang memiliki gugus aktif karboksil yakni 1,2-Benzene dicarboxylic acid atau lebih dikenal sebagai asam ftalat. Struktur kimia dari asam ftalat disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Struktur Kimia Asam Ftalat (Chemindustry, 2008)

Dari 20 peak yang teridentifikasi sejumlah 10 peak memiliki luas area di atas 5 %, antara lain *peak* ke-2, 3, 4, 5, 8, 10, 13, 14 dan 16. Dari 9 peak terluas tersebut terdapat 18 senyawa antibakteri yang berhasil diidentifikasi antara lain senyawa *cyclotetracosane*, *heneicosane*, *tetracosane*, *octadecane*, *nonadecane*, *icosane*, *docosane*, *tetratetracontane*, *heptacosane* dan *nonacosane* yang termasuk dalam kelompok senyawa alkana, *1-octadecene*, *1-pentadecene*, *1-heptadecene*, *1-hexadecene*, *1-nonadecene*, *1-docosene*, dan *3-icosene* yang tergolong sebagai senyawa alkena serta *nonadecyl alcohol* yang merupakan kelompok alkanol.

## 4.2 Pembahasan

### 4.2.1 Pengaruh Pelarut Terhadap Kandungan Senyawa Antibakteri Dalam *Sargassum cristaefolium*

Senyawa antibakteri terbaik diperoleh dari hasil ekstraksi *Sargassum cristaefolium* dengan menggunakan pelarut non polar heksan. Penggunaan pelarut yang bersifat non polar menghasilkan senyawa antibakteri yang bersifat non polar pula yakni senyawa asam karboksilat dan alkena yang merupakan golongan hidrokarbon. Sebagai pengecualian, senyawa alkanol merupakan turunan alkana yang salah satu gugusnya diganti dengan gugus -OH sehingga tidak lagi bersifat non polar melainkan bersifat polar. Hasil ekstraksi ini berbeda dengan penelitian

yang dilakukan oleh Firdaus (2006) yang menggunakan pelarut metanol, acetone dan etanol 80% untuk mengekstrak antibakteri dari *Sargassum polycystum* dan *Sargassum echinocarpum*. Penggunaan senyawa yang lebih polar menghasilkan senyawa antibakteri yang bersifat polar pula yakni florotanin. Senyawa-senyawa antibakteri yang ditemukan di dalam alga coklat diantaranya asam amino, terpenoids, florotanin, *acrylic acids*, fenol, steroid, keton halogenasi dan alkana halogenasi, polisulfida siklik serta asam lemak (Bhakuni dan Rawat, 2005). Pada sebagian besar alga laut aktivitas antimikrobiahnya ditandai dengan kehadiran *acrylic acid* (Mtolera dan Semesi, 2008).

Perbedaan kandungan ekstrak algae coklat yang berpotensi sebagai antibakteri disebabkan oleh perbedaan polaritas jenis pelarut yang digunakan. Meskipun terdapat perbedaan jenis pelarut mana yang terbaik digunakan sebagai bahan ekstraksi dimana pada penelitian ini senyawa heksan yang bersifat non polar yang merupakan pelarut paling baik sedangkan pada Firdaus (2006) pelarut terbaik merupakan metanol 80% yang bersifat polar, namun dalam penelitian ini diketahui bahwa ekstrak algae coklat bersifat antibakteri. Susanto (1999) menyebutkan bahwa kandungan pada algae sebenarnya semua sama, namun karena lingkungan tempat tumbuh yang berbeda menyebabkan konsentrasi atau kadar dari substansi yang dikandung jadi berbeda. Vitor *et al.* (2002) menambahkan bahwa pelarut yang digunakan baik pelarut organik maupun anorganik akan berpengaruh terhadap substansi murni yang akan dibawanya dari suatu bahan.

Heksan merupakan pelarut yang bersifat non polar. Seperti dinyatakan oleh Vogel (1987), bahwa pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan

kepolaran seyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar. Dengan kata lain, metabolit sekunder yang terdapat pada *Sargassum cristaefolium* yang bersifat sebagai antibakteri kemungkinan besar bersifat non polar.

#### 4.2.2 Intensitas Kepekaan Bakteri

Menurut Bonang dan Enggar (1982), kepekaan bakteri terhadap suatu zat antibakteri dapat diketahui dengan cara membandingkan diameter zona hambatan yang didapat pada uji cakram dengan ukuran daerah hambatan antibiotika dan khemoterapetika yang telah ada. Berikut adalah daftar ukuran daerah hambatan berbagai antibiotika dan khemoterapetika.

Diameter zona hambatan antibakteri dari *Sargassum cristaefolium* terhadap *Escherichia coli* dapat dibandingkan dengan diameter zona hambatan dari antibiotik yang biasa digunakan terhadap bakteri *Escherichia coli* yakni kolistin. *Escherichia coli* dikatakan resisten terhadap kolistin jika membentuk diameter zona hambatan 8 mm. Dikatakan agak resisten atau intermediat jika membentuk diameter zona hambatan 9-10 mm. Dikatakan peka jika terbentuk zona hambatan 11 mm atau lebih. Perlakuan terbaik dari uji cakram dari ekstrak *Sargassum cristaefolium*, yang diekstraksi menggunakan pelarut heksan memiliki diameter zona bening rata-rata adalah 8,18 mm. Hal ini berarti antibakteri dari ekstrak *Sargassum cristaefolium* resisten terhadap bakteri *Escherichia coli*.

**Tabel 11. Diameter Zona Hambatan Berbagai Antibiotika Dan Khemoterapetika.**

Antibiotika/ khemoterapetika	Kekuatan cakram	Diameter daerah hambatan (mm)		
		Resisten	Agak resisten	Peka
Ampisiin				
-Batang gram negative dan enterokokus	10 µg	11 atau kurang	12-13	14 atau lebih
- Staphilokokus dan jasad renik yang peka terhadap penisilin	10 µg	20 atau kurang	21-28	29 atau lebih
- Haemophilus				20 atau lebih
Basitrasin	10 satuan	8 atau kurang	9-12	13 atau lebih
Sefaloridin	30 µg	11 atau kurang	12-15	16 atau lebih
Sefalotin	30 µg	14 atau kurang	15-17	18 atau lebih
Khloramfenikol	30 µg	12 atau kurang	13-17	18 atau lebih
Kolistin	10 µg	8 atau kurang	9-10	11 atau lebih
Eritromisin	15 µg	13 atau kurang	14-17	18 atau lebih
Gentamisin	10 µg			13 atau lebih
Kenamisin	30 µg	13 atau kurang	14-17	18 atau lebih
Linkomisin	2 µg	9 atau kurang	10-14	15 atau lebih
Metisilin	5 µg	9 atau kurang	10-13	14 atau lebih
Nafsilin dan Oxalin " Nalidixic acid"	1 µg 30 µg	10 atau kurang 13 atau kurang	11-12 14-18	13 atau lebih 19 atau lebih
Neomisin	30 µg	12 atau kurang	13-16	17 atau lebih
Novobiosin	30 µg	17 atau kurang	18-21	22 atau lebih
Nitrofurantoin	300 µg	14 atau kurang	15-16	17 atau lebih
Oleandomisin	15 µg	11 atau kurang	12-16	17 atau lebih
Penisilin G				
- <i>Staphylococcus</i>	10 satuan	20 atau kurang	21-28	29 atau lebih
- Lain jasad renik	10 satuan	11 atau kurang	12-21	22 atau lebih
Polimixin B	300 unit	8 atau kurang	9-11	12 atau lebih
Streptomisin	10 µg	11 atau kurang	12-14	15 atau lebih
Sulfanomida	300 µg	12 atau kurang	13-16	17 atau lebih
Tetrasiklin	30 µg	14 atau kurang	15-18	19 atau lebih
Vankomisin	30 µg	9 atau kurang	10-11	12 atau lebih

Sumber: Bonang dan Enggar (1982)

Diameter zona hambatan antibakteri dari *Sargassum cristaefolium*. terhadap *Vibrio parahaemolyticus* dapat dibandingkan dengan diameter zona hambatan dari

antibiotik yang biasanya digunakan terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yakni tetrasiklin. *Vibrio parahaemolyticus* dikatakan resisten terhadap tetrasiklin jika membentuk diameter zona hambatan 14 mm. Dikatakan agak resisten atau intermediate jika membentuk diameter zona hambatan 15-18 mm. Dikatakan peka jika terbentuk zona hambatan 19 mm atau lebih. Perlakuan terbaik dari uji cakram dari ekstrak *Sargassum cristaefolium* yang diekstraksi menggunakan pelarut kloroform memiliki diameter zona hambatan rata-rata adalah 7,73 mm. Hal ini berarti antibakteri dari ekstrak *Sargassum cristaefolium* resisten terhadap *Vibrio parahaemolyticus*.

Tingkat daya antibakteri senyawa yang diekstrak dari *Sargassum cristaefolium* tidak efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* maupun *Vibrio parahaemolyticus*, namun tidak menutup kemungkinan lebih efektif bila diaplikasikan terhadap bakteri galur lain semisal dari golongan gram positif. Meskipun belum efektif digunakan pada *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus*, namun dari penelitian ini mampu didapatkan informasi adanya aktivitas antibakteri dari senyawa yang diekstrak dari *Sargassum cristaefolium*.

#### **4.2.3 Senyawa Yang Berpotensi Sebagai Antibakteri Dan Mekanisme Penghambatan Pertumbuhan Bakteri**

Senyawa-senyawa antibakteri dikelompokkan menjadi 4 golongan berdasarkan gugus aktif dan ada tidaknya ikatan rangkap, yakni alkana, alkena, alkanol dan asam karboksilat. Alkana dalam kimia organik merupakan kelompok senyawa kimia yang hanya terdiri dari karbon (C) dan hidrogen (H) dengan rumus umum  $C_nH_{2n+2}$  kecuali pada bentuk siklik, memiliki jumlah atom hidrogen lebih banyak dibandingkan kelompok hidrokarbon lainnya serta tidak memiliki ikatan rangkap (Ars-grin, 2008). Alkana tidak memiliki ikatan rangkap sehingga diduga tidak

memberikan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli* maupun *Vibrio parahaemolyticus*.

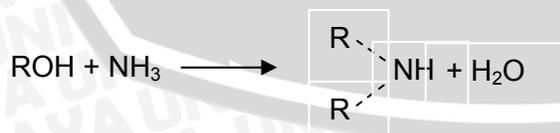
Alkena merupakan kelompok hidrokarbon yang terdiri dari karbon (C) dan hidrogen (H) dengan rumus umum  $C_nH_{2n}$  serta memiliki 1 ikatan rangkap (Wikipedia, 2008). Alkanol merupakan senyawa turunan alkana yang salah satu atom H nya diganti oleh gugus fungsi OH sehingga memiliki rumus struktur R-OH dan rumus umum  $C_nH_{2n+2}O$  (Chemicaland21, 2009). Asam alkanoat atau asam karboksilat merupakan golongan senyawa karbon yang mempunyai gugus fungsional  $-COOH$  terikat langsung pada gugus alkil, sehingga rumus umum asam alkanoat adalah: R-COOH (Riawan, 1990).

Senyawa-senyawa golongan alkena, alkanol dan asam karboksilat diduga memiliki peran sebagai antibakteri. Senyawa alkena memiliki ikatan rangkap dalam struktur molekulnya yang memungkinkan untuk berikatan dengan molekul lain, senyawa alkanol memiliki gugus hidroksil yang dapat menjembatani ikatan hidrofobik dengan hidrofilik, sedangkan senyawa karboksilat memiliki gugus karboksil yang dapat berikatan dengan gugus amina protein. Maryani (2002) menyebutkan pada uji antibakteri akar tanaman akar purwo dengan pelarut fraksi etil asetat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922, senyawa-senyawa yang mampu berperan sebagai antibakteri yang mengandung ikatan rangkap C=C alkena alifatik dan aromatik, gugus C=O karbonil, gugus C-O-C ester, gugus metilen serta gugus metil. Ditambahkan dalam Andriyani, *et al.* (2006), pada analisis senyawa antibakteri dengan spektrofotometri inframerah terhadap serbuk amorf tanaman temu tis yang dimaserasi dengan pelarut n-heksan, senyawa-senyawa antibakteri yang diamati mengandung gugus alkil, aromatik dan alkena.

Suatu asam karboksilat adalah suatu senyawa organik yang mengandung gugus karboksil  $-\text{COOH}$ . Gugus karboksil mengandung gugus karbonil dan sebuah gugus hidroksil; antar aksi dari kedua gugus ini mengakibatkan suatu kereaktifan kimia yang unik dan untuk asam karboksilat (Fessenden, 1997). Senyawa-senyawa yang tergolong dalam asam karboksilat biasa digunakan sebagai bahan pengawet makanan serta pembasmi hama contohnya asam sitrat, asam asetat dan asam format (Catur, 2009). Asam ftalat yang merupakan salah satu senyawa yang teridentifikasi dalam ekstrak *Sargassum cristaefolium* dan telah diteliti aktivitasnya toksisitasnya terhadap tikus yakni memiliki  $\text{LD}_{50}$  sebesar 550 mg/kg (Wikipedia, 2007).

*1-pentadecene* merupakan senyawa golongan alkena yang termasuk salah satu dari 8 komponen utama penyusun senyawa antibakteri yang berhasil teridentifikasi dari ekstrak bunga Legetan. Pada konsentrasi 2,5 10% b/v minyak atsiri bunga Legetan menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri gram positif, sedangkan terhadap bakteri gram negatif aktivitasnya baru muncul pada konsentrasi 15 -30% b/v (Soetjipto, 2008).

Alkohol menurut Pkukmweb (2005) merupakan senyawa kimia yang memiliki gugus fungsi  $-\text{OH}$ . Alkohol dapat dinyatakan dengan rumus  $\text{R-OH}$ , dimana R mewakili rantai karbon. Alkohol dapat bereaksi dengan gugus amina menghasilkan produk pengalkilan sebagai berikut.



Menurut Solis, *et al.* (2004), dinding sel bakteri banyak mengandung asam amino tipe D yakni D-Alanin dan D-Glutamat. Asam amino sendiri merupakan

monomer dari protein yang merupakan salah satu biopolimer penyusun membran lipibilayer sitoplasma bakteri. Asam amino memiliki gugus amina yang bersifat basa dan mampu bereaksi dengan gugus hidroksil. Terikatnya gugus amina pada gugus -OH (hidroksil) senyawa alkohol menyebabkan rusaknya struktur membran sitoplasma yang mengakibatkan kematian bakteri.

Senyawa-senyawa antibakteri diduga memiliki aksi sinergis di dalam penghambatan pertumbuhan bakteri. Senyawa alkanol dan senyawa asam karboksilat memiliki aksi yang khas di dalam penghambatan dimana alkanol bekerja melalui aksi mendenaturasikan protein, merusak membran sel, sarana dehidrasi sel serta aksi detergen atau merupakan penghubung antara ikatan hidrofilik dan hidrofobik. Asam karboksilat bekerja melalui aksi memecah ikatan hidrogen dan mendenaturasikan protein. Tingkat aktivitas germisidal dari alkanol adalah sedang sedangkan asam karboksilat bersifat sedang hingga tinggi. Bila alkanol dikombinasikan dengan asam karboksilat maka aktivitasnya akan meningkat menjadi germisidal tingkat aktivitas tinggi (Pelezar dan Chan, 1988).

Ekstrak *Sargassum cristaefolium* yang diekstrak dengan menggunakan pelarut heksan memiliki aktivitas antibakteri yang berbeda terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus*. Hal ini dapat dilihat dari diameter zona hambatan yang berbeda pada uji cakram. Rata-rata diameter zona hambatan terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 8,18 mm sedangkan pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* adalah 7,73 mm. Dapat dikatakan bahwa ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut heksan lebih efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* daripada menghambat bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

*Escherichia coli* memiliki permeabilitas membran lebih tinggi dari daripada bakteri lain termasuk *Vibrio parahaemolyticus* sehingga memungkinkan dapat

dengan mudah meloloskan difusi pasif dari senyawa antibakteri. Senyawa antibakteri yang bersifat lipofilik dapat dengan mudah merusak atau mengganggu selektivitas membran sel dan akan mengakibatkan kebocoran atau keluarnya organel dari dalam sel dan menyebabkan kematian sel. Oleh karena itu, bakteri *Vibrio parahaemolyticus* lebih tahan terhadap antibiotik daripada *Escherichia coli* karena memiliki permeabilitas membran yang lebih rendah.

Kemampuan antimikroba dalam memberikan penghambatan terhadap mikroorganisme sangat bergantung pada konsentrasi dan kandungan senyawanya. Pada dasarnya mekanisme menghambat mikroorganisme oleh antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya: 1) gangguan pada senyawa penyusun dinding sel; 2) peningkatan permeabilitas membran sel; 3) menginaktivasi enzim; dan 4) kerusakan fungsi material genetik (Ardiansyah, 2007).

Menurut Jawetz (2009), membran luar memiliki saluran khusus, yang terdiri dari molekul protein yang disebut porin, yang dapat meloloskan difusi pasif dari beberapa molekul hidrofilik dengan berat rendah, misalnya gula, asam amino, dan ion tertentu. Molekul antibiotik yang besar menembus membran luar dengan sangat lambat, sehingga bakteri gram negatif relatif sangat tahan terhadap antibiotik. Permeabilitas membran luar bakteri gram negatif sangat bervariasi antara spesies yang satu dengan yang lain; misal membran luar *Pseudomonas aeruginosa*, sangat kebal terhadap bahan antibakteri, mempunyai permeabilitas 100 kali lebih rendah dibanding *Escherichia coli*.

## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Dari ketiga pelarut yakni metanol, aceton, dan heksan, heksan merupakan pelarut yang paling baik digunakan untuk ekstraksi senyawa antibakteri *Sargassum cristaefolium*. Ekstrak *Sargassum cristaefolium* dengan pelarut heksan lebih efektif untuk menghambat bakteri *Escherichia coli* daripada bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Rata-rata diameter zona hambat ekstrak heksan terhadap bakteri *Escherichia coli* adalah 8,18 mm sedangkan rata-rata diameter zona hambat terhadap bakteri *Vibrio parahaemolyticus* adalah 7,73 mm. Dengan metode GC-MS ada 29 jenis senyawa antibakteri yang berhasil diidentifikasi dan diklasifikasikan dalam kelompok alkana, alkena, alkanol dan asam karboksilat berdasarkan ada tidaknya ikatan rangkap dan jenis gugus fungsi. Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri berasal dari golongan alkena, alkanol dan asam karboksilat.

### 5.2 Saran

Disarankan untuk melakukan isolasi terhadap senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak *Sargassum cristaefolium* agar dapat diketahui daya antibakteri dari masing-masing senyawa tersebut.

**Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Media TCBSA****Komposisi Medium TCBSA**

<b>Formula</b>	<b>Gram per liter</b>
Yeast Extract Powder	5
Bacteriological Pepton	10
Sodium thosulphate	10
Sodium Citrat	10
Ox Bile	8
Sucrose	20
Sodium Chloride	10
Ferrc Citrat	1
Bro-thymol blue	0,04
Thymol-blue	0,04
Agar No.1	14

Sumber: Fardiaz (1993)

**Prosedur Pembuatan :**

1. Ditimbang 88 gram bubuk/powder medium TCBSA.
2. Dimasukkan erlemeyer 2 L.
3. Ditambahkan aquades sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter.
4. Dimasukkan dalam *waterbath* suhu 100°C selama 15 menit.
5. Selama pemanasan di *waterbath* sesekali digoyang erlemeyer untuk membantu pelarutan (supaya homogen).
6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlemeyer berarti media telah homogen.
7. Media dituangkan pada cawan steril ±20 ml, tutup cawan dibiarkan sedikit terbuka untuk mengeluarkan uap panas.
8. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas media.
9. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan.

## Lampiran 2. Prosedur Pembuatan Media Tryptone Soya Agar ( TSA )

### Komposisi Medium Tryptone Soya Agar (TSA)

Formula	Gram per liter
Tryptone	15
Soya Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Sumber: Fardiaz (1993)

### Prosedur Pembuatan :

1. Ditimbang 40 gram bubuk/powder medium TSA.
2. Dimasukkan erlemeyer 2 L .
3. Ditambahkan aquades sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter.
4. Dimasukkan dalam *waterbath* suhu 100°C selama 15 menit.
5. Selama pemanasan di *waterbath* sesekali erlemeyer digoyang untuk membantu pelarutan (supaya homogen).
6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlemeyer berarti media telah homogen.
7. Media didinginkan sampai suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$  (hangat-hangat kuku).
8. Tutup cawan dibiarkan sedikit terbuka untuk mengeluarkan uap panas.
9. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas medium.
10. Jika melewati uji sterilitas media sudah siap untuk digunakan.

Lampiran 3. Analisis Keragaman (ANOVA) Uji Cakram Bakteri *Escherichia coli*

1. Data Diameter Zona Bening Antibakteri terhadap *Escherichia coli*

1.1 Hasil Uji Cakram terhadap *Escherichia coli* Secara Duplo

Hasil Uji Cakram Secara Duplo

Perlakuan	Ulangan zona hambat (mm)					
	1		2		3	
	A	B	A	B	A	B
Kontrol metanol	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Kontrol aceton	6,00	6,01	6,00	6,00	6,00	6,00
Kontrol heksana	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Sargassum pengekstrak metanol	6,43	6,37	6,31	6,30	6,33	6,34
Sargassum pengekstrak aceton	6,31	6,29	6,36	6,35	6,28	6,28
Sargassum pengekstrak heksana	8,18	8,19	8,16	8,15	8,18	8,18

1.2 Data Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Rata-Rata Diameter Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	6,01	6,01	6,01	18,03	6,01
B	6,01	6,00	6,00	18,01	6,00
C	6,01	6,01	6,01	18,03	6,01
D	6,40	6,31	6,34	19,05	6,35
E	6,30	6,36	6,28	18,94	6,31
F	8,19	8,16	8,18	24,53	8,18
<b>Total</b>				116,59	

Keterangan:

- A : Kontrol methanol
- B : Kontrol aceton
- C : Kontrol heksana
- D : Sargassum pengekstrak metanol
- E : Sargassum pengekstrak aceton
- F : Sargassum pengekstrak heksana

2. Analisis Sidik Ragam (ANOVA)

2.1 Hipotesis :

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6 = 0$$

$H_1$  = paling tidak ada sepasang  $T_i$  nilai tengah) yang tidak sama

$f_{hitung} < f_{0,05(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_0$  ; tidak ada perbedaan sepasang  $T_i$  (tidak berbeda nyata)

$f_{0,05(n-1)} < f_{hitung} < f_{0,01(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_1$  dan tolak  $H_0$  ; perbedaan sepasang  $T_i$  nyata

$f_{hitung} > f_{0,01(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_1$ ; perbedaan sepasang  $T_i$  sangat nyata

## 2.2 Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

### 2.2.1 Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\sigma^2}{rn} = \frac{(116,59)^2}{3 \times 6} = \frac{13.593.2281}{9} = 755,1793389$$

### 2.2.2 Jumlah Kuadrat Total (JK Total)

$$\begin{aligned} JK \text{ Total} &= (6,01^2 + 6,01^2 + 6,01^2 + \dots + 8,18^2) - FK \\ &= 765,96450 - 755,1793389 \\ &= 10,7851611 \end{aligned}$$

### 2.2.3 Jumlah Kuadrat Perlakuan (JK Perlakuan)

$$\begin{aligned} JK \text{ Perlakuan} &= \frac{(18,03^2 + 18,01^2 + 18,03^2 + 19,05^2 + 18,94^2 + 24,53^2)}{3} - FK \\ &= 765,956300 - 755,1793389 \\ &= 10,7769611 \end{aligned}$$

### 2.2.4 Jumlah Kuadrat Galat (JK Galat)

$$\begin{aligned} JK \text{ Galat} &= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan} \\ &= 10,7851611 - 10,7769611 \\ &= 0,0082 \end{aligned}$$

### 2.3 Analysis of variance (ANOVA)

#### ANOVA Daya Hambat Antibakteri Terhadap *Escherichia coli*

Sumber Keragaman (SK)	Derajat bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	KT ((JK/db)	Fhit	F 5 %	F 1%
Perlakuan	5	10,7769611	2,1553922	3.154,39**	3,11	5,06
Galat	12	0,0082	0,0006833			
Total	17	10,7851611				

Kesimpulan :  $f_{hitung} > f_{0,01(n-1)}$  → terima  $H_1$ ; perbedaan sepasang  $T_i$  sangat nyata

### 2.4 Interpretasi

Ekstrak antibakteri *Sargassum* memiliki daya hambat yang lebih besar terhadap aktivitas pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli* dibandingkan dengan kontrol pelarut pengekstraknya masing-masing. Penggunaan pelarut yang berbeda berpengaruh terhadap efektifitas proses ekstraksi antibakteri dari rumput laut *Sargassum cristaefolium*. Perbedaan efektifitas ekstraksi antibakteri yang dipengaruhi oleh perbedaan polaritas pelarut mempengaruhi lebar diameter penghambatan (zona hambat) pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli*.

## 3. Menentukan Jenis Pelarut yang Paling Potensial (Uji BNJ 5%)

### 3.1 Perhitungan BNJ 5%

$$BNJ_a = Q_{\alpha(p; db\ galat)} \times \sqrt{\frac{2KT\ Galat}{ulangan}}$$

$$BNJ_{0,05} = Q_{0,05(6;12)} \times \sqrt{\frac{0,0006833}{3}}$$

$$= 4,75 \times 0,01509$$

$$= 0,0717$$

3.2 Notasi BNJ 5%

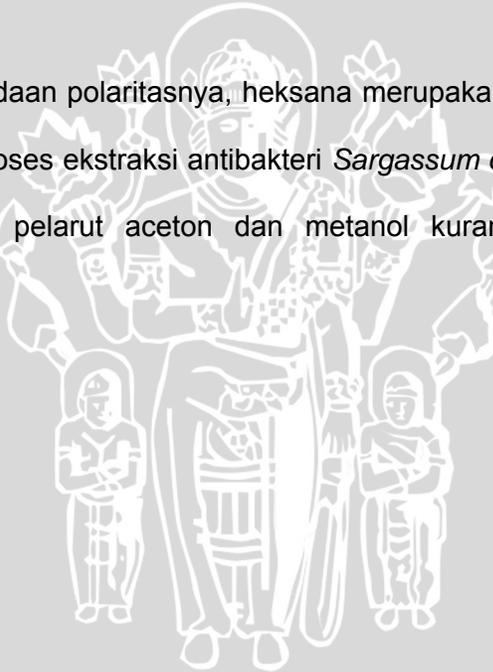
Tabel. Kolom Notasi BNJ 5%

Rata-rata Diameter	B (6,00)	A (6,01)	C (6,01)	E (6,31)	D (6,35)	F (8,18)
B (6,00)	-	-	-	-	-	-
A (6,01)	0,01	-	-	-	-	-
C (6,01)	0,01	-	-	-	-	-
E (6,31)	0,31*	0,30*	0,30*	-	-	-
D (6,35)	0,35*	0,34*	0,34*	0,04	-	-
F (8,18)	2,18*	2,17*	2,17*	1,87*	1,83*	-
Notasi BNT <sub>0,05</sub> = 0,07	a	a	a	b	b	c

Ket: \* = selisih sepasang nilai tengah > BNJ<sub>0,05</sub>

4. Kesimpulan

Berdasarkan perbedaan polaritasnya, heksana merupakan pelarut yang paling baik digunakan dalam proses ekstraksi antibakteri *Sargassum cristaefolium*. Sampel yang diekstrak dengan pelarut aceton dan metanol kurang memiliki aktifitas antibakteri.



Lampiran 4. Analisis Keragaman (ANOVA) Uji Cakram *Vibrio parahaemolyticus*

1. Data Diameter Zona Bening Antibakteri terhadap *Vibrio parahaemolyticus*

1.1 Hasil Uji Cakram *Vibrio parahaemolyticus* Secara Duplo

Hasil Uji Cakram Secara Duplo

Perlakuan	Ulangan zona hambat (mm)					
	1		2		3	
	A	B	A	B	A	B
Kontrol metanol	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Kontrol acetone	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Kontrol heksana	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01	6,01
Sargassum pengekstrak metanol	6,12	6,13	6,24	6,20	6,39	6,38
Sargassum pengekstrak acetone	6,45	6,49	6,40	6,41	6,36	6,39
Sargassum pengekstrak heksana	7,83	7,79	7,86	7,83	7,51	7,53

1.2 Data Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Rata-Rata Diameter Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
A	6,01	6,01	6,01	18,03	6,01
B	6,01	6,01	6,01	18,03	6,01
C	6,01	6,01	6,01	18,03	6,01
D	6,13	6,22	6,39	18,74	6,25
E	6,47	6,41	6,38	19,26	6,42
F	7,81	7,85	7,52	23,18	7,73
<b>Total</b>				<b>115,27</b>	

Keterangan:

- A : Kontrol methanol
- B : Kontrol acetone
- C : Kontrol heksana
- D : Sargassum pengekstrak metanol
- E : Sargassum pengekstrak acetone
- F : Sargassum pengekstrak heksana

2. Analisis Sidik Ragam (ANOVA)

2.1 Hipotesis :

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 = T_6 = 0$$

$H_1$  = paling tidak ada sepasang  $T_i$  nilai tengah) yang tidak sama

$f_{hitung} < f_{0,05(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_0$  ; tidak ada perbedaan sepasang  $T_i$  (tidak berbeda nyata)

$f_{0,05(n-1)} < f_{hitung} < f_{0,01(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_1$  dan tolak  $H_0$  ; perbedaan sepasang  $T_i$  nyata

$f_{hitung} > f_{0,01(n-1)} \longrightarrow$  terima  $H_1$ ; perbedaan sepasang  $T_i$  sangat nyata

## 2.2 Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

### 2.2.1 Faktor Koreksi (FK)

$$FK = \frac{\sigma^2}{rn} = \frac{(115,27)^2}{3 \times 6} = \frac{13.287,1729}{18} = 738,1762722$$

### 2.2.2 Jumlah Kuadrat Total (JK Total)

$$\begin{aligned} JK \text{ Total} &= (6,01^2 + 6,01^2 + 6,01^2 + \dots + 7,52^2) - FK \\ &= 745,0007 - 738,1762722 \\ &= 6,8244278 \end{aligned}$$

### 2.2.3 Jumlah Kuadrat Perlakuan (JK Perlakuan)

$$\begin{aligned} JK \text{ Perlakuan} &= \frac{(18,03^2 + 18,03^2 + 18,03^2 + 18,74^2 + 19,26^2 + 23,18^2)}{3} - FK \\ &= 744,8967667 - 738,1762722 \\ &= 6,7204945 \end{aligned}$$

### 2.2.4 Jumlah Kuadrat Galat (JK Galat)

$$\begin{aligned} JK \text{ Galat} &= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan} \\ &= 6,8244278 - 6,7204945 \\ &= 0,1039333 \end{aligned}$$

### 2.3 Analysis of variance (ANOVA)

#### ANOVA Daya Hambat Antibakteri Terhadap *Vibrio parahaemolyticus*

Sumber Keragaman (SK)	Derajat bebas (db)	Jumlah Kuadrat (JK)	KT ((JK/db)	Fhit	F 5 %	F 1%
Perlakuan	5	6,7204945	1,3440989	155,19**	3,11	5,06
Galat	12	0,1039333	0,0086611			
Total	17	6,8244278				

Kesimpulan :  $f_{hitung} > f_{0,01(n-1)}$  → terima  $H_1$ ; perbedaan sepasang  $T_i$  sangat nyata

### 2.4 Interpretasi

Ekstrak antibakteri *Sargassum* memiliki daya hambat yang lebih besar terhadap aktivitas pertumbuhan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus* dibandingkan dengan kontrol pelarut pengekstraknya masing-masing. Penggunaan pelarut yang berbeda berpengaruh terhadap efektifitas proses ekstraksi antibakteri dari rumput laut *Sargassum cristaefolium*. Perbedaan efektifitas ekstraksi antibakteri yang dipengaruhi oleh perbedaan polaritas pelarut mempengaruhi lebar diameter penghambatan (zona hambat) pertumbuhan bakteri uji *Vibrio parahaemolyticus*.

### 3. Menentukan Jenis Pelarut yang Paling Potensial (Uji BNJ5 %)

#### 3.1 Perhitungan BNJ 5%

$$BNJ_a = Q_{a(p; db\ galat)} \times \sqrt{\frac{2KT\ Galat}{ulangan}}$$

$$BNJ_{0,05} = Q_{0,05(6;12)} \times \sqrt{\frac{0,0086611}{3}}$$

$$= 4,75 \times 0,05373$$

$$= 0,2552$$

## 3.1.2 Notasi BNJ 5%

## Kolom Notasi BNJ 5%

Rata-rata diameter	A (6,01)	B (6,01)	C (6,01)	D (6,25)	E (6,42)	F (7,73)
A (6,01)	-	-	-	-	-	-
B (6,01)	-	-	-	-	-	-
C (6,01)	-	-	-	-	-	-
D (6,25)	0,24*	0,24*	0,24*	-	-	-
E (6,42)	0,41*	0,41*	0,41*	0,17*	-	-
F (7,73)	1,72*	1,72*	1,72*	1,48*	1,31*	-
Notasi BNT <sub>0,05</sub> = 0,17	a	a	a	b	c	d

Ket: \* = selisih sepasang nilai tengah > BNJ<sub>0,05</sub>

## 4. Kesimpulan

Berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan, pelarut yang paling baik digunakan untuk ekstraksi antibakteri. *Sargassum cristaefolium* adalah heksana yang bersifat non polar, kemudian acetone yang bersifat semi polar, dan yang paling buruk adalah metanol yang bersifat polar. Semakin meningkat kepolaran, semakin banyak komponen bioaktif yang bersifat antibakteria yang berhasil diekstrak. Heksana merupakan pelarut yang paling baik digunakan dalam proses ekstraksi. Sampel yang diekstrak dengan pelarut acetone dan metanol kurang memiliki aktifitas antibakteri.

### Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian



1. *Sargassum cristaefolium* segar



2. Pencucian dengan larutan garam 5%



3. *Sargassum cristaefolium* diangin-anginkan



4. *Sargassum cristaefolium* dipotong kecil-kecil



5. *Sargassum cristaefolium* direndam dengan heksan, acetone dan metanol teknis 96%



6. Sampel dimaserasi dalam inkubator oven (ruang gelap) suhu 40°C



7. Penyaringan ekstrak



8. Pemisahan pelarut dengan *vacuum rotary evaporator*



9. Ekstrak heksan (kanan), aceton (tengah) dan mehanol (kiri)



10. Uji GC-MS ekstrak yang dimaserasi dengan heksan teknis 96%