

**UJI EKSTRAK SPONGE *Haliclona* sp. SEBAGAI
ANTI *Escherichia coli* DAN IDENTIFIKASI
SENYAWA AKTIFNYA**

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

Oleh :
**RIMA ANGGRENI SUPRYANTI
NIM. 0610830076**



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

**UJI EKSTRAK SPONGE *Haliclona* sp. SEBAGAI
ANTI *Escherichia coli* DAN IDENTIFIKASI
SENYAWA AKTIFNYA**

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

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana

Oleh :
RIMA ANGGRENI SUPRYANTI
NIM. 0610830076



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

UJI EKSTRAK SPONGE *Haliclona* sp. SEBAGAI
ANTI *Escherichia coli* DAN IDENTIFIKASI
SENYAWA AKTIFNYA

SKRIPSI
TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN

Oleh:
RIMA ANGGRENI SUPRYANTI
NIM. 0610830076

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 8 Desember 2010 dan
dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I

Ir. Kartini Zaelani, MS
NIP. 19550503 198503 2 001
Tanggal: _____

Dosen Pembimbing I

Ir. Darius, M. Biotech
NIP. 19500531 198103 1 003
Tanggal: _____

Dosen Penguji II

Rahmi Nurdiani, S.Pi.M.App.Sc
NIP. 19761116 200112 2 001
Tanggal: _____

Dosen Pembimbing II

Ir. Muhamad Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: _____

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

RINGKASAN

RIMA ANGGRENI SUPRYANTI. Uji Ekstrak Sponge *Haliclona sp.* sebagai Anti *Escherichia coli* dan Identifikasi Senyawa Aktifnya. (Dibawah bimbingan Ir. Darius, M. Biotech dan Ir. Muhamad Firdaus, MP)

Sponge merupakan salah satu jenis invertebrata dari filum Porifera yang mempunyai potensi menghasilkan bioaktif. Ekstrak metabolit dari sponge mengandung senyawa bioaktif yang diketahui mempunyai sifat aktifitas seperti: sitotoksik, antitumor, antivirus, anti HIV, antiinflamasi, antifungi, antileukimia, penghambat aktivitas enzim dan antibakteri. Sponge laut yang telah diisolasi senyawa antibakterinya adalah: *Discodermia kiiensis*, *Cliona celata*, *lanthella basta*, *lanthellcr ardis*, *Psammaphysila purpurea*, *Phakelia .flabellata*. Penelitian sebelumnya mengenai sponge *Haliclona sp.* menunjukkan aktivitas yang menghambat *Candida albicans* dengan konsentrasi daya hambat minimal atau MIC 7,8 µg/mL. Saat ini banyak terjadi kasus keracunan makanan yang disebabkan oleh kontaminasi bakteri, salah satunya yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. *Escherichia coli* terdapat secara normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Suatu serotipe tertentu bersifat enteropathogenik dan dikenal sebagai penyebab diare pada bayi. Untuk mengekstrak senyawa aktif antibakteri yang berada dalam sponge dibutuhkan pelarut yang membantu pemisahan komponen dari bahan asalnya. Ekstraksi dipengaruhi beberapa faktor antara lain waktu ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut. Sehingga dibutuhkan jenis pelarut yang sesuai dan selanjutnya digunakan untuk mengetahui keefektifan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mengetahui pengaruh jenis pelarut yang paling efektif untuk mengekstrak komponen aktif antibakteri sponge yang memiliki konsentrasi hambat minimal terhadap bakteri *Escherichia coli* serta mengidentifikasi struktur senyawa ekstrak sponge .

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang serta Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada, Yogyakarta Pada bulan April-Juli 2010.

Tahap pertama penelitian ini digunakan metode eksperimen. Penelitian tahap pertama bertujuan untuk mengetahui konsentrasi paling efektif antibakteri ekstrak sponge *Haliclona sp.* terhadap *E. coli* Rancangan penelitian dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap faktorial. Metode analisa data menggunakan Analisis Sidik Ragam (ANOVA). Parameter yang diamati adalah diameter zona hambat dari hasil uji cakram. Tahap kedua penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Tujuan penelitian tahap dua adalah untuk mengidentifikasi komponen bioaktif yang terkandung dalam sponge *Haliclona sp.* dengan menggunakan metode Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS).

Dari hasil penelitian, ekstrak kloroform sponge *Haliclona sp.* memiliki MIC 50% terhadap bakteri *E. coli* sebesar 715,76 ppm. Hasil analisis GC-MS, diidentifikasi 29 senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada *Haliclona sp*, 3 yang paling dominan adalah Asam Heksadekanoat, 26,27-Dinorergosta-5,23-dien-3-ol dan Ergosta-7,22-dien-3-ol.

Ekstrak sponge *Haliclona sp.* yang diekstraksi dengan kloroform terbukti dapat menghambat *E. coli*. Sehubungan dengan hal tersebut maka disarankan penelitian lebih lanjut mengenai masing-masing senyawa aktif ekstrak kloroform sponge *Haliclona sp* sebagai penghambat *E. coli*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat serta hidayah-nya sehingga penulis dapat menyelesaikan kegiatan penelitian dan penulisan skripsi dengan judul “Uji Ekstrak Sponge Haliclona sp. sebagai Anti *Escherechia coli* dan Identifikasi Senyawa Aktifnya”, untuk memperoleh gelar sarjana stara 1 pada Program Studi Teknologi Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

Segala kekurangan dan dan kealpaan dalam penyusunan skripsi ini adalah semata-mata karena kekhilafan penulis dan kelebihan yang ada hanya dari-Nya. Terima kasih untuk semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikannya skripsi ini dengan baik, antara lain:

1. Ir. Darius, M. Biotech dan Ir. Muhamad Firdaus, MP selaku dosen pembimbing atas bimbingan dan kesempatan yang diberikan.
2. Ir. Kartini Zaelani, MS dan Rahmi Nurdiani, S.Pi.M.App.Sc, selaku dosen penguji atas masukan yang diberikan.
3. Orang tua terkasih dan saudara beserta keluarga tersayang yang selalu mendoakan dan mendukung.
4. Saudara di HMI Perikanan tercinta dan sahabat seperjuangan di program studi Teknologi Hasil Perikanan, khususnya angkatan 2006.
5. Semua pihak yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan dan penyelesaian laporan ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Malang, Desember 2010

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

| | |
|---|------------|
| RINGKASAN | i |
| KATA PENGANTAR | ii |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR GAMBAR | iv |
| DAFTAR TABEL | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | vii |
| | |
| 1. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 4 |
| 1.4 Hipotesis | 4 |
| 1.5 Kegunaan Penelitian | 5 |
| 1.6 Tempat dan Waktu | 5 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | 6 |
| 2.1 Gambaran Umum Sponge..... | 6 |
| 2.1.1 Morfologi Sponge | 6 |
| 2.1.2 Sistem Pencernaan | 8 |
| 2.1.3 Sistem Pernapasan | 8 |
| 2.1.4 Reproduksi | 8 |
| 2.1.5 Budidaya Spoge | 8 |
| 2.2 Klasifikasi Sponge..... | 10 |
| 2.3 <i>Haliclona</i> sp. | 12 |
| 2.4 Antibakteri | 13 |
| 2.4.1 Antibakteri dan Mekanisme Kerja Antibakteri | 13 |
| 2.4.2 Senyawa Aktif Antibakteri dari Sponge..... | 15 |
| 2.5 <i>Echerichia coli</i> | 17 |
| 2.5.1 Morfologi dan Klasifikasi | 17 |
| 2.5.2 Infeksi Klinis dari <i>Escherichia coli</i> | 18 |
| 2.5.3 <i>Escherichia coli</i> dalam Bahaan Pangan..... | 20 |
| 2.6 Ekstraksi Komponen Aktif | 22 |
| 2.7 Pelarut | 24 |
| 2.7.1 Kloroform..... | 27 |

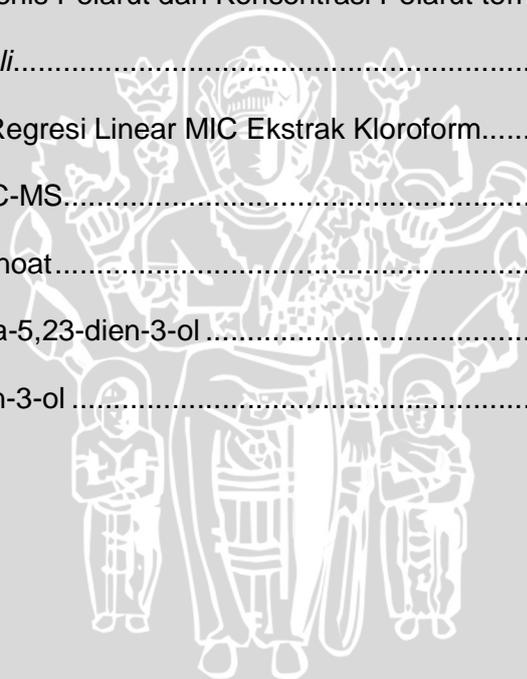


| | |
|---|-----------|
| 2.7.2 Etil Asetat | 27 |
| 2.7.3 Metanol | 29 |
| 2.8 GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry) | 30 |
| 2.8.1 Prinsip Kromatografi Gas (GC) | 31 |
| 2.8.2 Spektrometri Massa | 35 |
| 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN | 36 |
| 3.1 Materi Penelitian | 36 |
| 3.1.1 Bahan Penelitian | 36 |
| 3.1.2 Alat Penelitian | 36 |
| 3.2 Metode Penelitian | 37 |
| 3.2.1 Metode Eksperimen..... | 37 |
| 3.2.2 Metode Deskriptif | 37 |
| 3.2.3 Variabel Penelitian | 38 |
| 3.2.4 Rancangan Penelitian | 39 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 39 |
| 3.3.1 Pembuatan Ekstrak Sponge..... | 39 |
| 3.3.2 Pembuatan Media | 40 |
| 3.3.3 Uji Cakram | 41 |
| 3.3.4 Analisis GC-MS | 42 |
| 3.4 Skema Kerja Penelitian..... | 43 |
| 3.5 Parameter Uji | 43 |
| 3.6 Analisis Data..... | 43 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 44 |
| 4.1 Hasil Ekstraksi Sponge Laut(<i>Haliclona</i> sp.)..... | 44 |
| 4.2 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Sponge <i>Haliclona</i> sp..... | 46 |
| 4.2.1 Pengaruh Jenis Pelarut | 46 |
| 4.2.2 Pengaruh Konsentrasi Ekstrak | 47 |
| 4.2.3 Nilai <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)..... | 48 |
| 4.3 Analisis GCMS | 50 |
| 5. PENUTUP | 54 |
| 5.1 Kesimpulan | 54 |
| 5.2 Saran | 54 |

DAFTAR PUSTAKA

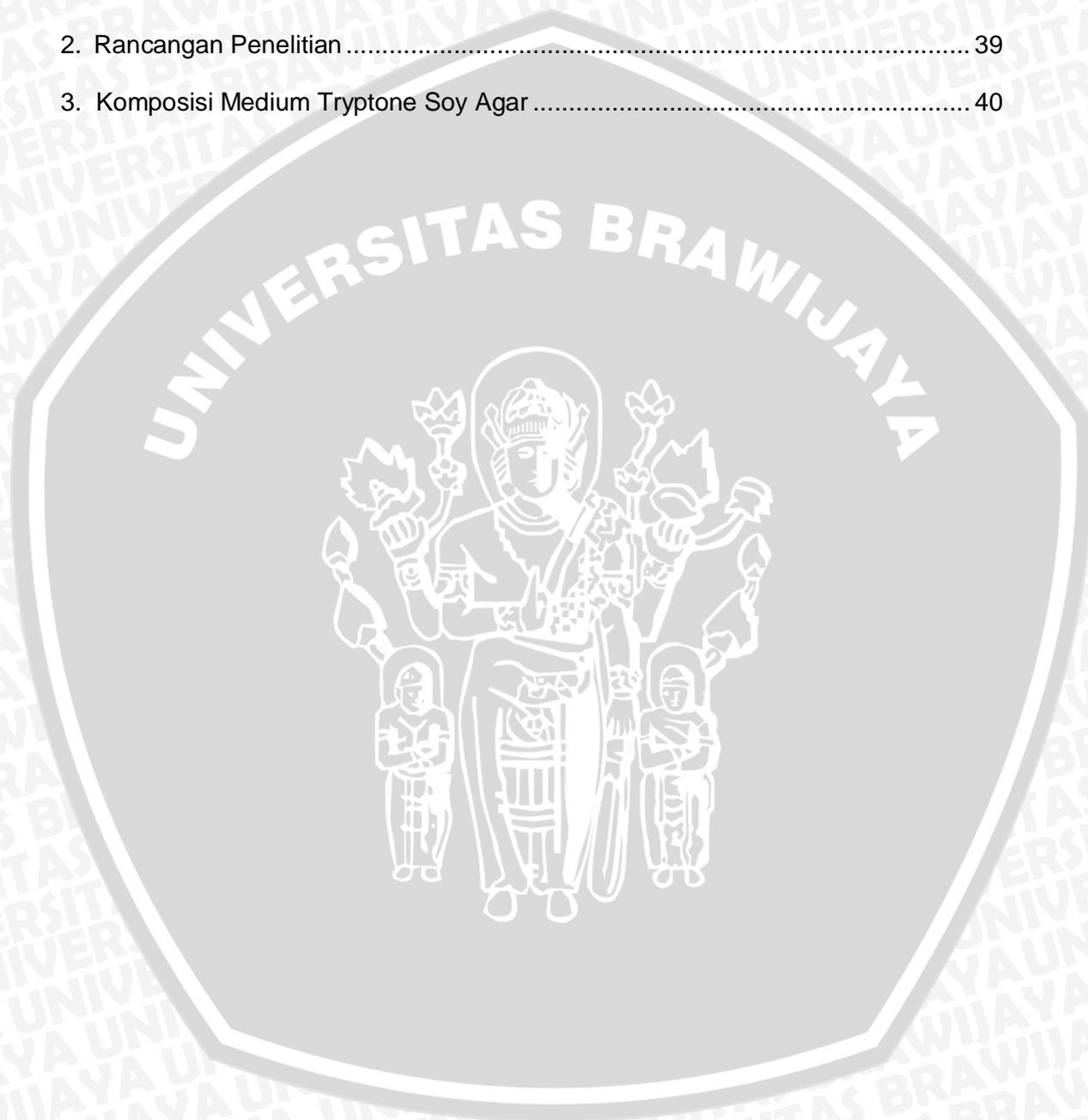
DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. <i>Haliclona</i> sp..... | 13 |
| 2. Bentuk <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| 3. Kromatografi Gas | 32 |
| 4. Hasil Ekstraksi Sponge <i>Haliclona</i> sp..... | 44 |
| 5. Grafik Rendemen Hasil Ekstraksi Sponge | 45 |
| 6 Foto Hasil Uji Cakram dari Ekstrak Sponge <i>Haliclona</i> sp..... | 46 |
| 7. Grafik Kombinasi Jenis Pelarut dan Konsentrasi Pelarut terhadap Diameter Zona Hambat <i>E. coli</i> | 47 |
| 8. Grafik Persamaan Regresi Linear MIC Ekstrak Kloroform..... | 49 |
| 9. Hasil Analisis Uji GC-MS..... | 50 |
| 10. Asam Heksadekanoat..... | 52 |
| 11 26,27-Dinorergosta-5,23-dien-3-ol | 52 |
| 12. Ergosta-7.22-0dien-3-ol | 53 |



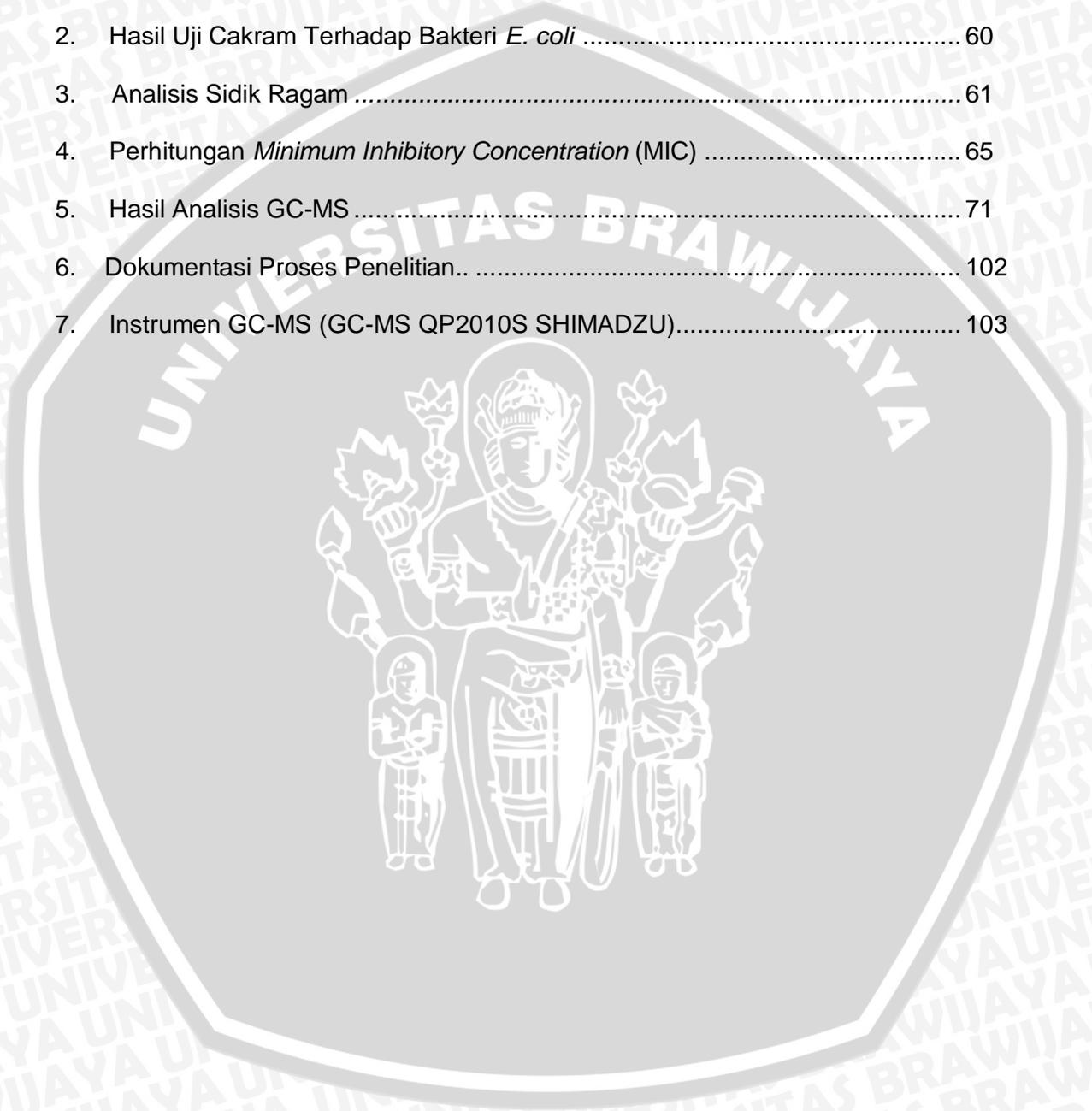
DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|---|---------|
| 1. Sifat-Sifat Pelarut Umum..... | 26 |
| 2. Rancangan Penelitian | 39 |
| 3. Komposisi Medium Tryptone Soy Agar | 40 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Hasil Ekstraksi dan Pemekatan dengan Rotary evaporator..... | 59 |
| 2. Hasil Uji Cakram Terhadap Bakteri <i>E. coli</i> | 60 |
| 3. Analisis Sidik Ragam | 61 |
| 4. Perhitungan <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) | 65 |
| 5. Hasil Analisis GC-MS | 71 |
| 6. Dokumentasi Proses Penelitian.. .. | 102 |
| 7. Instrumen GC-MS (GC-MS QP2010S SHIMADZU)..... | 103 |



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sebagai negara kepulauan yang besar di dunia yang memiliki wilayah laut sangat luas, dua pertiganya merupakan wilayah laut. Indonesia memiliki sumberdaya alam hayati laut yang besar. Salah satu sumber daya alam tersebut adalah ekosistem terumbu karang. Ekosistem terumbu karang merupakan bagian dari ekosistem laut yang menjadi sumber kehidupan bagi beraneka ragam biota laut. Di dalam ekosistem terumbu karang bisa hidup lebih dari 300 jenis karang, lebih dari 200 jenis ikan dan berpuluh-puluh jenis moluska, krustasea, sponge, algae, lamun dan biota lainnya (Suparno, 2005).

Biota laut (*marine organism*) merupakan sumber bahan alam yang sangat kaya dengan aktivitas biologi yang unik. Beberapa diantaranya mempunyai aktivitas antifungi dan antitumor. Disamping itu ada juga yang mempunyai aktivitas sebagai stimulan kekebalan dan penghambat enzim tertentu. Selama 30 tahun terakhir, lebih dari 7000 senyawa aktif berhasil diisolasi dari biota laut dan digunakan sebagai rujukan dalam pengembangan obat baru (Edrada, 2000).

Sponge merupakan jenis hewan laut yang hidup pada lingkungan terumbu karang. Diperkirakan terdapat lebih dari 5000 spesies yang terdapat di alam dan dibagi atas tiga kelas yaitu Calcarea, Demospongia, dan Hexatipellida. Di Indonesia jenis-jenis sponge yang ditemukan 90 % dari Demospongia (Satari dan Kadi, 1994).

Beberapa jenis sponge diketahui memiliki senyawa bioaktif, antara lain: *Hyatella intestinalis*, *Algilus flabellifilus*, *Hipospongia comunis*, *Spongia offisinalis*, *Ircina virabilis*, *Spongia oracillis*, *Dysidea avara*, *Erylus cendevelidi*, dan *Dyctionella insica*, sehingga dapat dimanfaatkan dalam bidang farmasi untuk mengobati penyakit pada manusia dan hewan (Suharyanto, 2008).

Dewasa ini banyak sekali penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang terdapat dalam bahan pangan. Salah satunya adalah *Escherichia coli*. *Escherichia coli* terdapat secara normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Suatu serotipe tertentu bersifat enteropathogenik dan dikenal sebagai penyebab diare pada bayi. Beberapa galur lainnya juga sebagai penyebab diare pada orang dewasa. Organisme ini berada di dapur dan tempat-tempat persiapan bahan pangan melalui bahan baku dan selanjutnya masuk ke makanan yang telah dimasak melalui tangan, permukaan alat-alat, tempat-tempat masakan dan peralatan lain. Masa inkubasi adalah 1-3 hari dan gejala-gejalanya menyerupai gejala-gejala keracunan bahan pangan yang tercemar oleh *Salmonella* atau disentri (Buckle, *et al.*, 2007).

Sponge laut yang telah diisolasi senyawa antibakterinya adalah: *Discodermia kiiensis*, *Cliona celata*, *Lanthella basta*, *Lanlhellcr ardis*, *Psammaphysila purpurea*, *Phakelia flabellata* (Suparno, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Ahmad, *et al.*, (1995) menunjukkan bahwa hasil pengujian bioaktif sponge terhadap bakteri memberikan respon yang sama dengan jenis bakterisida komersial, bahkan dengan dosis yang lebih rendah, yakni: 20-40 ppm, sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisida komersial umumnya membutuhkan kadar 100 ppm untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian Handayani, *et al.*, (2008) menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimal dari sponge antara 100 ppm sampai 1000 ppm.

Untuk mengekstrak senyawa aktif yang berada dalam sponge dibutuhkan pelarut yang membantu pemisahan komponen dari bahan asalnya. Sehingga dibutuhkan jenis pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolaran komponen yang diinginkan. Jenis pelarut juga sangat mempengaruhi efisiensi hasil ekstrak yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui keefektifan dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Dari hasil pengambilan sampel sponge laut yang dilakukan di perairan pulau Gili Kabupaten Probolinggo ditemukan sponge sebagai salah satu spesies dari ordo *Haplosclerida* dan genus *Haliclona* yaitu *Haliclona* sp. Pengambilan sampel jenis *Haliclona* sp. dikarenakan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Lakshmi, *et al.*, (2010) menunjukkan bahwa sponge jenis *Haliclona* sp. mempunyai kemampuan sebagai antimikroba *Candida albicans* dengan konsentrasi minimal menghambat atau MIC 7,8 µg/mL. Oleh karena itu dilakukan penelitian kemampuan sponge jenis *Haliclona* sp. sebagai anti *E. coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Sponge merupakan salah satu jenis invertebrata dari filum Porifera yang mempunyai potensi menghasilkan bioaktif. Ekstrak metabolit dari sponge mengandung senyawa bioaktif yang diketahui mempunyai sifat aktifitas seperti: sitotoksik, antitumor, antivirus, anti HIV, antiinflamasi, antifungi, antileukimia, penghambat aktivitas enzim dan antibakteri. Sponge laut yang telah diisolasi senyawa antibakterinya adalah: *Discodermia kiiensis*, *Cliona celata*, *lanthella basta*, *lanhellcr ardis*, *Psammaplysila purpurea*, *Phakelia .flabellata*. Penelitian sebelumnya mengenai sponge *Haliclona* sp. menunjukkan aktivitas yang menghambat *Candida albicans* dengan konsentrasi daya hambat minimal atau MIC 7,8 µg/mL.

Saat ini banyak terjadi kasus keracunan makanan yang disebabkan oleh kontaminasi bakteri, salah satunya yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. *Escherichia coli* terdapat secara normal dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. Suatu serotipe tertentu bersifat enteropathogenik dan dikenal sebagai penyebab diare pada bayi. Beberapa galur lainnya juga sebagai penyebab diare pada orang dewasa. Organisme ini berada di dapur dan tempat-tempat persiapan bahan pangan melalui bahan baku dan selanjutnya masuk ke

makanan yang telah dimasak melalui tangan, permukaan alat-alat, tempat-tempat masakan dan peralatan lain.

Untuk mengekstrak senyawa aktif antibakteri yang berada dalam sponge dibutuhkan pelarut yang membantu pemisahan komponen dari bahan asalnya. Ekstraksi dipengaruhi beberapa faktor antara lain waktu ekstraksi, suhu, dan jenis pelarut. Sehingga dibutuhkan jenis pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolaran komponen yang diinginkan. Jenis pelarut juga sangat mempengaruhi efisiensi hasil ekstrak yang selanjutnya digunakan untuk mengetahui keefektifan dalam menghambat pertumbuhan bakteri terutama bakteri patogen penyebab penyakit yang mencemari bahan pangan seperti bakteri *Escherichia coli*.

Oleh karena itu diperlukan penelitian untuk mengetahui konsentrasi hambat minimal terhadap bakteri *Escherichia coli* serta mengidentifikasi senyawa aktif dalam ekstrak sponge *Haliclona* sp. yang diduga sebagai anti *E. coli*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian yang dilakukan adalah untuk:

1. Mendapatkan konsentrasi minimal hambat (MIC) dari ekstrak sponge *Haliclona* sp. terhadap *Escherichia coli*.
2. Mengidentifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak sponge *Haliclona* sp. sebagai anti *E. coli*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

- H₀ : - Diduga ekstrak sponge *Haliclona* sp. tidak memiliki konsentrasi minimal hambat (MIC) terhadap *Escherichia coli*
- Diduga ekstrak sponge *Haliclona* sp. tidak mengandung senyawa aktif tertentu sebagai anti *E. coli*.

- H1 : - Diduga ekstrak sponge *Haliclona sp.* memiliki konsentrasi minimal hambat (MIC) terhadap *Escherichia coli*
- Diduga ekstrak sponge *Haliclona sp.* mengandung senyawa aktif tertentu sebagai anti *E. coli*.

1.5 Kegunaan Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan:

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

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Fakultas MIPA Universitas Gajah Mada Yogyakarta pada bulan April 2010 – Juli 2010.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Gambaran Umum Sponge (Porifera)

Sponge merupakan binatang multiseluler (bersel banyak) yang paling primitif. Meskipun tubuhnya sudah tersusun dari banyak sel tetapi jaringan tubuhnya masih sederhana dan belum mempunyai organ tubuh maupun saluran pencernaan makanan dan belum mempunyai sistem syaraf. Bentuk tubuhnya antara lain silindris, pipih, globular, dan seperti vas bunga. Pada tubuhnya terdapat sejumlah rongga yang disebut ostea. Pola pertumbuhan sponge dipengaruhi oleh substrat, kecepatan arus air dan gelombang. Sponge dewasa hidup di daerah pantai dan melekat pada substrat, sedangkan pada waktu masih embrio bersilia dan berenang bebas. Warna tubuhnya kelabu, merah, orange, biru, violet, dan ada pula yang hitam (Wijarni dan Arfiani, 1984).

2.1.1 Morfologi Sponge

Morfologi luar sponge laut sangat dipengaruhi oleh faktor fisik, kimiawi, dan biologis lingkungannya. Spesimen yang berada di lingkungan yang terbuka dan berombak besar cenderung pendek pertumbuhannya atau juga merambat. Sebaliknya spesimen dari jenis yang sama pada lingkungan yang terlindung atau pada perairan yang lebih dalam dan berarus tenang, pertumbuhannya cenderung tegak dan tinggi. Pada perairan yang lebih dalam sponge cenderung memiliki tubuh yang lebih simetris dan lebih besar sebagai akibat dari lingkungan yang lebih stabil apabila dibandingkan dengan jenis yang sama yang hidup pada perairan yang dangkal. Sponge dapat berbentuk sederhana seperti tabung dengan dinding tipis, atau masif bentuknya dan agak tidak teratur. Banyak sponge juga terdiri dari segumpal jaringan yang tak tentu bentuknya, menempel dan membuat kerak pada batu, cangkang, tonggak, atau tumbuh-tumbuhan.

Kelompok sponge lain mempunyai bentuk lebih teratur dan melekat pada dasar perairan melalui sekumpulan spikula. Bentuk-bentuk yang dimiliki sponge dapat beragam. Beberapa jenis bercabang seperti pohon, lainnya berbentuk seperti sarung tinju, seperti cawan atau seperti kubah. Ukuran sponge juga beragam, mulai dari jenis berukuran sebesar kepala jarum pentul, sampai ke jenis yang ukuran garis tengahnya 0,9 m dan tebalnya 30,5 cm. Jenis-jenis sponge tertentu nampak berbulu getar karena spikulanya menyembul keluar dari badannya (Suparno, 2005).

Menurut Wijarni dan Afriani (1984), ciri khusus binatang ini adalah dinding tubuhnya dilenkap dengan pori-pori dan kanal sistem. Kerangka tubuhnya berupa spikula-spikula atau berupa spogin. Di bagian tengah tubuhnya terdapat rongga sentral yang disebut spongocoel. Daria arah spongocoel ini terdapat lubang keluar yang terletak di bagian ujung atas tubuhnya yang disebut osculum.

Dinding tubuhnya terdiri dari dua lapisan yaitu lapisan luar disebut epidermis yang disusun oleh sel-sel dermal epithelium, dan lapisan dalam disusun oleh sel-sel *choanocyte* yang masing-masing dilengkapi dengan flagelum. Di antara kedua lapisan tersebut terdapat zat antara yang berupa gelatin yang disebut *mesenchime* atau *mesoglea*. Di dalam *mesenchime* tersebut terdapat sel amoebosit, yaitu *porocyte* yang terletak di sekitar pori, *scleroblast* yang membentuk spikula dan *archoocyte* yang merupakan sel *amoebocyte* embrional dan pseopodia yang tumpul dan dapat membentuk sel-sel lainnya seperti sel-sel reproduktif.

Disamping itu, untuk menunjang tubuhnya yang lunak, di dalam mesenchimo terdapat juga kristal-kristal kecil seperti duri atau anyaman benag dari bahan organik antara lain dari calsium carbonat (CaCO_3), silikat ($\text{H}_2\text{Si}_3\text{O}_7$), dan spongin yang mempunyai bentuk monoaxon, triaxon, tetraaxon, dan polyaxon.

2.1.2 Sistem Pencernaan

Makanan binatang ini berupa partikel – partikel sampah halus dan plankton kecil yang terbawa arus air. Butir makanan melekat pada leher choanocyte untuk kemudian ditelan oleh choanocyte yang kemudian dicerna (Wijarni dan Afriani, 1984).

2.1.3 Sistem Pernapasan

Pertukaran gas O_2 dan CO_2 terjadi di mana saja pada jaringan terbuka. Difusi gas-gas terlarut dapat cepat dan efisien karena semua sel berhubungan langsung dengan air atau hanya bergerak beberapa sel saja (Wijarni dan Afriani, 1984).

2.1.4 Reproduksi

Reproduksi dilakukan secara aseksual yaitu aseksual dengan pembentukan kuncup (budding). Reproduksi secara seksual yaitu dengan cara pertemuan sel telur dan sperma yang zigote (Wijarni dan Afriani, 1984).

2.1.5 Budidaya Sponge

Untuk mengendalikan besarnya laju pengambilan sponge laut dari alam dan mencegah tangkap lebih (*overfishing*), terutama untuk pemanfaatan sebagai sumber senyawa bioaktif baru dan memproduksi senyawa bioaktif tertentu, perlu dilakukan upaya pengendalian, terutama yang berhubungan dengan pengembangan budidayanya. Pengembangan budidaya ini diarahkan untuk memproduksi ekstrak kasar dan fraksinya dan untuk penyediaan bibit atau anakan untuk *restocking* pada kawasan terumbu karang yang rusak. Pengembangan budidaya untuk memproduksi ekstrak kasar dan fraksi aktif, dilakukan dengan mencari suatu teknik budidaya yang dapat menghasilkan

ekstrak kasar dan fraksi aktif yang relatif banyak, sedangkan untuk penyediaan bibit untuk *restocking* pada kawasan terumbu karang yang rusak, dilakukan dengan mencari suatu teknik budidaya yang dapat memberikan pertumbuhan yang cepat, sintasan yang tinggi dan masa pemulihan siklus reproduksi yang cepat.

Salah satu alternatif dalam mengurangi tekanan pada ekosistem terumbu karang dari pengumpulan organisme yang berasosiasi dalam ekosistem terumbu karang untuk tujuan komersil yaitu dengan cara pengembangan budidaya terhadap berbagai organisme tersebut. Oleh karena itu, usaha pemanfaatan sponge melalui usaha budidaya dan kegiatan rehabilitasi dan konservasi terumbu karang harus diarahkan untuk memproduksi benih secara massal melalui usaha transplantasi dan pembenihan. Metode transplantasi dilakukan dengan jalan melakukan fragmentasi pada induk sponge menggunakan pisau sedangkan metode pembenihan dengan mengalirkan kejutan listrik pada sponge dalam akuarium sehingga sponge mengeluarkan larvanya (pemijahan buatan) (Suparno, 2005).

Perkembangan budidaya sponge tidak hanya sampai di transplantasi. Saat ini telah dikembangkan budidaya sponge dengan sistem kultur sel. Beberapa jenis sponge yang telah dicoba antara lain *Geodia barrette*, *Leuconia solida*, *Axinella verrucosa*, *Axinella damicornis*, *Chondrosia eniformis*, *Chondrilla nucula*, *Acanthella acuta*, *Agelas oroides*, *Hemimycale sp.*, *Dysidea*, *Petrosia ficiformis*, *Corticium candelabrum*, *Dysidea avara*, *Suberites domuncula*, *Stylissa massa*, *Suberites domuncula*, *Geodia cydonium*, *Axinella polypoides*, *Halichondria panicea* dan *Haliclona oculata*, *Xestospongia muta* (Wijarni dan Arfiani, 1984).

2.2 Klasifikasi Sponge

Sponge merupakan jenis hewan laut yang hidup pada lingkungan terumbu karang. Diperkirakan terdapat lebih dari 5000 spesies yang terdapat di alam dan dibagi atas tiga kelas yaitu Calcarea, Demospongia, dan Hexatipellida. Di Indonesia jenis-jenis sponge yang ditemukan 90 % dari Demospongia (Satari dan Kadi, 1994).

a. Kelas Calcarea

Adalah kelas sponge yang semuanya hidup di laut. Sponge ini mempunyai struktur sederhana dibandingkan yang lainnya. Spikulanya terdiri dari kalsium karbonat dalam bentuk *calcikate* (Suparno, 2005). Wijarni dan Diana (1984), menambahkan bahwa penggolongan kelas ini karena adanya spikula (kerangka) yang terdiri dari monoaxon, triaxon, tetraxon, dan polyaxon yang terbuat dari bahan kapur CaCO_3 . Hidup di laut, umumnya terbatas pada daerah pantai yang dangkal, tingginya kurang lebih 10 cm dan umumnya berwarna gelap.

b. Kelas Demospongiae

Adalah kelompok sponge yang terdominan di antara Porifera masa kini. Mereka tersebar luas di alam, serta jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Mereka sering berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercambuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa (*Dictyoceratida*, *Dendroceratida* dan *Verongida*) spikulanya hanya terdiri serat spongin, serat kollagen atau spikulanya tidak ada (Suparno, 2005). Ditambahkan oleh Wijarni dan Diana (1984), kerangkanya terbuat dari bahan campuran. Spikulanya selalu besar dan membentuk monoaxon dan tetraxon. Habitatnya di laut dan air tawar. Jenis tertentu mencapai tinggi beberapa meter.

c. Kelas Hexactinellida

Merupakan sponge gelas. Mereka kebanyakan hidup di laut dalam dan tersebar luas. Spikulanya terdiri dari silikat dan tidak mengandung spongin (Suparno, 2005). Ditambahkan oleh Wijarni dan Diana (1984), penggolongan kelas ini spikulanya tidak disusun dari kapur tetapi banyak mengandung silikat. Hidup di laut pada kedalaman 500-1000 m, biasanya di daerah tropis. Pada umumnya tidak membentuk koloni, bentuknya simetri seperti cangkir (jambangan). Tingginya mencapai 10-50 cm dan umumnya berwarna pucat.

Ditinjau dari sistem kanalnya, maka porifera (sponge) dibagi menjadi 3 yaitu: (Wijarni dan Arfiani, 1984)

a. Tipe Ascon

Dinding tubuhnya tipis dan dilengkapi dengan kanal yang langsung bermuara ke dalam spongocoel yang dindingnya dilengkapi pula dengan sel-sel leher. Pada permukaan asconoid berpori-pori dengan adanya ostia atau lubang air masuk yang dapat terbuka dan tertutup. Ostia berhubungan dengan spongocoel (saluran tengah) dan dari sini air dikeluarkan melalui osculum.

b. Tipe Sycon

Pada prinsipnya tipe ini sama dengan tipe ascon, hanya saja dinding dari spongocoelnya mengadakan pelipatan ke arah epidermis sehingga membentuk kanal-kanal horizontal yang dindingnya dengan sel-sel leher dan kanal-kanal itu disebut radial kanal. Akibat dari pelipatan dinding tersebut, disamping terbentuknya radial kanal juga terbentuk incurrent kanal yang satu sama lain dalam keadaan sejajar. Lubang di mana air masuk dari incurrent kanal ke dalam radial kanal disebut prosopyle, sedangkan lubang di mana air masuk dari radial kanal ke dalam

spongocoel disebut apophyle. Dari tipe ini yang terkenal adalah sycon dan scypha. Meskipun terjadi lipatan dinding tubuh spon syconoid masih tetap memperlihatkan simetri radial dengan baik.

c. Tipe Leucon

Tipe ini ditandai dengan dinding tubuhnya yang dilengkapi dengan mesenchime yang tebal, di dalamnya terdapat sistem kanal yang bercabang-cabang dan kompleks dan pada suatu tempat sistem kanal tersebut membulat membentuk rongga yang dindingnya dilengkapi dengan sel-sel leher. Keadaan simetri radial hilang dan bentuk tubuh menjadi tidak beraturan. Spongocoel hilang dan tinggal saluran air yang menuju osculum. Sponge leuconoid selalu berbentuk irregular, tetapi dapat mencapai ukuran besar seperti *bath sponge*.

2.3 *Haliclona* sp.

Haliclona sp. termasuk kelas Demospongia. Kelas Demospongiae adalah kelompok sponge yang terdominan di antara Porifera masa kini. Mereka tersebar luas di alam, serta jumlah jenis maupun organismenya sangat banyak. Mereka sering berbentuk masif dan berwarna cerah dengan sistem saluran yang rumit, dihubungkan dengan kamar-kamar bercabuk kecil yang bundar. Spikulanya ada yang terdiri dari silikat dan ada beberapa spikulanya hanya terdiri serat spongin, serat kollagen atau spikulanya tidak ada (Suparno, 2005).

Haliclona sp. memiliki warna tubuh yang bervariasi mulai dari coklat keunguan hingga keabuan. Bentuk tubuh polymorphous, dengan ukuran kecil dan memiliki oskulum di permukaan tubuhnya. Karakteristik spikula pendek, tipis dan biasanya dengan modifikasi stylote $80-130 \times 4-8 \mu\text{m}$. Habitat hidupnya berada di daerah intertidal sampai kedalaman 50 m (Anonymous, 2010). Bentuk tubuh *Haliclona* sp. dapat dilihat pada Gambar 1.



Haliclona sp. A member of this common genus is the source of manzamine A.
Photo: George Brooks
© Copyright 2002 California Academy of Sciences

Gambar 1. *Haliclona* sp.

Menurut De Weerd (1987), klasifikasi *Haliclona* sp. adalah sebagai berikut:

| | |
|---------|------------------------|
| Kingdom | : Animalia |
| Phylum | : Porifera |
| Kelas | : Demospongia |
| Ordo | : Haplosclerida |
| Famili | : Chalinidae |
| Genus | : <i>Haliclona</i> |
| Spesies | : <i>Haliclona</i> sp. |

2.4 Antibakteri

2.4.1 Antibakteri dan Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri adalah antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Pengertian antimikroba secara umum adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba dan digunakan untuk kepentingan pengobatan infeksi pada manusia dan hewan (Fardiaz, 1992).

Berdasarkan aktifitasnya antibakteri dibedakan menjadi dua bagian yaitu aktivitas bakteriostatik dan aktivitas bakterisida. Aktivitas bakteriostatik bersifat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan aktivitas bakterisida bersifat membunuh bakteri (Cowan, 1999).

Menurut Dzen, *et al.*, (2003), mekanisme kerja antibakteri dibedakan dalam lima kelompok, yaitu antibakteri yang menghambat metabolisme sel, menghambat sintesis dinding sel, mengganggu membran sel, menghambat sintesis protein dan menghambat sintesis asam nukleat.

a. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel mikroba

Antibakteri yang termasuk dalam kelompok ini adalah sulfonamid, trimetoprin, asam α -aminosalisilat (PAS) dan sulfon. Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya yang disintesis dari asam para amino benzoat (PABA). Apabila sulfonamid atau sulfon menang bersaing dengan PABA untuk ikut disertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Antibakteri menghambat enzim dihidrofolat sehingga asam dihidrofolat tidak tereduksi menjadi asam tetrahidrofolat yang fungsional.

b. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah penisilin, safolosporin, basitrasain, vonkomisin, dan sikloserin. Dinding sel bakteri terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida. Sikloserin menghambat reaksi yang paling dini dalam proses sintesis dinding sel, diikuti oleh antibakteri yang menghambat reaksi terakhir dalam rangkaian reaksi tersebut.

c. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel mikroba

Obat yang termasuk dalam kelompok ini adalah polimiksin, golongan polien serta berbagai antibakteri kemoterapeutik. Antibakteri merusak dinding sel setelah bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sehingga jumlah fosfor menurun. Hal ini mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Kerusakan membran menyebabkan keluarnya komponen dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain.

d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel mikroba

Protein dibutuhkan untuk kehidupan mikroba. Sintesis protein berlangsung di ribosom sub unit 30S dan 50S dengan bantuan mRNA dan tRNA. Kedua sub unit tersebut harus bersatu agar dapat berfungsi untuk mensintesis protein. Penghambatan bakteri dengan dua cara yaitu: Antibakteri berikatan dengan ribosom 30S menyebabkan kode pada mRNA salah baca oleh tRNA pada waktu sintesis protein, akibatnya terbentuk protein yang abnormal dan unfungsional. Antibakteri berikatan dengan ribosom 50S dan menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Akibatnya rantai polipeptida tidak dapat diperpanjang karena lokasi asam amino tidak dapat menerima kompleks tRNA-asam amino yang baru.

e. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat

Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini adalah rifampisin, dan golongan kuinolon. Antibakteri berikatan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut.

2.4.2 Senyawa Aktif Antibakteri dari Sponge

Sponge termasuk invertebrata filum Porifera yang dapat menghasilkan bioaktif sebagai antibakteri. Sponge laut yang telah diisolasi senyawa antibakterinya antara lain: *Discodermia kiiensis*, *Cliona celata*, *lanthella basta*, *lanthellcr ardis*, *Psammaphysila purpurea*, *Agelas sceptrum*, *Phakelia flabellata*, *Hyatella intestinalis*, *Algilus flabellifilus*, *Hipospongia comunis*, *Spongia offisinalis*, *Ircina virabilis*, *Spongia oracillis*, *Dysidea avara*, *Erylus cendeveldi*, dan *Dyctionella insica*. Di perairan Sulawesi Selatan, telah diinventarisasi empat jenis sponge, yaitu: *Halichondria* sp., *Callyspongia* sp., *Callyspongia pseudoreticulatta*, dan *Auletta* sp., yang masing-masing memiliki ekstrak senyawa bioaktif bersifat bakterisida.

Hasil pengujian terhadap bakteri memberikan respon yang sama dengan jenis bakterisida komersial, bahkan dengan dosis yang lebih rendah, yakni: 20-40 ppm, sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisida komersial umumnya membutuhkan kadar 100 ppm untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Suharyanto, 2008).

Pembentukan senyawa bioaktif pada sponge sangat ditentukan oleh prekursor berupa enzim, nutrien serta hasil simbiosis dengan biota lain yang mengandung senyawa bioaktif seperti bakteri, kapang dan beberapa jenis dinoflagellata yang dapat memacu pembentukan senyawa bioaktif pada hewan tersebut (Scheuer, 1978 dalam Suryati, *et al.*, 2000). Senyawa terpenoid dan turunannya pada berbagai jenis invertebrata termasuk sponge atau beberapa spesies dinoflagellata dan zooxanthellae yang memiliki senyawa –senyawa yang belum diketahui, yang kemudian diubah melalui biosintesis serta fotosintesis menghasilkan senyawa bioaktif yang spesifik pada hewan tersebut (Suparno, 2005).

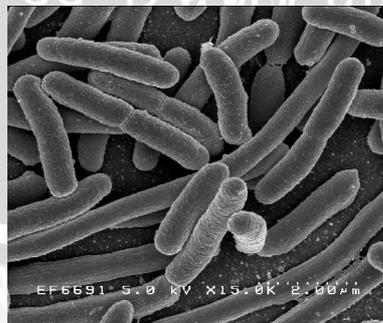
Beberapa penelitian mengungkapkan bahwa pada beberapa sponge terdapat senyawa aktif antibakteri antara lain: *cyclic peptide*, *sulfated sterol*, *alkylpiperidine alkaloid*, dan *imidazo-azolo-imidazole alkaloid* (Speelman, 2004). Selain itu, penelitian yang dilakukan Handayani, *et al.*, (2008) menunjukkan adanya senyawa antibakteri *epidioksi sterol* dari jenis *Petrosia nigrans*. Sedangkan jenis *Petrosia contignata* menghasilkan senyawa *taraxeron* dan *D-homoandrostan* (Sutedja, *et al.*, 2005).

2.5 *Escherichia coli*

2.5.1 Morfologi *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah salah satu group koliform yang 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 16,17. Pada biakan *E. coli* bersifat aerob atau fakultatif anaerob dan tumbuh pada pembenihan biasa, misalnya pada biakan cair, agar gizi pembenihan Mac Conkey dan Blood agar. Suhu optimum pertumbuhan adalah 37°C (Susanty, 2009).

Escherichia coli memproduksi lebih banyak asam di dalam medium glukosa memproduksi indol tetapi tidak memproduksi aseton, bakteri ini memproduksi CO₂ dan H₂ dengan perbandingan 1:1 dan tidak dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Sebaliknya *Enterobacter aerogenes* memproduksi asam lebih sedikit daripada aseton, tetapi tidak membentuk indol. Bakteri ini memproduksi CO₂ dan H₂ dengan perbandingan 1: 2 dan dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbon (Fardiaz, 1992). Bentuk dari *Escherichia coli* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bentuk *Escherichia coli*

Klasifikasi *Escherichia coli* menurut Brooks, *et al.* (2001) adalah sebagai

berikut :

| | |
|---------|---------------------------|
| Kingdom | : Procaryota |
| Divisio | : Gracilicutes |
| Class | : Scotobacteria |
| Ordo | : Eubacteriales |
| Family | : Entobacteriaceae |
| Genus | : <i>Escherichia</i> |
| Species | : <i>Escherichia coli</i> |

2.5.2 Infeksi Klinis dari *Escherichia coli*

Menurut Dzen, *et al.*, (2003), infeksi klinis dari *Escherichia coli* tergantung dari tempat infeksi dan gejala-gejalanya tidak dapat dibedakan dengan infeksi bakteri yang lain. Infeksi yang disebabkan *Escherichia coli* antara lain infeksi saluran kemih, diare, sepsis dan meningitis. *Escherichia coli* yang menyebabkan diare diklasifikasikan berdasarkan karakteristik sifat-sifat virulensinya, dan setiap grup menyebabkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda.

Escherichia coli enteropatogen (EPEC) merupakan penyebab diare terpenting pada bayi. EPEC melekat erat pada sel mukosa usus kecil menyebabkan penggundulan (*effacement*) dari mikrofili. Pada mukosa usus, EPEC membentuk *filamentous actin pedestal* atau *cup like structures*, dan adakalanya EPEC masuk ke dalam sel mukosa. Infeksi EPEC menyebabkan diare cair (*water diarrhea*) yang biasanya sembuh sendiri (*self limited*)., tetapi kadang menimbulkan infeksi kronis. Diare EPEC disebabkan berbagai serotipe *Escherichia coli* yang diidentifikasi melalui tipe antigen-O dan antigen-H.

Escherichia coli enterotoksigenik (ETEC) merupakan penyebab umum diare pada para pelancong (*travelers diarrhea*) dan pada bayi. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menyebabkan terjadinya adhesi ETEC pada sel-sel epitel usus kecil. Beberapa galur ETEC memproduksi eksotoksin yang tidak tahan panas (LT) dengan berat molekul sekitar 80.000 Da di bawah kontrol genetik plasmid. LT bersifat antigenik dan mengadakan reaksi silang dengan enterotoksin *Vibrio cholera*. LT dapat merangsang terbentuknya antibodi netralisasi dalam serum dan di permukaan usus orang yang sebelumnya pernah terinfeksi ETEC.

Escherichia coli enterohemoragik (EHEC) merupakan galur yang memproduksi *verotoxin* (VTEC). VTEC menyebabkan diare, kolitis hemoragik dan HUS. Kolitis hemoragik bersifat akut dan sembuh spontan, ditandai dengan nyeri abdomen, diare cair disertai darah. HUS ditandai dengan kegagalan ginjal akut, *microangiopathic hemolytic anaemia*, dan *trombositopenia*. Serotipe O157:H7 adalah penghasil utama verotoksin yang biasanya berasal dari daging dan produk hewan seperti susu dan hamburger.

Escherichia coli enteroinvasif (EIEC) menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan *shigellosis*. Seperti pada shigella, galur EIEC tidak mengadakan fermentasi laktosa atau mengadakan fermentasi secara lambat dan tidak bergerak. EIEC menimbulkan penyakit dengan cara mengadakan invasi ke dalam sel epitel mukosa intestinal.

Escherichia coli enteroagregatif (EAEC) menyebabkan diare akut dan kronik ditandai dengan pola perlekatan yang khas pada sel-sel manusia. Masih sangat sedikit yang diketahui tentang factor-faktor virulensi galur EAEC.

Sebuah laporan yang dikeluarkan oleh Canada Wide Virtual Science Fair (VSF) tahun 2003 menunjukkan bahwa infeksi bakteri biasanya diobati dengan antibiotik. Namun, sensitifitas antibiotik berbagai jenis *E. coli* sangat bervariasi.

Sebagai organisme Gram-negatif, *E. coli* yang resisten terhadap antibiotik banyak yang efektif melawan organisme Gram-positif. Antibiotik yang dapat digunakan untuk mengobati infeksi *E. coli* termasuk amoksisilin serta penisilin semi-sintetis lainnya, banyak sefalosporin, carbapenems, aztreonam, trimetoprim-sulfametoksazol, ciprofloxacin, nitrofurantoin dan aminoglikosida.

Menurut Departement of Chemistry Kentucky (2004), sebuah skema immobilisasi sel-sel bakteri dijelaskan, di mana peptida antimikroba P1 cecropin digunakan untuk *Escherichia coli* K-12 dan sel O157: H7 pada permukaan plat mikro. Cecropin P1 adalah kovalen menempel pada permukaan dengan baik, dan sel *E. coli* diizinkan untuk mengikat ke permukaan berlapis peptida. Sel amobil terdeteksi kolorimetrikal dengan antibodi anti-*E. coli* konjugat horseradish peroksidase. Binding kurva diperoleh di mana intensitas sinyal yang tergantung pada konsentrasi sel dan atas jumlah peptida menempel pada permukaan dengan baik. Data yang mengikat dibandingkan, yang menunjukkan bahwa ada kecenderungan kuat untuk *E. coli* O157: H7 atas *E. coli* K-12. Sel tersebut bisa diamobilisasi dengan nilai pH berkisar antara 5 sampai 10 dan 0,50 M.

2.5.3 *Escherichia coli* dalam Bahan Pangan

Penyakit keracunan makanan disebabkan oleh konsumsi makanan atau minuman tercemar. Banyak bakteri patogen penyebab penyakit dapat mengkontaminasi makanan, misalnya infeksi *Escherichia coli* O157: H7 dapat menyebar melalui makanan (daging, sayuran, dan keju), air minum atau jus, air kolam yang terkontaminasi dan dari orang ke orang. Khusus patogen jenis *E. coli*, diklasifikasikan berdasarkan mekanisme khusus patogen dikenal sebagai *virotypes E. coli. Enterohaemorrhagic (EHEC)* dan *E. coli Verotoxigenic (VTEC)* atau *toksigen Shiga E. coli (STEC)* (Garcia, 2002).

Enterotoksigenik E. coli merupakan penyebab diare pada wisatawan yang mengunjungi negara yang standar higienitas makanan dan air minum berbeda dari negara asalnya. *Enterohaemorrhagic E. coli* 0157:H7 akhir-akhir ini diketahui merupakan bakteri patogen penyebab *foodborne diseases*. Kontaminasi *enterohaemorrhagic E. coli* 0157:H7 yang banyak ditemukan pada sayuran dapat terjadi akibat penggunaan kotoran sapi sebagai pupuk.

Mikroba patogen yang umum mencemari susu adalah *E. coli*. Standar 70 *Jurnal Litbang Pertanian*, 26(2), 2007 Nasional Indonesia tahun 2000 mensyaratkan bakteri *E. coli* tidak terdapat dalam susu dan produk olahannya. Bakteri *E. coli* dalam air susu maupun produk olahannya dapat menyebabkan diare pada manusia bila dikonsumsi (Djafaar dan Rahayu, 2007).

E. coli merupakan contoh klasik dari bakteri enterik menyebabkan Gastroenteritis. *E. coli* umumnya digunakan sebagai indeks berbahaya kondisi selama pengolahan ikan. Organisme tidak harus hadir pada ikan segar hasil tangkapan. Kontaminasi produk perikanan dengan patogen *E. coli* mungkin terjadi selama penanganan ikan dan selama proses produksi (Asai, *et al.*, 1999).

Hasil penelitian Rahayu dan Firdaus (2008) menunjukkan bahwa tingkat cemaran total bakteri, bakteri fecal Coliform dan bakteri *Escherichia coli* pada ikan yang cedera akibat pengeboman sudah sangat membahayakan kesehatan konsumen. Berdasarkan peraturan yang berlaku bahwa mutu ikan segar yang layak konsumsi, cemaran fecal coliform tidak boleh lebih dari 100 bakteri per gram sedangkan cemaran *Escherichia coli* tidak boleh lebih dari 10 per gram daging ikan. Menurut Siagian (2002) dalam kerang-kerangan juga telah ditemukan mikroorganisme patogen seperti *Salmonella*, *E. coli*, *V. parahemolyticus*, *Clostridia* dan *Virus*.

Sebuah wabah penyakit diare disebabkan oleh konsumsi makanan yang terkontaminasi dengan enterotoksigeni. Penyakit tersebut digambarkan di Jepang itu sangat terkait dengan konsumsi ikan tuna. Penelitian menunjukkan telah terisolasi 18 enterotoksigenik strain *E. coli* (ETEC) dari 3 dari 24 sampel ikan segar yang berasal dari pasar; 13 dari diantaranya menghasilkan enterotoksin termolabil (Novotny, *et al.*, 2004).

2.6 Ekstraksi Komponen Aktif

Proses ekstraksi adalah proses pengeluaran sesuatu zat dari campuran zat, dengan jalan menambahkan bahan ekstraksi tepat pada waktunya. Hanya zat yang diekstrak yang dapat larut dalam bahan ekstraksi. Pemisahan yang diinginkan dapat terjadi karena adanya perbedaan dalam sifat yaitu dapat larutnya antara bagian – bagian campuran dari suatu campuran zat pada bahan pelarut. Dalam proses ekstraksi terjadi peralihan dari fase yang satu ke fase yang lain, yang diperoleh dengan jalan penambahan bahan pelarut yang disebut *solvent* (Wanto dan Romli, 1977).

Ekstraksi juga diartikan sebagai proses pemisahan zat dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Berdasarkan bentuk campuran yang diekstrak, ekstraksi dibedakan menjadi dua macam yaitu ekstraksi padat-cair ; campuran yang diekstrak berbentuk padat, dan ekstraksi cair-cair ; cairan yang diekstrak berbentuk cair. Ekstraksi bentuk padat-cair paling sering digunakan untuk mengisolasi zat yang terkandung dalam bahan alami. Sifat – sifat seperti kepolaran, kelarutan bahan alami yang diisolasi berperan penting terhadap sempurnanya proses ekstraksi (Vogel, 1987).

Menurut Voigt (1994), proses ekstraksi pada dasarnya dibedakan menjadi dua fase, yaitu fase pencucian dan fase ekstraksi. Pada fase pencucian terjadi penyatuan cairan ekstraksi, melalui rusaknya sel – sel zat yang diekstrak atau

terusakkan dengan operasi penghalusan, langsung kontak dengan bahan pelarut. Diharapkan komponen sel yang terdapat dalam sel lebih mudah diambil atau dicuci, sedangkan yang dimaksud dengan fase ekstraksi, peristiwanya lebih kompleks, yaitu suatu peristiwa yang memungkinkan terjadinya pelintasan bahan pelarut ke dalam bagian dalam sel. Dengan mengalirnya bahan pelarut ke dalam sel akan menyebabkan protoplasma membengkak, dan bahan kandungan sel akan terlarut sesuai dengan kelarutannya. Zat tersebut pindah sejauh mereka terlarut molekuler, mengikuti difusi melalui ruang antarmiselar.

Menurut Heldman (1975), faktor-faktor yang berpengaruh dalam ekstraksi antara lain ukuran bahan, waktu kontak antara bahan dengan pelarut dan suhu ekstraksi. Ditambahkan Voight (1995), faktor lain yang menentukan hasil ekstraksi adalah perbandingan antara sampel terhadap cairan pengekstraksi (jumlah bahan pengekstraksi) dan jangka waktu dimana sampel kontak dengan cairan pengekstraksi (waktu ekstraksi).

Hal pertama yaitu ukuran bahan yang akan diekstraksi sebaiknya memiliki luas permukaan yang kecil untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut sehingga ekstraksi berlangsung baik (Puseglove, *et al.*, 1981). Faktor yang kedua yaitu suhu ekstraksi. Suhu ekstraksi merupakan faktor lain yang dapat mempengaruhinya karena kecepatan reaksi kimia tergantung dari jenis zat pereaksi, suhu ekstraksi dan konsentrasi zat pereaksi. Karena hal ini menyangkut proses bercampurnya antara zat terlarut dengan pelarut (Sukardjo, 1997).

Faktor ketiga yaitu lama ekstraksi, semakin lama waktu ekstraksi, kesempatan untuk bersentuhan makin besar sehingga hasilnya juga bertambah sampai titik jenuh larutan (Suryandari, 1981). Waktu ekstraksi yang relatif lama, ditujukan untuk mendapatkan rendemen dan total pigmen yang tinggi, jika dilakukan dengan ekstraksi yang tidak mengalami pengadukan

Faktor lain yang mempengaruhi hasil ekstraksi yaitu perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi). 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 solut yang terekstrak.

2.7 Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan. Dalam pemilihan pelarut harus melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar. Larutan adalah campuran homogen antara dua komponen zat atau lebih. Dua komponen tersebut adalah pelarut (*solvent*) dan zat terlarut (*solute*). Pelarut merupakan komponen zat dalam jumlah lebih besar dalam suatu larutan (Rivai, 1995).

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*”. Adanya 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). Seperti juga yang 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 senyawa yang diekstraksi. Terdapat

kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non-polar larut dalam pelarut non polar.

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.

Sifat penting lainnya dari pelarut adalah kecenderungan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen adalah harga tetapan dielektrikannya dalam hubungan dengan momen dwi kutubnya. Terbentuknya sejumlah besar ikatan hidrogen menyebabkan tetapan dielektrika yang sangat tinggi. Dalam setiap larutan, pelarut memainkan peranan yang sangat penting. Molekul – molekul pelarut saling mempengaruhi dengan molekul – molekul bukan air. Saling pengaruh ini disebut pengaruh pelarut atau *solvation effect* (Day and Underwood, 1999). Sifat-sifat dari berbagai jenis pelarut dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sifat-Sifat Pelarut Umum

| Solvent | Rumus kimia | Titik didih | Konstanta Dielektrik | Massa jenis |
|---------------------------|---|-------------|----------------------|-------------|
| 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 | C_6H_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 |
| Dietyl eter | $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$ | 35 °C | 4.3 | 0.713 g/ml |
| Kloroform | CHCl_3 | 61 °C | 4.8 | 1.498 g/ml |
| Etil asetat | $\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$ | 77 °C | 6.0 | 0.894 g/ml |
| 1,4-Dioksana | $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-}$ | 101 °C | 2.3 | 1.033 g/ml |
| 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) | CH_2Cl_2 | 40 °C | 9.1 | 1.326 g/ml |
| Asetona | $\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$ | 56 °C | 21 | 0.786 g/ml |
| Asetonitril (MeCN) | $\text{CH}_3\text{-C N}$ | 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 | 1.092 g/ml |
| Asam asetat | $\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$ | 118 °C | 6.2 | 1.049 g/ml |
| <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 | H-C(=O)OH | 100 °C | 58 | 1.21 g/ml |
| Air | H-O-H | 100 °C | 80 | 1.000 g/ml |

Sumber: Wikipedia, (2009)

2.7.1 Kloroform

Kloroform disebut juga haloform disebabkan karena brom dan klor juga bereaksi dengan metal keton, yang menghasilkan masing-masing bromoform (CHBr_3) dan kloroform (CHCl_3). Hal ini disebut CHX_3 atau haloform, maka reaksi ini sering disebut reaksi haloform.

Sifat-sifat CHCl_3 antara lain berbentuk cairan pada suhu ruang dan memiliki bau yang khas. Penggunaan heksana yaitu sebagai pelarut untuk lemak, *dry cleaning*, dan sebagainya. Selain itu juga digunakan sebagai obat bius.

Senyawa halokarbon seperti contohnya kloroform mudah dibuat, metana berklorin dibuat melalui klorinasi metana. Kloroform (CHCl_3), semua tidak larut dalam air, tetapi merupakan pelarut efektif untuk senyawa organik.

Dalam pembuatan atau pensintesaan kloroform perlu diperhatikan beberapa hal yaitu dengan adanya oksigen dari udara dan sinar matahari maka kloroform dapat teroksidasi dengan lambat menjadi fosgen (gas yang sangat beracun), maka untuk mencegah terjadinya fosgen ini maka kloroform, disimpan dalam botol yang berwarna coklat yang terisi dan mengandung 0,5 – 1% etanol (untuk mengikat bila terjadi fosgen) (Fatmawaty, 2009).

2.7.2 Etil Asetat

Etil asetat adalah senyawa organik dengan rumus $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{CH}_3$. Senyawa ini merupakan ester dari etanol dan asam asetat. Senyawa ini berwujud cairan tak berwarna, memiliki aroma khas. Senyawa ini sering disingkat EtOAc , dengan Et mewakili gugus etil dan OAc mewakili asetat. Etil asetat diproduksi dalam skala besar sebagai pelarut.

Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan bukan suatu donor ikatan hidrogen karena tidak adanya proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti fluor, oksigen, dan nitrogen). Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung basa atau asam.

Etil asetat disintesis melalui reaksi esterifikasi Fischer dari asam asetat dan etanol dan hasilnya beraroma jeruk (perisa sintesis), biasanya dalam sintesis disertai katalis asam seperti asam sulfat.



Reaksi diatas merupakan reaksi reversibel dan menghasilkan suatu kesetimbangan kimia. Karena itu, rasio hasil dari reaksi diatas menjadi rendah jika air yang terbentuk tidak dipisahkan. Di laboratorium, produk etil asetat yang terbentuk dapat dipisahkan dari air dengan menggunakan aparatus Dean-Stark (Wikipedia, 2010).

Etil asetat dapat dihidrolisis pada keadaan asam atau basa menghasilkan asam asetat dan etanol kembali. Katalis asam seperti asam sulfat dapat menghambat hidrolisis karena berlangsungnya reaksi kebalikan hidrolisis yaitu esterifikasi Fischer.

Untuk memperoleh rasio hasil yang tinggi, biasanya digunakan asam kuat dengan proporsi stoikiometris, misalnya natrium hidroksida. Reaksi ini menghasilkan etanol dan natrium asetat, yang tidak dapat bereaksi lagi dengan etanol:



2.7.3 Metanol

Metanol, juga dikenal sebagai metil alkohol, *wood alcohol* atau spiritus, adalah senyawa kimia dengan rumus kimia CH₃OH. Ia merupakan bentuk alkohol paling sederhana. Pada "keadaan atmosfer" ia berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Ia digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi etanol industri.

Metanol diproduksi secara alami oleh metabolisme anaerobik oleh bakteri. Hasil proses tersebut adalah uap metanol (dalam jumlah kecil) di udara. Setelah beberapa hari, uap metanol tersebut akan teroksidasi oleh oksigen dengan bantuan sinar matahari menjadi karbon dioksida dan air. Reaksi kimia metanol yang terbakar di udara dan membentuk karbon dioksida dan air adalah sebagai berikut:



Penggunaan metanol terbanyak adalah sebagai bahan pembuat bahan kimia lainnya. Sekitar 40% metanol diubah menjadi formaldehyde, dan dari sana menjadi berbagai macam produk seperti plastik, plywood, cat, peledak, dan tekstil. Dalam beberapa pabrik pengolahan air limbah, sejumlah kecil metanol digunakan ke air limbah sebagai bahan makanan karbon untuk denitrifikasi bakteri, yang mengubah nitrat menjadi nitrogen.

Bahan bakar direct-metanol unik karena suhunya yang rendah, operasi pada tekanan atmosfer, mengijinkan mereka dibuat kecil. Ditambah lagi dengan penyimpanan dan penanganan yang mudah dan aman membuat metanol dapat digunakan dalam perlengkapan elektronik (Wikipedia, 2010).

2.8 GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*)

Kromatografi merupakan metode pemisahan. Dibandingkan dengan metode pemisahan klasik seperti destilasi, kristalisasi, pengendapan ekstraksi, dan lain-lain, mempunyai kelebihan dalam pelaksanaan yang lebih sederhana. Penggunaan waktu yang singkat dan terutama mempunyai kepekaan serta kemampuan memisahkan serta kemampuan pemisahan yang tinggi. Prosedur kromatografi dapat digunakan jika metode klasik tidak dapat dilakukan karena jumlah cuplikan rendah, kompleksitas campuran yang hendak dipisahkan atau sifat kekerabatan zat yang hendak dipisah. Kromatografi kertas, kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom, dan kromatografi gas dapat dilakukan dalam laboratorium dan sangat sesuai dengan identifikasi dan pemeriksaan kemurnian senyawa obat dan campuran senyawa obat dan campuran senyawa obat. Prosedur kromatografi tunggal dapat dibedakan menurut jenis pemisahan zat atau menurut jenis pemisahan zat atau menurut materi pemisahan yang digunakan. Seringkali berbagai prinsip pemisahan dijadikan satu. Untuk karakterisasi hasil pemisahan dikenal dengan parameter pengenalan (Roth dan Blaschke, 1985).

Kegunaan umum kromatografi gas adalah untuk melakukan pemisahan dinamis dan identifikasi semua jenis senyawa organik yang mudah menguap dan juga untuk melakukan analisis kualitatif dan kuantitatif senyawa dalam suatu campuran. Kromatografi gas dapat bersifat destruktif dan dapat bersifat non-destruktif tergantung detektor yang digunakan (Gandjar dan Rohman, 2007).

Hites (2007) dalam Putra (2007) menyatakan, teknik analisis GC-MS merupakan gabungan dari teknik kromatografi gas dan teknik spektrometri massa. Pada GC-MS, 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.

2.8.1 Prinsip Kromatografi Gas (GC)

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang mana solut-solut yang mudah menguap (dan stabil terhadap panas) bermigrasi melalui kolom yang memiliki fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya. Pada umumnya solut akan terelusi berdasarkan pada peningkatan titik didihnya, kecuali jika ada interaksi khusus antara solut dengan fase diam. Pemisahan pada kromatografi gas didasarkan pada titik didih suatu senyawa dikurangi dengan semua interaksi yang mungkin terjadi antara solut dengan fase diam. Fase gerak yang berupa gas akan mengelus solut dari ujung kolom lalu menghantarkannya ke dedektor. Penggunaan suhu yang meningkat (biasanya pada kisaran 50-350°C) bertujuan untuk menjamin bahwa solut akan menguap dan karenanya akan cepat terelusi (Gandjar dan Rohman, 2007).

Ada dua jenis kromatografi gas:

1. Kromatografi gas-cair (KGC)

Pada KGC ini, fase diam yang digunakan adalah fase cairan yang dikaitkan pada suatu pendukung sehingga solut akan terlarut pada fase diam. Mekanisme *sorpsi*-nya adalah partisi.

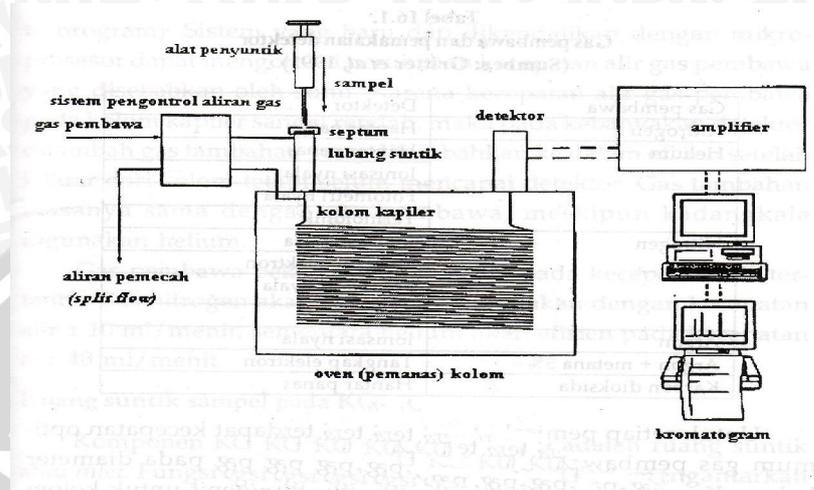
2. Kromatografi Gas-Padat (KGP)

Pada KGP ini, digunakan fase diam padatan (kadang-kadang polimerik). Mekanisme *sorpsi*-nya adalah adsorpsi.

a. Sistem Peralatan KG

Diagram skematik peralangan KG ditunjukkan oleh gambar 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 3. Kromatografi Gas

b. Fase Gerak pada KG

Fase gerak pada KG 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 abu2 untuk nitrogen). 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).

c. Ruang Suntik Sampel pada KG

Komponen KG 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° - 15° C lebih tinggi daripada suhu kolom maksimum. Jadi seluruh sampel akan menguap segera setelah sampel disuntikkan.

Pada kolom kapiler, sampel yang diperlukan sangat sedikit, bahkan sampai 0,01 μ l. 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).

d. Kolom pada KG

Kolom merupakan tempat terjadinya proses pemisahan karena di dalamnya terdapat fase diam. Oleh karena itu, kolom merupakan komponen sentral pada KG. Ada dua jenis kolom pada KG yaitu:

- Kolom Kemas

Jenis kolom ini 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 halusya partikel fase diam ini. Ukuran partikel fase diam biasanya berkisar antara 60-80 mesh (250-170 μ m).

- Kolom Kapiler

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°C , sementara itu suhu minimalnya dapat mencapai -60°C (Gandjar dan Rohman, 2007).

e. Detektor pada KG

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.

Pada garis besarnya detektor pada KG termasuk detektor diferensial, 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 oleh Kdisajikan 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).

2.8.2 Spektrometri Massa (SM)

Spektrometri massa sejak penampilannya yang baru (kira-kira 1960), telah merevolusikan penelitian biokimia mengenai bahan alam dan telah meringankan beban fitokimia dalam banyak hal. Nilai cara ini terletak pada kecilnya bahan yang diperlukan (skala mikro gram), kemampuannya menentukan bobot molekul dengan tepat, kemampuannya menghasilkan pola fragmentasi rumit yang sering khas bagi senyawa yang bersangkutan sehingga dapat diidentifikasi.

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.

Pada kebanyakan senyawa, 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, 2006).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari bahan utama dan bahan kimia serta isolat bakteri. Bahan utama yang digunakan adalah sponge *Haliclona* sp. yang diperoleh dari perairan Pulau Gili, Kabupaten Probolinggo, Jawa Timur, kloroform, etil asetat dan metanol serta aluminium foil dan kertas saring. Bahan-bahan yang digunakan untuk uji cakram adalah kertas cakram (*paper disc*) diameter 6 mm, *cotton swab*, biakan *Escherichia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Media TSA (*tripton soy agar*) untuk menumbuhkan *E. coli*. Sedangkan untuk uji GC-MS digunakan ekstrak kasar sponge sebagai bahan yang akan diuji.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar sponge adalah baskom, pisau, talenan, timbangan analitik, beaker glass, erlenmayer, corong glas, *rotary vacuum evaporator*, gelas ukur serta lemari es untuk menyimpan sampel. Adapun alat-alat yang digunakan untuk uji cakram adalah autoklaf, micro pipet, cawan petri, bunsen, jangka sorong dan inkubator. GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) digunakan untuk identifikasi senyawa aktif.

3.2 Metode Penelitian

3.2.1 Metode Eksperimen

Tahap pertama penelitian ini digunakan metode eksperimen. Metode eksperimen adalah kegiatan percobaan untuk melihat hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Suryasubrata, 1989). Tujuan dari penelitian eksperimen adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada kelompok eksperimen (Nazir, 1988). Menurut Singarimbun dan Effendi (1983), penelitian eksperimental lebih mudah dilakukan di laboratorium karena pengaruh luar dapat dengan mudah dikendalikan selama eksperimen. Penelitian tahap pertama bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak sponge *Haliclona* sp. yang paling efektif menghambat pertumbuhan *E. coli*.

3.2.2 Metode Deskriptif

Tahap kedua penelitian ini menggunakan metode deskriptif. Metode deskriptif yaitu metode yang menggambarkan suatu keadaan atau kejadian. Penelitian deskriptif hanya akan melukiskan keadaan objek atau persoalannya dan tidak dimaksudkan untuk mengambil kesimpulan yang berlaku umum. Dalam hal ini penelitian deskriptif merupakan akumulasi data dasar, dan tidak perlu menerangkan mestest hipotesis, membuat ramalan atau mendapatkan makna dan implikasi (Suryabrata, 1983).

Tujuan penelitian tahap dua adalah untuk mengidentifikasi komponen bioaktif yang terkandung dalam sponge *Haliclona* sp. dengan menggunakan metode Kromatografi Gas dan Spektrometri Massa (GC-MS).

3.2.3 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 jenis pelarut yang berbeda kepolarannya saat ekstraksi yaitu kloroform, etil asetat dan metanol serta dengan konsentrasi yang berbeda berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Handayani, *et al.*, (2008) yaitu 0 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Variabel terikat adalah konsentrasi minimal penghambat (MIC) ekstrak sponge sebagai antibakteri *Escherichia coli* dan senyawa aktifnya.

3.2.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan pengujian konsentrasi hambat minimal pada berbagai jenis pelarut terhadap *E. coli*. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rancangan Penelitian

| Jenis Pelarut | Konsentrasi (ppm) | Ulangan | | |
|------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Kloroform (K) | 0 | Ka ₁ | Ka ₂ | Ka ₃ |
| | 100 | Kb ₁ | Kb ₂ | Kb ₃ |
| | 250 | Kc ₁ | Kc ₂ | Kc ₃ |
| | 500 | Kd ₁ | Kd ₂ | Kd ₃ |
| | 1000 | Ke ₁ | Ke ₂ | Ke ₃ |
| Etil Asetat (EA) | 0 | Ea ₁ | Ea ₂ | Ea ₃ |
| | 100 | Eab ₁ | Eab ₂ | Eab ₃ |
| | 250 | Eac ₁ | Eac ₂ | Eac ₃ |
| | 500 | Ead ₁ | Ead ₂ | Ead ₃ |
| | 1000 | Eae ₁ | Eae ₂ | Eae ₃ |
| Metanol (M) | 0 | Ma ₁ | Ma ₂ | Ma ₃ |
| | 100 | Mb ₁ | Mb ₂ | Mb ₃ |
| | 250 | Mc ₁ | Mc ₂ | Mc ₃ |
| | 500 | Md ₁ | Md ₂ | Md ₃ |
| | 1000 | Me ₁ | Me ₂ | Me ₃ |

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Ekstrak Sponge

Sponge yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari perairan Pulau Gili Kabupaten Probolinggo. Sponge dicuci dan dibersihkan dari kotoran yang menempel dan kemudian diangin-anginkan. Sampel sponge kemudian dipotong kecil-kecil. Selanjutnya dimaserasi dengan menggunakan pelarut kloroform, etil asetat dan metanol dengan perbandingan 1:3 selama 3 X 24 jam. Proses maserasi sampel dilakukan pada suhu 4°C. Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan menggunakan kertas saring sehingga didapat ekstrak. Ekstrak kemudian dipekatkan dengan rotari evaporator pada suhu 50°C. Ekstrak kemudian ditampung dalam erlenmeyer sehingga diperoleh ekstrak kloroform, etil asetat dan metanol.

3.3.2 Pembuatan Media

Uji cakram adalah uji untuk mengetahui aktivitas antibakteri. Kertas cakram yang telah ditetesi zat anti bakteri diletakkan pada medium yang di permukaannya telah disebar biakan mikroba yang menjadi mikroba uji. Jadi, pertama-tama harus dibuat media untuk pertumbuhan mikroba. Media Tryptone Soy Agar (TSA) digunakan untuk menumbuhkan bakteri *E. coli*. Komposisi medium TSA dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi Medium Tryptone Soy Agar (TSA)

| Formula | Gram per liter |
|-----------------|----------------|
| Tryptone | 15 |
| Soy Peptone | 5 |
| Sodium Chloride | 5 |
| Agar | 15 |

Prosedur Pembuatan;

1. Ditimbang 40 gram bubuk medium TSA
2. Dimasukkan ke dalam erlemeyer 2 L
3. Ditambahkan aquadest sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 L
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
7. Medium dalam erlemeyer tersebut disterilisasi dalam autoclave suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit
8. Setelah disterilisasi medium didinginkan sampai suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$

9. Medium dituangkan pada cawan steril ± 20 ml per cawan petri
10. Jika sudah mengeras medium dalam cawan tersebut diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas medium
11. Jika melewati uji sterilitas medium sudah siap untuk digunakan Jika sudah mengeras medium dalam cawan tersebut diinkubasi 37°C selama 24 jam untuk uji sterilitas medium
12. Jika melewati uji sterilitas medium sudah siap untuk digunakan.

3.3.3 Uji Cakram

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 *E. coli*. Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram metode Kirby-Bauer adalah sebagai berikut:

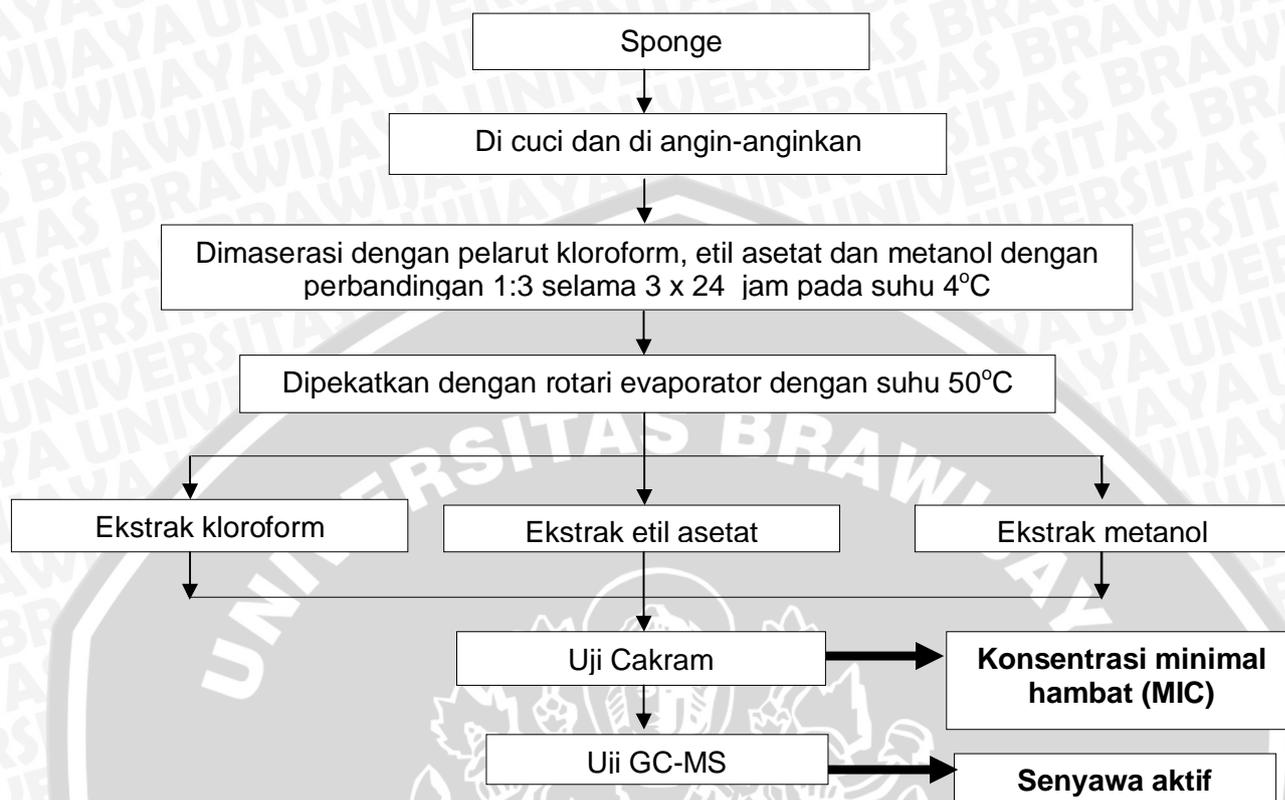
1. Lempeng agar Muller Hinton Agar (MHA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji.
2. Kapas Lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD : 0,1 CFU/ml, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.
3. Sebar mikroorganisme pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian diputar lempeng agar 90° dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga.

4. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.
5. Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5 macam dosis perlakuan, jarak antara kertas cakram harus cukup luas, sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat.
6. Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu terlalu keras karena akan merusak permukaan agar.
7. Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
8. Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata, dan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

3.3.4 Analisis GC-MS

Analisis GCMS dilakukan terhadap hasil ekstrak yang positif menunjukkan daya antibakteri terhadap bakteri *E. coli*. 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/menit, dan suhu akhir oven 290° C. Identifikasi senyawa dilakukan dengan bantuan perangkat lunak PC dengan software GCMS-QP2010S SHIMADZU. .

3.4 Skema kerja Penelitian



3.5 Parameter Uji

Parameter yang dilakukan adalah parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter daerah hambatan yang terlihat di sekitar kertas cakram (mm) dan konsentrasi penghambat minimal dari ekstrak sponge terhadap *E. coli*.

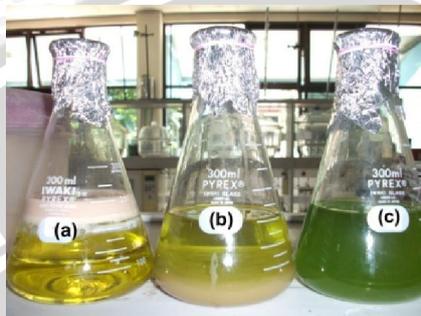
3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan uji F dan jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNJ pada taraf 5 % dan 1 % untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Ekstraksi Sponge Laut (*Haliclona sp.*)

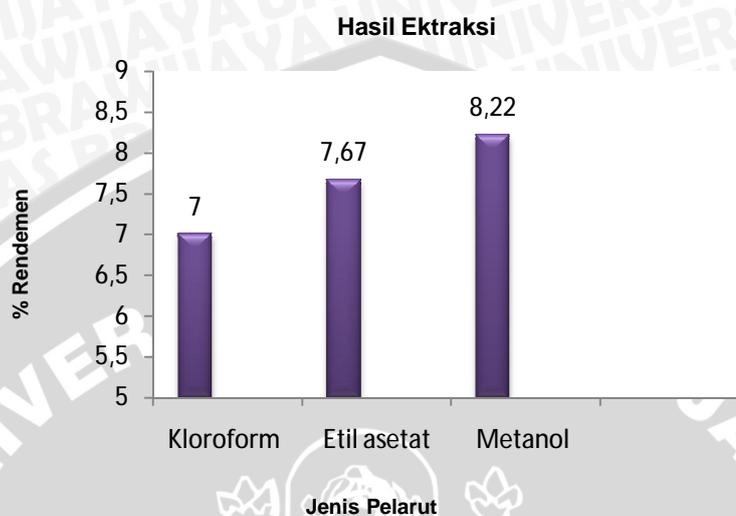
Hasil dari ekstraksi sponge *Haliclona sp.* menggunakan metode maserasi dengan pelarut kloroform, etil asetat dan metanol dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Ekstraksi Sponge *Haliclona sp.* : (a) ekstrak kloroform, (b) ekstrak etil asetat dan (c) ekstrak metanol

Gambar 4 memperlihatkan adanya perbedaan warna yang dihasilkan masing-masing pelarut pada proses ekstraksi sponge. Hasil ekstraksi dari pelarut kloroform yang merupakan pelarut non polar mendapatkan larutan ekstrak yang berwarna kuning keemasan. Hasil ekstrak dari pelarut etil asetat yang merupakan pelarut semi polar menghasilkan larutan ekstrak berwarna kuning. Sedangkan hasil ekstrak dari pelarut metanol yang merupakan pelarut polar menghasilkan larutan ekstrak berwarna hijau. Warna yang tampak pada ekstrak menunjukkan adanya kandungan pigmen yang ikut terekstrak saat maserasi misalnya warna kuning keemasan ekstrak kloroform menunjukkan pigmen carotenoid, warna kuning ekstrak etil asetat menunjukkan pigmen kuning dan warna hijau ekstrak metanol menunjukkan pigmen chlorofil. Hal ini didukung beberapa penelitian yang menunjukkan adanya pigmen yang terkandung dalam ekstrak sponge, antara lain pigmen carotenoid dan xantin (Higa, *et al.*, 1994), pigmen kuning (Elbandy, *et al.*, 2009), pigmen cholophyl a dan pheopigmen (Gilbert and Allen, 2007).

Rerata rendemen hasil ekstraksi sponge *Haliclona sp.* dengan pelarut kloroform, etil asetat dan metanol (Lampiran 1) dapat dilihat pada grafik yang ditunjukkan pada Gambar 5.



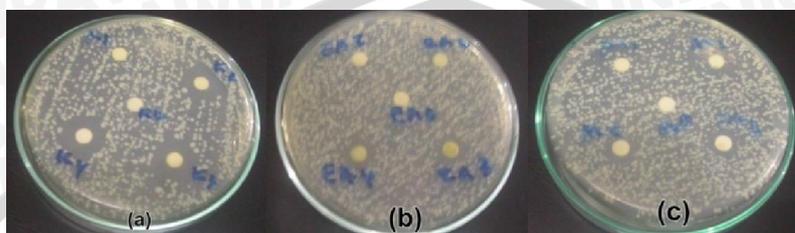
Gambar 5. Grafik Rendemen Hasil Ekstraksi Sponge

Gambar 5 memperlihatkan bahwa rerata persentase rendemen yang dihasilkan dengan pelarut Kloroform terendah sebesar 7 %, kemudian diikuti oleh pelarut Etil Asetat sebesar 7,67 % dan rerata persentase tertinggi diperoleh dengan pelarut Metanol sebesar 8,22 %. Ekstrak metanol memiliki rendemen yang paling tinggi bila dibandingkan dengan rendemen ekstrak etil asetat dan kloroform . Hal ini disebabkan karena sebagian besar kandungan bioaktif dari sponge bersifat mudah larut dalam pelarut polar sehingga menghasilkan rendemen hasil ekstrak yang lebih besar dibandingkan dengan pelarut non polar. Menurut Cowan (1999), metanol merupakan pelarut yang sering digunakan untuk melarutkan senyawa aktif dari tumbuhan. Metanol dapat melarutkan hampir semua senyawa organik yang ada pada sampel, baik senyawa polar maupun non polar. Metanol memiliki nilai indeks polaritas sebesar 5,1 sehingga diketahui bahwa komponen yang banyak terekstrak pada sampel ekstrak metanol memiliki polaritas yang hampir sama dengan polaritas metanol.

4.2 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Sponge *Haliclona* sp.

4.2.1 Pengaruh Jenis Pelarut

Hasil uji cakram terhadap *Escherichia coli* dari ekstrak kloroform *Haliclona* sp. dapat dilihat dari foto pada Gambar 6 di bawah ini.

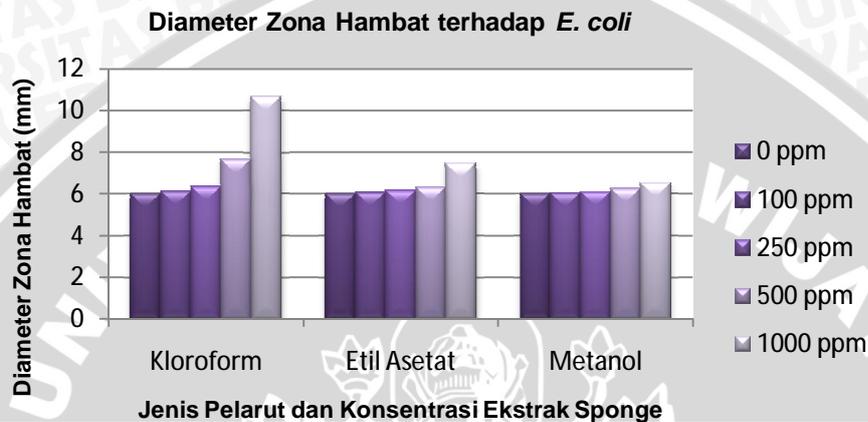


Gambar 6. Foto Hasil Uji Cakram dari Ekstrak Sponge *Haliclona* sp. : (a) ekstrak kloroform, (b) ekstrak etil asetat dan (c) ekstrak metanol

Gambar 6 memperlihatkan adanya perbedaan diameter zona bening yang dihasilkan oleh masing-masing ekstrak sponge dan konsentrasi yang berbeda. Pada ekstrak kloroform terbentuk daerah zona bening yang lebih besar dibandingkan pada ekstrak etil asetat dan metanol. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak sponge yang diekstrak dengan pelarut kloroform memiliki daya antibakteri yang paling kuat terhadap *E. coli*. Dengan kata lain, metabolit sekunder sponge yang bersifat sebagai antibakteri kemungkinan besar bersifat non polar. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Faikoh (2009) melaporkan bahwa kloroform merupakan pelarut terbaik pada ekstraksi senyawa sterol dari sponge *Geodia* sp. sebagai antibakteri *Escherichia coli*. Anton (2008) menambahkan bahwa senyawa antibakteri dari sponge merupakan senyawa non polar seperti terpenoid, steroid dan asam lemak. Hal ini menyebabkan senyawa-senyawa yang efektif sebagai antibakteri dari sponge yang bersifat non polar pada sampel hanya dapat larut dengan pelarut non polar.

4.2.2 Pengaruh Konsentrasi Ekstrak

Hasil dari uji aktivitas antibakteri *Escherichia coli* dari ekstrak kasar sponge *Haliclona sp.* dengan pelarut Kloroform, Etil Asetat dan Metanol pada konsentrasi 0 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm menggunakan metode cakram dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik Kombinasi Jenis Pelarut dan Konsentrasi Pelarut terhadap Diameter Zona Hambat *E. coli*

Gambar 7 menjelaskan bahwa diameter zona hambatan ekstrak sponge terhadap bakteri uji *E. coli* berkisar antara 6,00 mm hingga 11,06 mm. Rata-rata diameter zona hambatan yang dihasilkan oleh ekstrak sponge dengan pelarut kloroform adalah 6,01-10,67 mm. Rata-rata diameter zona hambatan yang dihasilkan oleh ekstrak sponge dengan pelarut etil asetat adalah 6,00-7,49 mm. Sedangkan untuk ekstrak sponge dengan pelarut metanol menghasilkan diameter zona hambatan yang berkisar antara 6,00 - 6,54 mm. Dari hasil penelitian, ekstrak sponge dengan pelarut kloroform memiliki diameter zona hambatan paling tinggi terhadap bakteri *E. coli* dibanding ekstrak sponge dengan menggunakan pelarut yang lain.

Menurut Wibowo, *et al.*, (2008), standar diameter zona hambatan yang dapat dinyatakan efektif menghambat jika memiliki diameter > 11 mm, dinyatakan intermediete jika memiliki diameter zona hambatan 9-11 mm dan

dinyatakan tidak efektif jika memiliki diameter zona hambat < 9 mm. Jika dibandingkan dengan standar tersebut maka ekstrak sponge *Haliclona* sp. yang diekstrak dengan pelarut etil asetat dan metanol tidak efektif dalam menghambat Bakteri *E. coli* sedangkan ekstrak yang diekstraksi dengan pelarut kloroform cukup efektif untuk menghambat bakteri *E. coli*.

Berdasarkan hasil analisis keragaman pada Lampiran 3 menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut dan konsentrasi ekstrak sponge yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap diameter zona hambat bakteri *E. coli*. Perlakuan terbaik pada penelitian ini ditunjukkan pada penggunaan ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. dengan konsentrasi 1000 ppm yang mampu memberikan diameter zona hambat terbesar.

4.2.3 Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Hasil dari diameter zona hambat terbesar ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. dapat digunakan untuk menentukan MIC 50% dengan menggunakan rumus sebagai berikut.

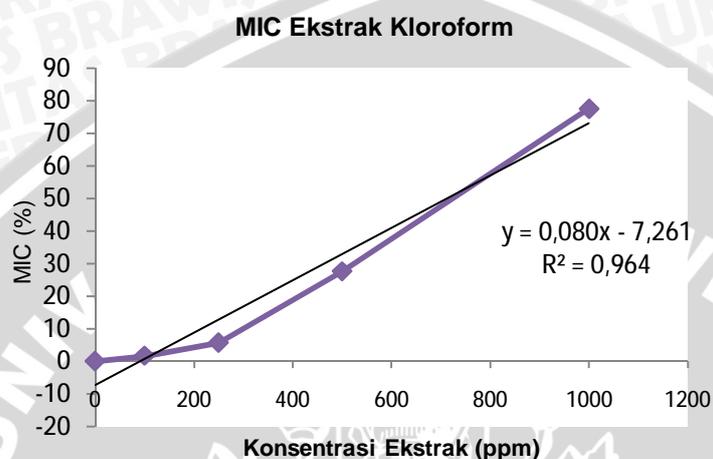
$$\text{Nilai MIC} = \frac{\text{zona hambat} - \text{zona hambat terkecil}}{\text{zona hambat terkecil}} \times 100\%$$

sehingga didapatkan hasil perhitungan MIC dari masing-masing konsentrasi dari ekstrak kloroform yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil perhitungan nilai MIC ekstrak kloroform *Haliclona* sp.

| Konsentrasi (ppm) | Rerata Diameter Zona Hambat (mm) | MIC (%) |
|-------------------|----------------------------------|---------|
| 0 | 6,01 | 0 |
| 100 | 6,11 | 1,663 |
| 250 | 6,35 | 5,657 |
| 500 | 7,67 | 27,620 |
| 1000 | 10,67 | 77,537 |

Tabel 4 menunjukkan nilai MIC dari ekstrak kloroform *Haliclona* sp. dari konsentrasi 0 ppm sampai 1000 ppm yang memiliki nilai MIC berkisar antara 0 – 77,537 %. Dari hasil tersebut dibuat grafik dengan menggunakan persamaan regresi linear yang ditunjukkan pada Gambar 8.



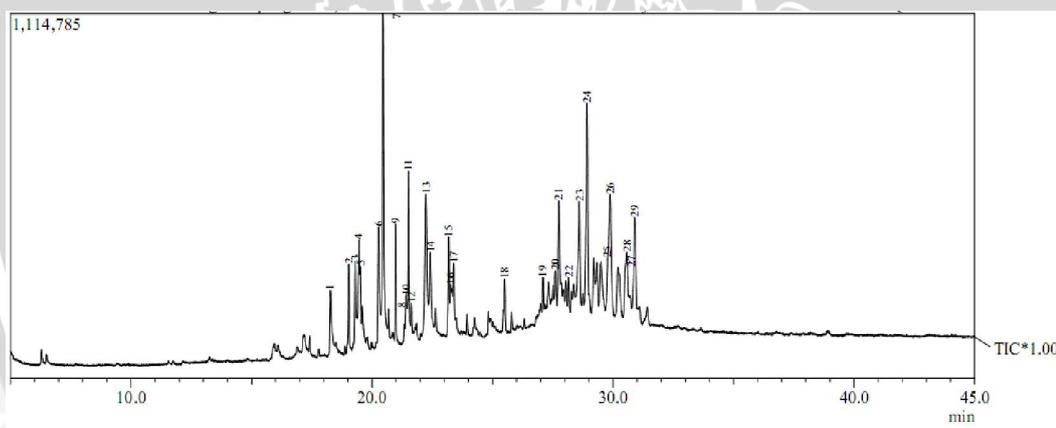
Gambar 8. Grafik Persamaan Regresi Linear MIC Ekstrak Kloroform

Gambar 8 menjelaskan bahwa penggunaan pelarut kloroform sampai konsentrasi 250 ppm diperoleh nilai MIC yang relatif stabil, tetapi begitu konsentrasi dinaikkan menjadi 500 ppm maka nilai MIC meningkat drastis. Hal ini dapat dilihat dari persamaan regresi linier yang dihasilkan yaitu $y = 0,080x - 7,261$ dengan $R^2 = 0,964$. Dari persamaan regresi linier tersebut diperoleh hasil perhitungan (Lampiran 4) nilai MIC 50% dari ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. sebesar 715,76 ppm. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Handayani, *et al.*, (2008) melaporkan bahwa komponen *epidioxysterol* yang diisolasi dari sponge *Petrosia nigra* memiliki nilai MIC sebesar 100 ppm terhadap *Escherichia coli*. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian ini memiliki nilai MIC yang lebih

besar sehingga komponen antibakteri dari ekstrak kloroform sponge *Haliclona sp.* memiliki kemampuan lebih kecil dalam menghambat bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dari ekstrak sponge *P. nigrans*. Hal ini dikarenakan bioaktif yang berfungsi sebagai antibakteri yang berasal dari sponge *Haliclona sp.* belum murni dibandingkan dengan bioaktif *epidioxy sterol* dari *P. nigrans* yang telah murni.

4.3. Analisis GC-MS

Identifikasi senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak ekstrak kloroform *Haliclona sp.* dilakukan dengan GC-MS tipe Shimadzu QP2010S. Kromatogram hasil kromatografi gas dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Kromatogram GC

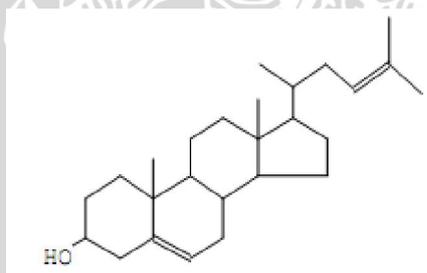
Gambar 9 menunjukkan hasil GC ekstrak sponge *Haliclona sp.* didapatkan 29 peak. Berdasarkan deteksi mass spektrometri didapatkan bahwa 3 senyawa yang dominan pada ekstrak kloroform adalah Asam Heksadekanoat, *26,27-Dinoregosta-5,23-dien-3-ol* dan *Ergosta-7,22-dien-3-ol* (Lampiran 5).

Senyawa yang paling dominan muncul yang pertama yaitu Asam Heksadekanoat. Asam Heksadekanoat muncul pada *retention time* 20,459 dan memiliki luas area sebesar 13,92 %. Asam Heksadekanoat yang memiliki rumus molekul $C_{16}H_{32}O_2$ dan berat molekul 256 merupakan suatu asam lemak yang diperkirakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian Xu, *et al.*, (2010) Asam Heksadekanoat mampu menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap strain *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Salmonella sp.* secara *in vitro*. Mekanisme kerja penghambatan bakteri dari Asam Heksadekanoat yaitu dengan merusak membran plasma sel dari bakteri tersebut, sehingga menyebabkan sitoplasma keluar sel yang selanjutnya mengakibatkan kematian sel. Menurut Prajitno (2006) bahwa kerusakan sel membran sitoplasma, ion H^+ dari senyawa akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat, dan asam fosfat. Akhirnya mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma, sehingga mengakibatkan membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan terhambat pertumbuhannya dan akhirnya mengalami kematian. Ditambahkan Mundt, *et al.*, (2003) asam lemak ini dapat merubah sifat permeabilitas membran sel, berinteraksi dengan protein dan lipid dalam membran sel, menghambat enzim tertentu atau lapisan sekitar sel. Iwalokun, *et al.*, (2004) melaporkan nilai MIC dari ekstrak Garlic yang mengandung Asam Heksadekanoat sebagai antibakteri *Escherichia coli* sebesar 22,5 mg/mL. Ini membuktikan bahwa ekstrak sponge *Haliclona sp.* dalam penelitian ini memiliki nilai MIC yang jauh lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak Garlic. Hal ini disebabkan karena senyawa asam heksadekanoat pada ekstrak sponge *Haliclona sp.* masih bersifat ekstrak kasar dan belum mengalami pemurnian. Struktur dari senyawa Asam Heksadekanoat dapat dilihat pada Gambar 10.



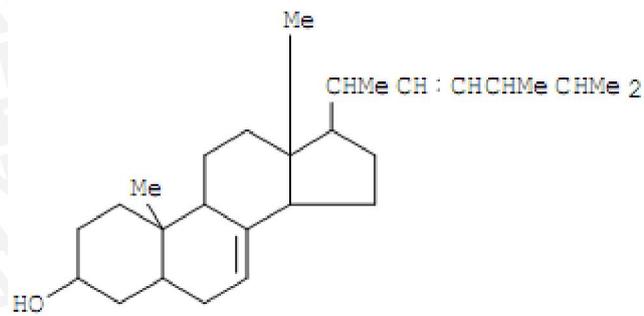
Gambar 10. Asam Heksadekanoat

Senyawa yang dominan muncul kedua adalah *26,27-Dinoreergosta-5,23-dien-3-ol* dengan similar index 80, pada retention time 29,211 serta dengan luas area 8,13 %. Senyawa yang memiliki rumus molekul $C_{26}H_{42}O$ dan berat molekul 370 ini merupakan kelompok sterol. Penelitian yang dilakukan oleh Duarte *et al.*, (2007) menunjukkan bahwa senyawa ergosterol memberikan aktivitas signifikan terhadap strain *Mycobacterium tuberculosis* dan juga pada strain *Staphylococcus aureus*. Struktur dari senyawa *26,27-Dinoreergosta-5,23-dien-3-ol (3 beta)* dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. 26,27-Dinoreergosta-5,23-dien-3-ol, (3.beta)

Senyawa yang dominan ketiga adalah *Ergosta-7,22-dien-3-ol* yang memiliki similar index 76 pada retention time 28.918 dan dengan luas area 8,12%. Senyawa ini memiliki rumus molekul $C_{28}H_{46}O$ dengan berat molekul 398. Ergosta-7,22-dien-3-ol merupakan senyawa yang tergolong sterol. Struktur kimia dari Ergosta-7,22-dien-3-ol dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Ergosta-7,22-dien-3-ol

Sterol bersifat nonpolar dan karena sterol merupakan suatu lipid yang memiliki karakter non-polar memungkinkan untuk melewati membran sel (Sarker dan Nahar, 2009). Ditambahkan oleh Solis, *et al.*, (2004), terdapatnya gugus OH pada senyawa ini dapat menyebabkan ketidakstabilan membran plasma dari bakteri dan merusak membran tersebut hingga terjadi kematian.



5. PENUTUP

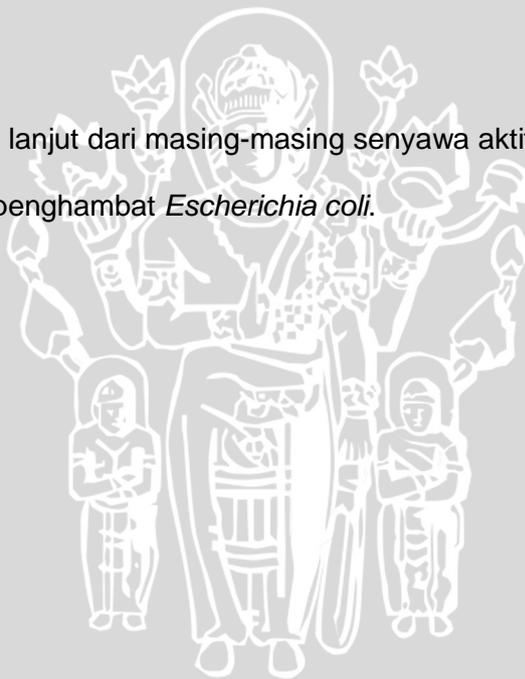
5.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. mempunyai MIC 50% terhadap *Escherichia coli* sebesar 715,76 ppm.
2. Ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. mengandung 29 senyawa aktif dan tiga senyawa dominannya adalah Asam Heksadekanoat, 26,27-Dinorergosta-5,23-dien-3-ol dan Ergosta-7,22-dien-3-ol.

5.1 Saran

Penelitian lebih lanjut dari masing-masing senyawa aktif ekstrak kloroform *Haliclona* sp. sebagai penghambat *Escherichia coli*.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, T., E. Suryati., and Muliani. 1995. Sponge bioactive screening for bactericide in shrimp culture. Indonesia Fisheries Research Journal. Vol. 1 (1): 1-10.
- Anonymous. 2010. kloroform. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 April 2010.
- _____. 2010. Etil asetat. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 April 2010.
- _____. 2010. Metanol. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 April 2010.
- _____. 2009. *E. coli*. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 3 April 2009.
- _____. 2007. Pelarut. <http://www.wikipedia.org>. Diakses tanggal 9 Oktober 2009.
- _____. 2006. Gas Kromatography Mass Spektrometer. [Http://www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org).
- Anton. 2008. Makalah : Peran Ilmu Kelautan dalam Pembangunan Indonesia. Potensi Obat dari Laut Nusantara. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Diponegoro. Semarang.
- Asai, A., T. Suragarawa and N. Nagao. 2004. Biotransformation of Focoxanthinol into Amarouciaxanthin. Drug Metabolism and Disposition. Hal 205-211
- Buckle, K.A., R.A. Edwards., G.H. Fleet and M. Wooton. 2007. Ilmu Pangan. Universitas Indonesia-Press. Jakarta.
- Cowan, M.M. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. Clin. Microbial. Rev. 12 (4): 54-582
- Day, R.A and Underwood. 1999. Analisis Kimia Kuantitatif. Penerbit Erlangga. Jakarta. Diterjemahkan Pudjaatmaka.
- Departement of Chemistry, University of Kentucky, Lexington, Kentucky and Macromolecular Sciences Team. 2004. Immobilization of Escherichia coli Cells by Use of the Antimicrobial Peptide Ceropin P1. U.S. Army Center. Massachusetts.
- Djafaar T. Dan Sri Rahayu. 2007. Cemaran Mikroba pada Produk Pertanian dan Penyakit yang Ditimbulkan dan Pencegahannya. Balai Pengkajian Teknologi Pertanian Yogyakarta. Jurnal Litbang Pertanian, 26(2), 2007.

- Duarte, N. Ferreira, Martins, Viveiros and L. Amaral. 2007. Antibacterial Activity of Ergosterol Peroxide Against *Mycobacterium tuberculosis* : dependence Upon System and Medium Employed. Faculty of Pharmacy. University of Lisbon. 1600-083. Lisboa. Portugal.
- Dzen, S., Roekistiningsih, S. Santoso dan S. Winarsih. 2003. Bakteriologi Medik. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya. Malang.
- Edrada, R.A., Wray, Handayani, D., Schupp, P., and Proksch. 2000. Bioactive Metabolites from Some Indo-Pasific Marine Invertebrates, in Studies in Natural Products Chemistry. Elsevier Science, 21, 251-254.
- Elbandy, M., P.B. Shind, J. Hong, K.S. Bae, M.A. Kim, S.M. Lee and J.H. Jung. 2009. Pyrones and Yellow Pigments from The Sponge Derived Fungus *Paecylomyces lilacinus*. Bull. Korean Chemistry. Soc. 2009. Volume 30 No.1.
- Faikoh, E.N. 2009. Studi Daya Hambat Ekstrak Sponge *Geodia sp.* sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* dan *Escherichia coli*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang.
- Fardiaz, S. 1992. *Mikrobiologi Pangan 1*. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.
- Garcia G. 2000. Animal Health and Foodborne Pathogen: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). Departement of Microbiology and Parasitology, Reference Laboratory of E.coli. Faculty of Veterinary in Lugo. University of Santiago de Compostela. Spain.
- Gilbert, J. and H.L. Allen. 2007. Chloophyl and Primary Productivity of Some Green, Freshwater Sponges. Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie und Hydrographie. 58:633-658. Department of Biological Sciences Dartmouth College Hanover. New Hampshire. USA.
- Handayani D., N. Sayuti dan Dachrianus. 2008. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri Epidioksi sterol dari Sponge Laut *Petrossia nigrans* asal Sumatera Barat. Seminar Nasional Sains dan Teknologi II 2008. Lampung.
- Harborne, JB. 2006. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Diterjemahkan oleh: Padmawinata, K dan I, Soediro. Penerbit ITB. Bandung.
- Higa, T., J. Tanaka, A. Kitamura, T. Koyama, M. Takahashi and T. Uchida. 1994. Bioactive Compounds from Marine Sponges. Pure and Appl.Chemistry vol.66 No.10. Departement of Marine Sciences. University of The Ryukyus. Okinawa 903-01. Japan.
- Isnansetyo, A., Trijoko., E.P, Setyowati dan H.H, Anshory. 2009. *In Vitro* Antibacterial of Methand Extract of A Sponge, *Geodia sp.* Against Oxytetracycline Resistent *Vibrio harveyi* and its Toxicity. Journal of Biological Science 9 (3): 224-230.

- Iwalokun, B.A., A. Ogunledun, D.O. Ogbolu, S.B. Bamiro and J.J. Omojola. 2004. In Vitro Antimicrobial Properties of Aqueous Garlic Extract Against Multidrug Resistant Bacteria and Candida species from Nigeria. *Journal of Medicinal Food* 7(3) 2004. 327-333.
- Komara, A. 1991. Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit dalam Anam C. 2000. Ekstraksi Oleoresin Jahe Kajian Dari Ukuran Bahan, Pelarut, Waktu dan Suhu. Tesis. Universitas Brawijaya. Malang.
- Lakshmi, V., S.K. Mishra, S. Srivastava, A. Chaturvedi, M.N. Srivastava and P.K. Shukla. 2010. Antifungal Activity of Marine Sponge *Haliclona exigua*. *Journal de Mycologie Medicale* 20: 31-35.
- Lay, B.H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Terpenoid dan Steroid. Universitas Sumatera Utara. Medan.
- Mundt, S., S. Kreitlow and R. Jansen, 2003. Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology*, 15: 263–267.
- Nazir, M. 1989. Metode Penelitian. PT. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Novotny, L.L., Dvorska, A., Lorencova, V., Beran, and I. Pavlik. 2004. Fish: A Potential source of bacterial pathogens for human beings. Institute of Pathological Morphology. Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Borno, Czech Republic. *Vet. Med-Czech*, 49, 2004.
- Prajitno, A. 2006. Pengendalian Penyakit *Vibrio harveyi* dengan Ekstrak Rumput laut (*Halimeda opuntia*) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab) PL-13. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Purseglove, J.W., E.G Brown., C.L Green and S.R.J Robbin. 1981. Spices. Longman Singapore Publ. Singapore.
- Putra, I. N. K. 2007. Studi Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira Serta Kandungan Senyawa Aktifnya. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Rahayu N dan F. Firdaus. 2008. Profil Food Safety Knowledge and Practice Unit-unit Rumah Tangga di Kabupaten Sleman Yogyakarta. Universitas Islam Yogyakarta.
- Satari, R dan A, Kadi,. 1994. Aktivitas Antibakteri Sponge Asal Pulau Pari. Laboratorium Produk Alam Laut Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanologi Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia. Bogor.

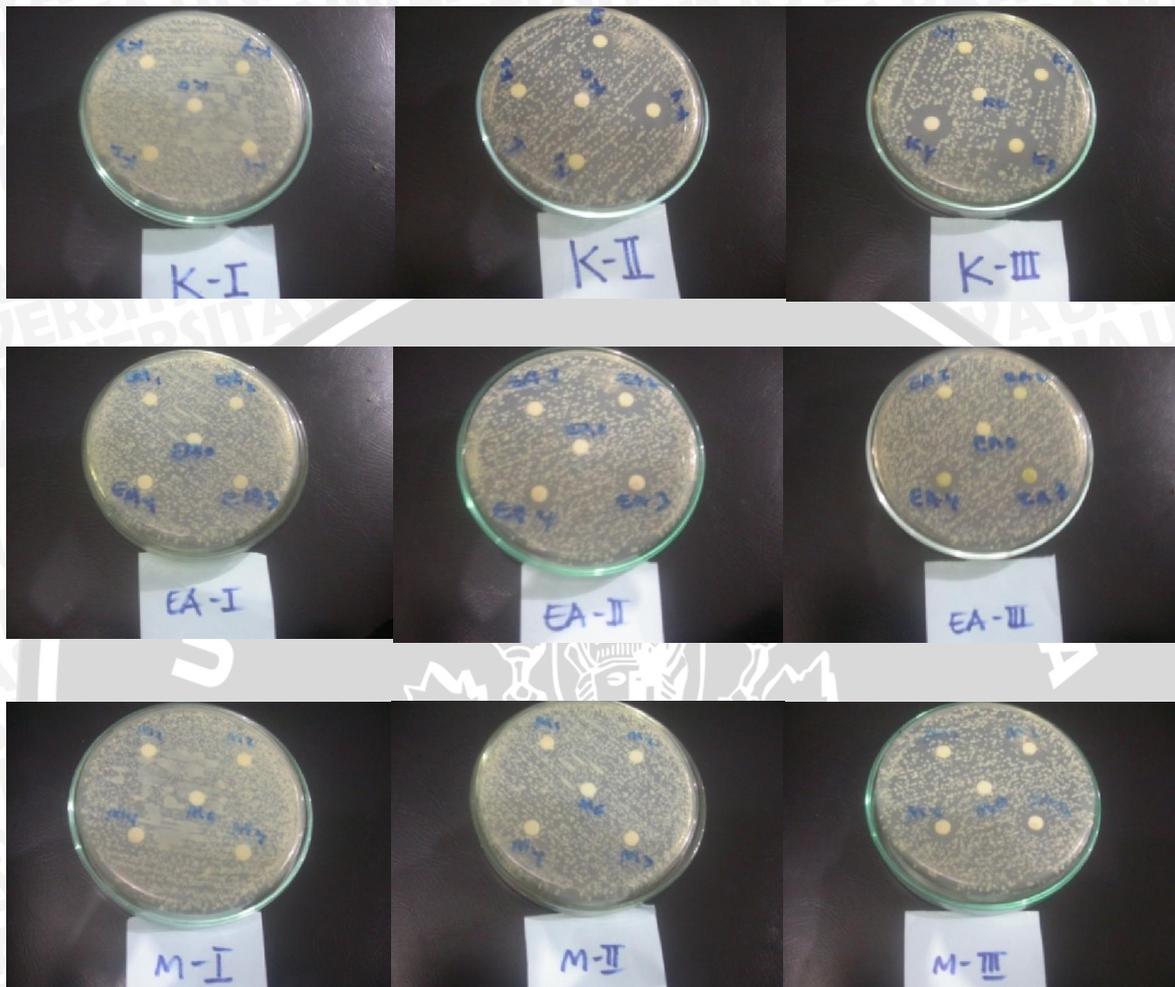
- Scheuer. 1990. Some Marine Ecological Phenomena : Chemical Basis and Biomedical Potential. Science. 248:173-177.
- Solis, G., J, Becerra., G, Flores., J, Robledo., dan M, Silva. 2004. Antibacterial and Antifungal Terpen from *Pilgerodendron univerum* (D. Don) Florin. Journal of the Chilean Chemistry Society. Chile.
- Sudarmadji, S. B. Haryono dan Suhardi. 1997. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Pusat Antar Universitas Gajah Mada. Liberty. Yogyakarta.
- Sudjadi. 1998. Metode Pemisahan. Kanisius. Yogyakarta.
- Suharyanto. 2008. Distribusi dan Persentase Tutupan Sponge (Porifera) pada Kondisi Terumbu Karang dan Kedalaman yang Berbeda di Perairan Pulau Barranglombo, Sulawesi Selatan. Jurnal Biodiversitas Volume 9, Nomor 3, Halaman: 209-212. Surakarta.
- Suparno. 2005. Kajian Demospongiae Suatu Peluang Alternatif Pemanfaatan Ekosistem Karang Indonesia dalam Dibidang Farmasi. Makalah Pribadi Falsafah Sains (PPS 7002). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Surahmad, W. 1994. Pengantar penelitian ilmiah dasar : metode teknik. Penerbit Tarsito Bandung.
- Suryabrata. S. 1988. Metodologi Penelitian. CV. Rajawali. Jakarta. 126 hal.
- Susanto, W.H. 1999. Teknologi Lemak dan Minyak Makan. Jurusan THP Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang.
- Sutedja, L., L.Z. Udin, dan A. Manupputy. 2005. Antimicrobial Activity of The Sponge *Petrossia contignata Thiele*. Sistem Informasi Dokumen Kegiatan Pusat Penelitian Kimia LIPI. Bandung.
- Vogel, A.I 1987. Textbook of Practical Organic Chemistry. Revised by Furnies B.S. 4nd Edition. New York.
- Voight, R. 1995. Buku Pelajaran Teknologi Farmasi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Diterjemahkan Soendani. Dan Setiono.
- Wibowo, W., J, gumilar., M, Alamsyah. 2008. Standart Parameter Potensi Antibiotik dalam Tinjauan Mikrobiologi. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Wijarni and D. Arfiati. 1984. Avertebrata Air. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang.
- Xu, J., R. Jia, Y. Lu and F. Yang. 2010. Antibacterial Activity of 9-Octadecanoic Acid, Hexadecanoic Acid and Tetrahydrofuran-3,4-Diyl Ester from Neem Oil. Agricultural Sciences China. Volume 9. Issue 8. August 2010. Pages 1236-1240. China Agricultural University. Beijing 100193.P.R. China.

Lampiran 1. Hasil Ekstraksi dan Pemekatan dengan Rotary evaporator

| Pelarut | Ulangan | Volume awal (mL) | Berat botol sampel (gr) | Berat botol sampel +berat sampel awal(gr) | Berat botol sampel +berat sampel akhir(gr) | Volume akhir (mL) | % Rendemen |
|-------------|---------|------------------|-------------------------|---|--|-------------------|------------|
| Kloroform | 1 | 240 | 275,4015 | 574,1254 | 310,2535 | 21 | 7 |
| | 2 | 236 | 275,4017 | 500,5211 | 297,3513 | 20 | 6,67 |
| | 3 | 245 | 275,4016 | 569,6332 | 308,2421 | 22 | 7,33 |
| Etil asetat | 1 | 254 | 275,4019 | 525,3126 | 299,3674 | 22 | 7,33 |
| | 2 | 244 | 275,4020 | 506,4701 | 277,1452 | 24 | 8 |
| | 3 | 256 | 275,4021 | 517,9625 | 281,5765 | 23 | 7,67 |
| Metanol | 1 | 266 | 275,4020 | 520,1822 | 297,2985 | 25 | 8,33 |
| | 2 | 260 | 275,4020 | 494,3221 | 278,4512 | 24 | 8 |
| | 3 | 260 | 275,4019 | 513,8189 | 281,9031 | 25 | 8,33 |



Lampiran 2. Hasil Uji Cakram Ekstrak Haliclona sp. Terhadap *E. coli*



- Keterangan:**
- K-I : Ekstrak Kloroform ulangan 1
 - K-II : Ekstrak Kloroform ulangan 2
 - K-III : Ekstrak Kloroform ulangan 3
 - EA-I : Ekstrak Etil asetat ulangan 1
 - EA-II : Ekstrak Etil asetat ulangan 2
 - EA-III : Ekstrak Etil asetat ulangan 3
 - M-I : Ekstrak Metanol ulangan 1
 - M-II : Ekstrak Metanol ulangan 2
 - M-III : Ekstrak Metanol ulangan 3

Lampiran 3. Analisis Sidik Ragam

Hasil Uji Cakram terhadap *E. coli*

| Pelarut | Konsentrasi Pelarut (ppm) | Diameter Zona Hambat (mm) | | | Total | Rerata | Deviasi |
|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------|-----------|--------|--------|----------|
| | | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3 | | | |
| Kloroform | 0 | 6,00 | 6,01 | 6,01 | 18,02 | 6,01 | 0,005774 |
| | 100 | 6,11 | 6,13 | 6,14 | 18,38 | 6,13 | 0,015275 |
| | 250 | 6,26 | 6,33 | 6,45 | 19,04 | 6,35 | 0,096090 |
| | 500 | 7,16 | 7,65 | 8,20 | 23,01 | 7,67 | 0,520288 |
| | 1000 | 10,04 | 10,91 | 11,06 | 32,01 | 10,67 | 0,550727 |
| Etil asetat | 0 | 6,00 | 6,00 | 6,01 | 18,01 | 6,00 | 0,005774 |
| | 100 | 6,05 | 6,08 | 6,10 | 18,23 | 6,08 | 0,025166 |
| | 250 | 6,11 | 6,18 | 6,21 | 18,50 | 6,17 | 0,051316 |
| | 500 | 6,25 | 6,35 | 6,36 | 18,96 | 6,32 | 0,060828 |
| | 1000 | 7,18 | 7,51 | 7,79 | 22,48 | 7,49 | 0,305341 |
| Metanol | 0 | 6,00 | 6,00 | 6,00 | 18,00 | 6,00 | 0 |
| | 100 | 6,02 | 6,04 | 6,05 | 18,11 | 6,04 | 0,015275 |
| | 250 | 6,06 | 6,10 | 6,11 | 18,27 | 6,09 | 0,026458 |
| | 500 | 6,11 | 6,30 | 6,33 | 18,74 | 6,25 | 0,119304 |
| | 1000 | 6,34 | 6,50 | 6,77 | 19,61 | 6,54 | 0,217332 |
| Total | | 97,69 | 100,09 | 101,59 | 299,37 | | |

Hipotesis:

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 = 0$$

H₁ = paling tidak ada sepasang T₁ yang tidak sama

$$FK = \frac{(\text{total})^2}{n} = \frac{(299,37)^2}{45} = 1991,6088$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Total} &= (6,00^2 + 6,01^2 + 6,01^2 + \dots + 6,77^2) - FK \\ &= 2056,3077 - 1991,6088 \\ &= 64,6989 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Ulangan} &= \frac{(97,69^2 + 100,09^2 + 101,59^2)}{15} - \text{FK} \\ &= \frac{29881,8723}{15} - 1991,6088 = 0,516 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan Kombinasi} &= \frac{(18,02^2 + 18,38^2 + 19,04^2 + \dots + 19,61^2)}{3} - \text{FK} \\ &= \frac{6164,4463}{3} - 1991,6088 = 63,2066 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan Kombinasi} - \text{JK Ulangan} \\ &= 64,6989 - 63,2066 - 0,516 \\ &= 0,9763 \end{aligned}$$

JK perlakuan kombinasi diuraikan antara faktor jenis pelarut dan konsentrasi serta interaksi.

| Pelarut | Konsentrasi (ppm) | | | | | Pelarut |
|--------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|---------|
| | 0 | 100 | 250 | 500 | 1000 | |
| K | 18,02 | 18,38 | 19,04 | 23,01 | 32,01 | 110,46 |
| EA | 18,01 | 18,23 | 18,50 | 18,96 | 22,48 | 96,18 |
| M | 18,00 | 18,11 | 18,27 | 18,74 | 19,61 | 92,73 |
| Konsentrasi | 54,03 | 54,72 | 55,81 | 60,71 | 74,10 | 299,37 |

$$\begin{aligned} \text{JK Pelarut} &= \frac{110,46^2 + 96,18^2 + 92,73^2}{5 \times 3} - 1991,6088 \\ &= 11,7817 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Konsentrasi} &= \frac{54,03^2 + 54,72^2 + 55,81^2 + 60,71^2 + 74,10^2}{3 \times 3} - 1991,6088 \\ &= 31,1456 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Interaksi} &= \text{JK Perlakuan kombinasi} - \text{JK Pelarut} - \text{JK Konsentrasi} \\ &= 63,2066 - 11,7817 - 31,1456 \\ &= 20,2793 \end{aligned}$$

Anova

| SK | db | JK | KT | F _{hitung} | F 5% | F 1% |
|---------------|----|---------|---------|---------------------|------|------|
| Ulangan | 2 | 0,5160 | 0,258 | 7,414 | 3,34 | 5,45 |
| Perlakuan | 14 | 63,2066 | 4,51475 | 129,7342 | 2,06 | 2,80 |
| Jenis Pelarut | 2 | 11,7817 | 5,89085 | 169,2773 | 3,34 | 5,45 |
| Konsentrasi | 4 | 31,1456 | 7,7864 | 223,7471 | 2,71 | 4,07 |
| Interaksi | 8 | 20,2793 | 2,5349 | 72,84195 | 2,29 | 3,23 |
| Galat | 28 | 0,9763 | 0,0348 | | | |
| Total | 44 | 64,6989 | | | | |

Kesimpulan : F_{hitung} > F_{tabel}

: Terima H₁, paling tidak ada sepasang T₁ yang tidak sama

Interpretasi : pengaruh penggunaan jenis pelarut dan konsentrasi berbeda, berpengaruh nyata terhadap efektivitas antibakteri pada sponge. Perbedaan diameter zona hambat menandakan semakin besar konsentrasi ekstrak sponge maka semakin efektif aktivitas antibakterinya.

Dari interaksi jenis pelarut dan konsentrasi berbeda nyata, dapat dicari kombinasi perlakuan terbaik dengan uji pembandingan dua perlakuan.

a. BNJ 5%

$$\begin{aligned} \text{BNJ 5\%} &= 5,32 \times \sqrt{\frac{0,0348}{3}} \\ &= 0,57 \end{aligned}$$

b. BNJ1%

$$\begin{aligned} \text{BNJ 1\%} &= 6,33 \times \sqrt{\frac{0,0348}{3}} \\ &= 0,68 \end{aligned}$$

| Perlakuan | | Rerata diameter zona hambat (mm) | Notasi | |
|-----------|-------------|----------------------------------|--------|--------|
| Pelarut | Konsentrasi | | BNJ 5% | BNJ 1% |
| K | 0 | 6,01 | a | a |
| | 100 | 6,13 | a | a |
| | 250 | 6,35 | a | a |
| | 500 | 7,67 | c | c |
| | 1000 | 10,67 | d | d |
| EA | 0 | 6,00 | a | a |
| | 100 | 6,08 | a | a |
| | 250 | 6,17 | a | a |
| | 500 | 6,32 | a | a |
| | 1000 | 7,49 | bc | bc |
| M | 0 | 6,00 | a | a |
| | 100 | 6,04 | a | a |
| | 250 | 6,09 | a | a |
| | 500 | 6,25 | a | a |
| | 1000 | 6,54 | ab | ab |

Kesimpulan : Jenis pelarut kloroform yang menggunakan konsentrasi 1000 ppm menghasilkan diameter zona hambat yang terbesar. Dari hasil tersebut maka dapat diketahui perlakuan terbaik yaitu dengan pelarut kloroform dengan konsentrasi 1000 ppm.

Lampiran 4. Perhitungan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

1. Ekstrak Kloroform

Data diameter zona hambat dari ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. adalah sebagai berikut.

| Konsentrasi (ppm) | Rerata Diameter Zona Hambat (mm) |
|-------------------|----------------------------------|
| 0 | 6,01 |
| 100 | 6,11 |
| 250 | 6,35 |
| 500 | 7,67 |
| 1000 | 10,67 |

Perhitungan nilai MIC berdasarkan rumus

$$\frac{\text{zona hambat} - \text{zona hambat terkecil}}{\text{zona hambat terkecil}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,01 - 6,01}{6,01} \times 100\% = 0\%$$

$$100 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,11 - 6,01}{6,01} \times 100\% = 1,663\%$$

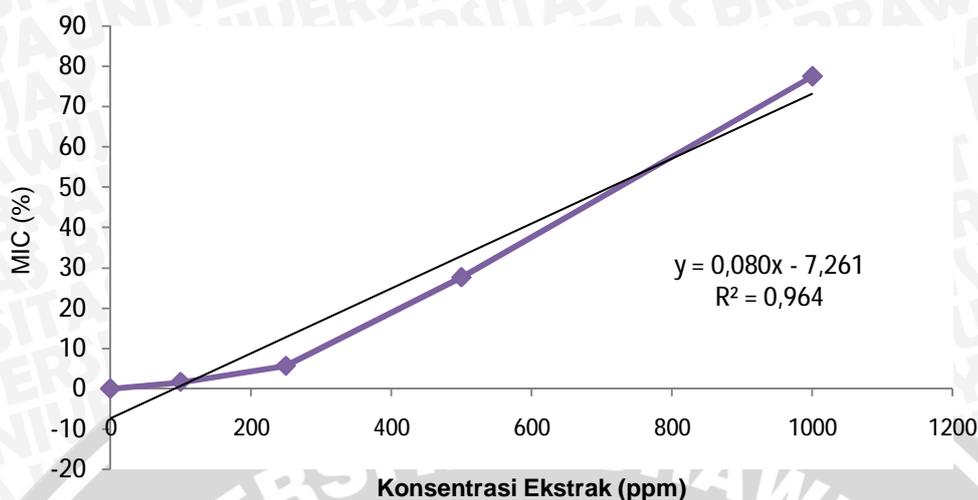
$$250 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,35 - 6,01}{6,01} \times 100\% = 5,657\%$$

$$500 \text{ ppm} \rightarrow \frac{7,67 - 6,01}{6,01} \times 100\% = 27,620\%$$

$$1000 \text{ ppm} \rightarrow \frac{10,67 - 6,01}{6,01} \times 100\% = 77,537\%$$

Hasil *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari ekstrak kloroform sponge *Haliclona* sp. dimasukkan pada persamaan regresi linear grafik yang dibuat dengan *Microsoft excel* 2007.

MIC Ekstrak Kloroform



Dari grafik tersebut didapatkan persamaan $y=0,080x-7,261$ dengan $R^2=0,964$. Sehingga dapat diketahui konsentrasi ekstrak kloroform sponge *Haliclona sp.* pada MIC 50% (x) sebesar :

$$\begin{aligned}
 y &= 0,080x-7,261 \\
 50 &= 0,080x-7,261 \\
 50 + 7,261 &= 0,080x \\
 x &= 715,76 \text{ ppm} \\
 &= 715,76 \text{ mg/L}
 \end{aligned}$$

Jadi dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak kloroform sponge *Haliclona sp.* pada MIC 50% adalah pada konsentrasi 715,76 ppm.

Dari grafik di atas dijelaskan bahwa penggunaan pelarut kloroform sampai konsentrasi 250 ppm diperoleh nilai MIC yang relatif stabil, tetapi begitu konsentrasi dinaikkan menjadi 500 ppm maka nilai MIC meningkat drastis. Hal ini dapat dilihat dari persamaan regresi linier yang dihasilkan yaitu $y=0,080x-7,261$ dengan $R^2=0,964$.

2. Ekstrak Etil Asetat

Data diameter zona hambat dari ekstrak etil asetat sponge

Haliclona sp. adalah sebagai berikut.

| Konsentrasi (ppm) | Rerata Diameter Zona Hambat (mm) |
|-------------------|----------------------------------|
| 0 | 6,00 |
| 100 | 6,08 |
| 250 | 6,17 |
| 500 | 6,32 |
| 1000 | 7,49 |

Perhitungan nilai MIC berdasarkan rumus

$$\frac{\text{zona hambat} - \text{zona hambat terkecil}}{\text{zona hambat terkecil}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,00 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 0\%$$

$$100 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,08 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 1,333\%$$

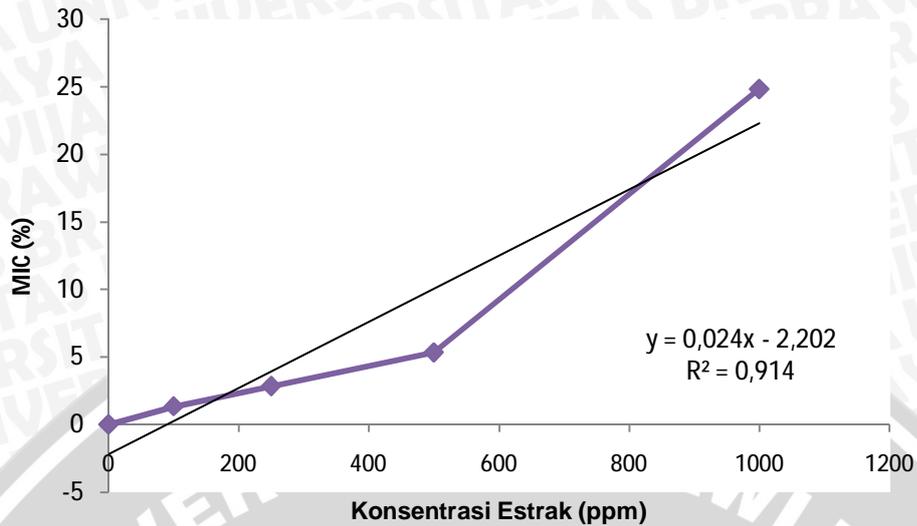
$$250 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,17 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 2,833\%$$

$$500 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,32 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 5,333\%$$

$$1000 \text{ ppm} \rightarrow \frac{7,49 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 24,833\%$$

Hasil *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari ekstrak etil asetat sponge *Haliclona sp.* dimasukkan pada persamaan regresi linear grafik yang dibuat dengan *Microsoft excel* 2007.

MIC Ekstrak Etil Asetat



Dari grafik tersebut didapatkan persamaan $y=0,024x-2,202$ dengan $R^2=0,914$. Sehingga dapat diketahui konsentrasi ekstrak etil asetat sponge

Haliclona sp. pada MIC 50% (x) sebesar :

$$\begin{aligned}
 y &= 0,024x-2,202 \\
 50 &= 0,024x-2,202 \\
 50 +2,202 &= 0,024x \\
 x &= 2175,08 \text{ ppm} \\
 &= 2175,08 \text{ mg/L}
 \end{aligned}$$

Jadi dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak Etil Asetat sponge *Haliclona sp.* pada MIC 50% adalah pada konsentrasi 2175,08 ppm.

Dari grafik di atas dijelaskan bahwa penggunaan pelarut Etil Asetat memiliki nilai MIC yang mengalami sedikit peningkatan. Hal ini dapat dilihat dari persamaan regresi linier yang dihasilkan yaitu $y= 0,024x-2,202$ dengan $R^2=0,914$

3. Ekstrak Metanol

Data diameter zona hambat dari ekstrak Metanol sponge *Haliclona* sp. adalah sebagai berikut.

| Konsentrasi (ppm) | Rerata Diameter Zona Hambat (mm) |
|-------------------|----------------------------------|
| 0 | 6,00 |
| 100 | 6,04 |
| 250 | 6,09 |
| 500 | 6,25 |
| 1000 | 6,54 |

Perhitungan nilai MIC berdasarkan rumus

$$\frac{\text{zona hambat} - \text{zona hambat terkecil}}{\text{zona hambat terkecil}} \times 100\%$$

$$0 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,00 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 0\%$$

$$100 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,04 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 0,667\%$$

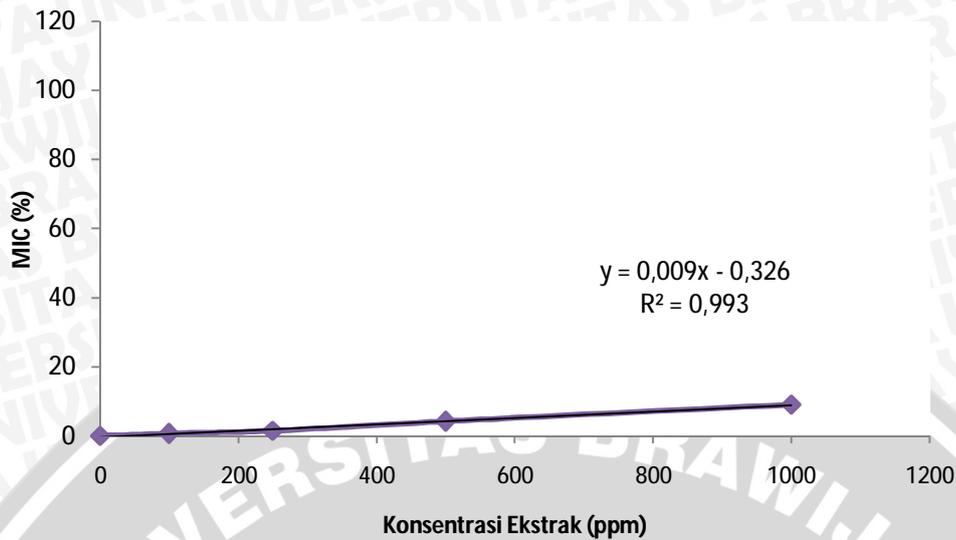
$$250 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,09 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 1,5\%$$

$$500 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,25 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 4,167\%$$

$$1000 \text{ ppm} \rightarrow \frac{6,54 - 6,00}{6,00} \times 100\% = 9\%$$

Hasil *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dari ekstrak metanol sponge *Haliclona* sp. dimasukkan pada persamaan regresi linear grafik yang dibuat dengan *Microsoft excel* 2007.

MIC Ekstrak Metanol



Dari grafik tersebut didapatkan persamaan $y=0,009x-0,326$ dengan $R^2=0,993$. Sehingga dapat diketahui konsentrasi ekstrak metanol sponge

Haliclona sp. pada MIC 50% (x) sebesar :

$$\begin{aligned}
 y &= 0,009x-0,326 \\
 50 &= 0,009x-0,326 \\
 50 +0,326 &= 0,009x \\
 x &= 5591,78 \text{ ppm} \\
 &= 5591,78 \text{ mg/L}
 \end{aligned}$$

Jadi dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak metanol sponge *Haliclona sp.* pada MIC 50% adalah pada konsentrasi 5591,78 ppm.

Dari grafik di atas dijelaskan bahwa penggunaan pelarut metanol sampai konsentrasi 100 ppm diperoleh nilai MIC yang relatif konstan Hal ini dapat dilihat dari persamaan regresi linier yang dihasilkan yaitu $y=0,009x-0,326$ dengan $R^2=0,993$

Lampiran 5. Hasil Analisis GC-MS

Data senyawa yang terkandung sponge *Haliclona sp.*

| Peak | Nama senyawa | Rumus molekul | Berat molekul | % area |
|------|---|---|---------------|--------|
| 1 | Tetradecanoic acid | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | 228 | 2,60 |
| 2 | Neophytadiene | C ₂₀ H ₃₈ | 278 | 1,87 |
| 3 | 1,2-Epoxyoctadecane | C ₁₈ H ₃₆ O | 268 | 2,36 |
| 4 | Octadecanoic acid, 2-propenyl ester | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ | 324 | 3,63 |
| 5 | 1,2-Dihexylcyclopropene | C ₁₅ H ₂₈ | 208 | 1,12 |
| 6 | 9-Hexadecenoic acid | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | 254 | 4,90 |
| 7 | Asam Heksadekanoat | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 13,92 |
| 8 | Asam Heksadekanoat,ethyl ester | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 1,92 |
| 9 | Asam Heksadekanoat,1-methylethyl ester | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 298 | 1,20 |
| 10 | Octadecanoic acid,3-hydroxypropyl ester | C ₂₁ H ₄₂ O ₃ | 342 | 2,67 |
| 11 | Octadecanoic acid,2-propenyl ester | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ | 324 | 1,56 |
| 12 | Octadecanoic acid,ethenyl ester | C ₂₀ H ₃₈ O ₂ | 310 | 4,49 |
| 13 | 9-Octadecenal | C ₁₈ H ₃₄ O | 266 | 0,74 |
| 14 | Octadecanoic acid | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 28 | 7,72 |
| 15 | 6-Nitro-cylohexadecane-1,3-dione | C ₁₆ H ₂₇ NO ₄ | 297 | 2,88 |
| 16 | Asam Heksadekanoat | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 256 | 2,87 |
| 17 | Octadecanoic acid,2-propenyl ester | C ₂₁ H ₄₀ O ₂ | 324 | 2,63 |
| 18 | Nonadecanenitrile | C ₁₉ H ₃₇ N | 279 | 1,52 |
| 19 | 1-Octanol, 2-buthyl | C ₁₂ H ₂₆ O | 186 | 0,92 |
| 20 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester | C ₂₆ H ₄₂ O ₄ | 418 | 0,89 |
| 21 | Cholestan-24-one, 3,12-dihidroxy | C ₂₇ H ₄₆ O ₃ | 418 | 0,83 |
| 22 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dinonyl ester | C ₂₆ H ₄₂ O ₄ | 418 | 1,12 |
| 23 | Retinol | C ₂₀ H ₃₀ O | 286 | 4,27 |
| 24 | Ergosta-7,22-dien-3-ol | C ₂₈ H ₄₆ O | 398 | 8,12 |
| 25 | Pregn-17(20)-en-ol, 20,21-[(methylborylene)bis(oxy)] | C ₂₂ H ₃₅ BO ₃ | 358 | 3,91 |
| 26 | 26,27-Dinoreergosta-5,23-dien-3-ol, (3.beta) | C ₂₆ H ₄₂ O | 370 | 8,13 |
| 27 | 1H-Cycloprop[e]azulen-4-ol, decahydro-1,1,4,7-tetramethyl | C ₁₅ H ₂₆ O | 222 | 2,48 |
| 28 | Pregn-5-en-20-one, 3-(acetyloxy)-17-hydroxy-, (3.beta) | C ₂₃ H ₃₄ O ₄ | 374 | 3,25 |
| 29 | Pregn-5-en-20-one, 3,17-dihydroxy-,(3.beta) | C ₂₁ H ₃₂ O ₃ | 332 | 3,93 |

Lampiran 6. Dokumentasi Proses Penelitian



Gambar 1. Sponge (*Haliclona* sp.) di habitat aslinya



Gambar 2. Pengambilan Sponge



Gambar 3. Di cuci dan di angin-anginkan



Gambar 4. Perajangan sponge



Gambar 5. Proses maserasi



Gambar 6. Proses Penyaringan



Gambar 7. Proses pengentalan dengan rotari



Gambar 8. Ekstrak sponge kasar

Lampiran 7. Instrumen GC-MS (GC-MS QP2010S SHIMADZU)

