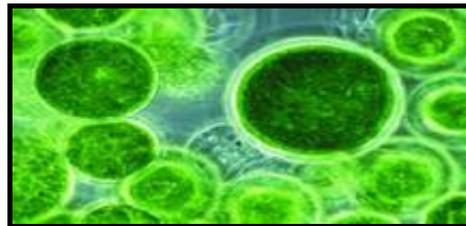


## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Menurut Haryoto dan A. Wibowo (2004), plankton merupakan suatu organisme yang berukuran kecil yang hidupnya melayang-layang terombang-ambing oleh arus di lautan bebas. Fitoplankton terdiri dari makhluk hidup hewan yang disebut zooplankton dan tumbuh-tumbuhan yang disebut fitoplankton. Fitoplankton yang bersel satu yang penting adalah golongan diatom dan dinoflagelata. Beberapa kelompok dinoflagelata yang biasa terdapat di perairan adalah *Chlorella sp*, *Dunaliella sp*, *Tetracelmis chuii* dan *Spirulina*. *Chlorella sp*. merupakan salah satu jenis fitoplankton dengan sistematika sebagai berikut:

Filum : Chlorophyta  
Kelas : Chlorophyceae  
Ordo : Chlorococcales  
Familia : Chlorellaceae  
Genus : Chlorella  
Spesies : *Chlorella sp*.



**Gambar 1. *Chlorella vulgaris***  
Sumber: google images, 2015

*Chlorella vulgaris* merupakan salah satu jenis mikroalga hijau yang berbentuk bulat atau bulat telur, serta memiliki kloroplas seperti cawan, dengan dinding yang keras, padat dan garis tengahnya 5  $\mu\text{m}$ . *Chlorella sp*. merupakan kelompok alga yang paling beragam, dengan lebih dari 7000 spesies yang dapat tumbuh dalam habitat yang beragam. *Chlorella sp*. menggunakan energi cahaya sebagai bahan bakar penghasil gula. *Chlorella sp*. merupakan tumbuhan akuatik yang berkembang biak secara seksual dan aseksual. Pada umumnya, *C. vulgaris* digunakan sebagai pakan larva-larva biota laut seperti ikan, kerang dan udang yang langsung diberikan bersama media cair. Begitu pula untuk bahan

baku pakan dan pangan biomassa *chlorella* harus bebas dari unsur kimia anorganik yang membahayakan (Amini dan Syamdidi, 2005).

## 2.2 Pelarut

### 2.2.1 Etanol

Etanol adalah senyawa organik yang terdiri dari karbon, hidrogen dan oksigen, sehingga dapat dilihat sebagai turunan senyawa hidrokarbon yang mempunyai gugus hidroksil dengan rumus  $C_2H_5OH$ . Etanol merupakan zat cair, tidak berwarna, berbau spesifik, mudah terbakar dan menguap, dapat bercampur dalam air dengan segala perbandingan. Secara garis besar penggunaan etanol adalah sebagai pelarut untuk zat organik maupun anorganik, bahan dasar industri asam cuka, ester, spiritus, asetaldehid, antiseptik dan sebagai bahan baku pembuatan eter dan etil ester, Etanol juga untuk campuran minuman dan dapat digunakan sebagai bahan bakar (gasohol) (Wiratmaja *et al.*, 2011).

Menurut Seftian *et al.*, (2012), etanol diproduksi dengan cara fermentasi menggunakan bahan baku hayati. Etanol atau *Etil Alcohol* (lebih dikenal dengan alkohol, dengan rumus kimia  $C_2H_5OH$ ) adalah cairan tak berwarna dengan karakteristik antara lain mudah menguap, mudah terbakar, larut dalam air, tidak karsinogenik dan jika terjadi pencemaran tidak memberikan dampak lingkungan yang signifikan. Indonesia memiliki bahan baku untuk memproduksi etanol. Tanaman yang berpotensi menghasilkan etanol yang sangat melimpah diantaranya nira, tanaman berpati ataupun tanaman berselulosa. Bahan baku yang dapat dibuat etanol diantaranya:

1. Bahan yang mengandung glukosa

Bahan ini ada pada tetes tebu / molasse, nira aren, nira kelapa, nira tebu, sari buah-buahan dan lain-lain.

2. Bahan yang mengandung pati / karbohidrat

Bahan ini terdapat pada umbi-umbian seperti sagu, singkong, ketela, gapek, ubi jalar, talas, ganyong, jagung dan lain-lain.

3. Bahan yang mengandung selulosa

Selulosa terdapat dalam serat seperti serat kayu, serat tandan kosong kelapa sawit, serat pisang, serat nanas, ampas tebu dan lain-lain.

### 2.2.2 Etil Asetat

Etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, berbau khas. 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 (Minarni *et al.*, 2013).

Etil asetat merupakan pelarut dengan toksisitas rendah yang bersifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar. Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah. Etil asetat bersifat semi polar sehingga mampu menarik senyawa aglikon maupun glikon. Ekstrak yang diperoleh berwarna kuning pekat kemudian diuapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak kental. Etil asetat yang merupakan pelarut semi polar mampu menarik senyawa-senyawa dengan rentang polaritas lebar dari polar hingga nonpolar (Rinakit, 2011).

### 2.2.3 N-Heksan

Pelarut N-heksan merupakan salah satu pelarut yang baik untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non-polar karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya karena pelarut ini bersifat relatif stabil, mudah menguap serta selektif dalam melarutkan zat (Deky, 2013).

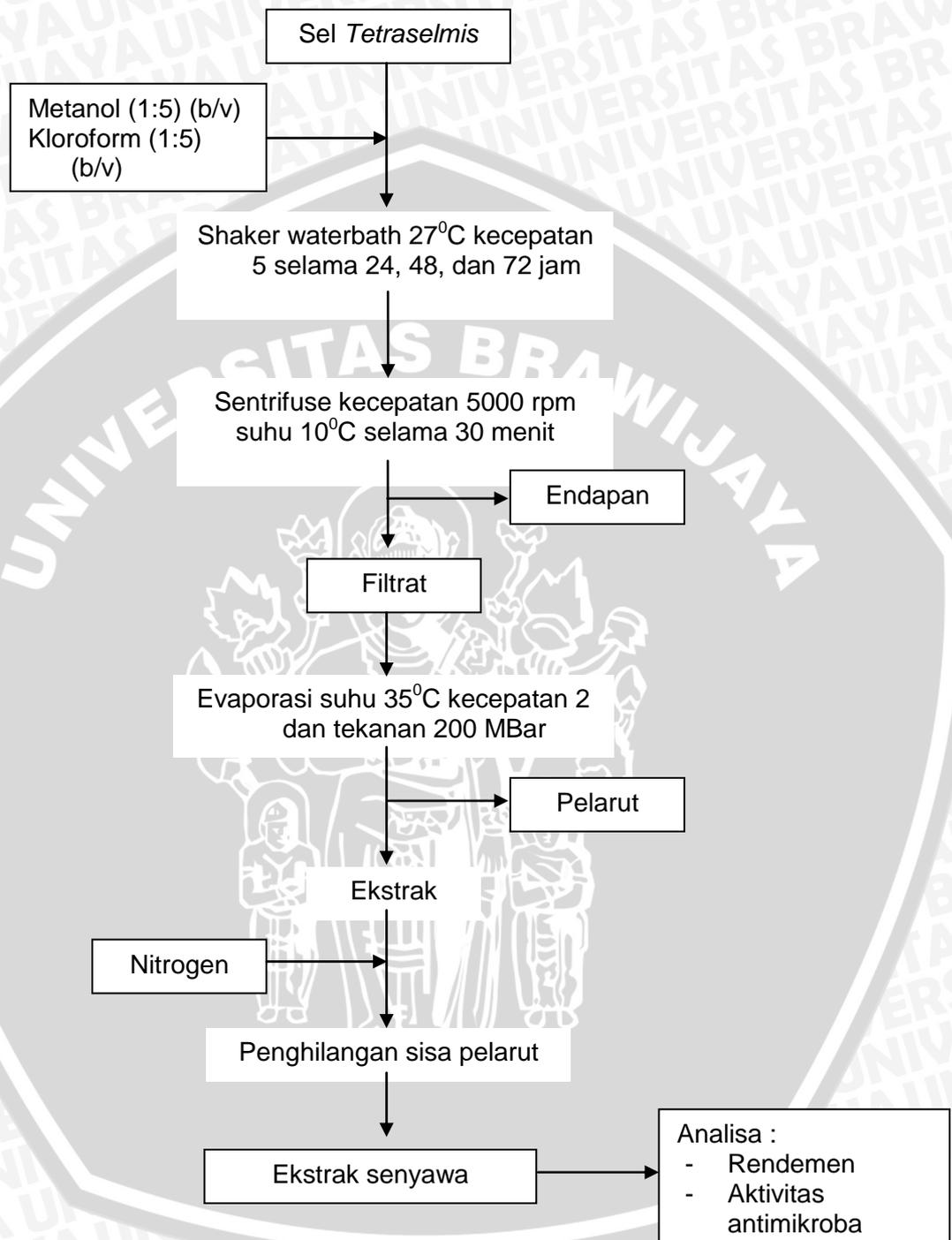
Ekstraksi dengan heksana bertujuan untuk menghilangkan senyawa-senyawa nonpolar alami, terutama senyawa-senyawa lilin tanaman, minyak nabati dan sebagian minyak atsiri. Senyawa minyak dan lipida lainnya mempunyai ukuran molekul besar sehingga tidak dapat masuk ke dalam dinding sel dan menjadi penghalang masuknya minyak atsiri dan komponen fitokimia lainnya ke dalam sel bakteri uji, akibatnya sel tetap akan tumbuh (Fitrial *et al.*, 2008).

### 2.3 Ekstraksi

Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueus phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueus phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organik. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1978).

Menurut Hayati (2011), dalam bidang pengobatan bahan-bahan alam digunakan dalam bentuk ekstrak karena lebih spesifik mengandung zat-zat hasil ekstraksi, dalam hal ini adalah protein. Cacing tanah diekstraksi ke dalam bentuk ekstrak air dengan metode dekokta. Dekokta adalah metode ekstraksi dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit. Metode dekokta dipilih karena zat aktif yang dituju bersifat relatif polar (larut air).

Menurut Widayanti (2012), prosedur untuk melakukan ekstraksi dengan metode maserasi, sebagai berikut:



Gambar 2. Diagram alir ekstraksi senyawa antimikroba dari *Tertaselmis chuii* metode maserasi (Widayanti, 2012).

Macam-macam metode ekstraksi menurut Harborne (1984), adalah sebagai berikut:

1. Maserasi: Metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan.
2. Diakolasi: Metode ekstraksi dengan penambahan tekanan udara.
3. Dekoksi (rebus): Metode paling sederhana dan mudah dilakukan menggunakan bahan yang larut air dan stabil terhadap panas.
4. Ekstraksi lengkap: Metode ekstraksi yang melibatkan ekstraksi berturut-turut menggunakan pelarut non polar, semi polar, dan pelarut polar
5. Arus balik: Metode ekstraksi secara berkesinambungan dimana sampel dan pelarut saling bertemu melalui gerakan aliran yang berlawanan.
6. Sonikasi: Metode ekstraksi menggunakan gelombang suara atau getaran dengan frekuensi antara 20 KHz-2000KHz.

#### 2.4 Senyawa Bioaktif

*Chlorella sp.* mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut *Phycocyanin* merupakan protein kompleks. *Phycocyanin* merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi. Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella sp.* disebut darah hijau (*green blood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella sp.* terdapat warna kuning oranye merupakan kandungan karoten terdiri dari *xanthopill*, *myxoxanthopill*, *zeaxathin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *fucoxanthin*, *violaxanthin* dan *astaxanthin*. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella sp.* per 10 g yaitu 0,37%. Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan. *Chlorella sp.* mengandung polisakarida sebanyak 15-25 g merupakan karbohidrat yang mudah

diserap didalam darah. Pada *Chlorella sp.* kering terdapat enzim *Superoxide dismutase* (SOD) sekitar 10.000-37.500 unit per 10 g yang merupakan anti radikal bebas untuk mencegah penuaan dini (Yadial *et al.*, 2011).

## **2.5 Antibakteri**

### **2.5.1 Mekanisme Kerja Antibakteri**

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

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

### **2.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri**

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

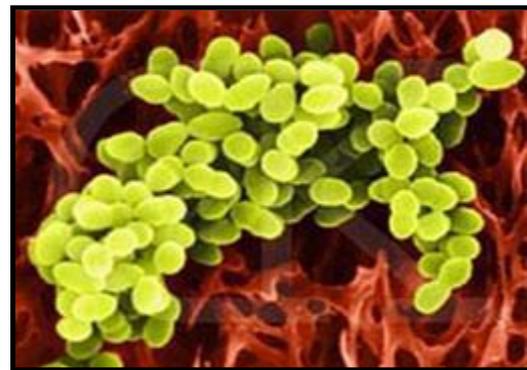
Prosedur difusi-kertas cakram-agar (metode Kirby-Bauer, 1996) yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakkan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

## 2.6 Bakteri Uji

### 2.6.1 *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* menurut Salle (1961), adalah sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteryales
Suku	: Myrococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>



**Gambar 3. *Staphylococcus aureus***

Sumber: google images, 2015

*Staphylococcus* merupakan bakteri gram positif berbentuk kokus dan tergolong dalam familia micrococcaceae. *Staphylococcus* bersifat anaerobik fakultatif dan relatif tahan terhadap pengeringan. Salah satu spesies dari genus

*Staphylococcus* yang terdapat pada daging sapi adalah *Staphylococcus aureus* yang bersifat anaerobik fakultatif dan dalam pertumbuhannya membutuhkan nitrogen organik (asam amino). *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada suhu 6 sampai 46°C, rentang pH 4,2 sampai 9,3 dan nilai Aw (water activity) antara 0,83 dan 0,99. *Staphylococcus aureus* relatif mudah dimatikan dengan aktivitas antibakteria rempah-rempah. *Staphylococcus* yang tumbuh pada bahan pangan dan membentuk toksin dengan menyebabkan intoksikasi (keracunan) bagi konsumennya. Toksin *Staphylococcus* juga dapat menimbulkan bermacam-macam penyakit seperti bisul, meningitis, osteomyelitis pneumonia dan mastitis pada, manusia dan hewan (Kristiani, 2005).

*S. aureus* termasuk bakteri gram positif, berbentuk bulat, berdiameter 0.1–0.5 µm, satu-satu atau berpasangan, tidak bergerak, dinding sel mengandung dua komponen utama, peptidoglikan dan asam-asam teikoat. Metabolisme aerob dan anaerob biasanya peka terhadap panas terutama di permukaan kulit, kelenjar kulit dan selaput lendir. *S. aureus* mudah tumbuh pada berbagai pembenihan atau metabolisme yang aktif, meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas dan meragikan pigmen yang bervariasi dari putih sampai kuning tua. *Staphylococcus* patogen sering menghemolisis darah dan mengkoagulasi plasma, beberapa diantaranya tergolong flora normal kulit dan selaput lendir manusia (Ngaisah, 2010).

## **2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif**

### **2.7.1 Uji Well Difussion (Difusi Sumuran)**

Prosedur difusi-kertas cakram-agar (metode Kirby-Bauer, 1996) yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang

terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakkan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

### **2.7.2 MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)**

Penentuan konsentrasi minimum penghambatan (MIC = *minimum inhibitory concentration*) dilakukan dengan metode kubo (1992) pada konsentrasi 0-1,55 mg/mL. Ekstrak dicampur dengan kultur bakteri uji dalam inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm selama 24 jam. Total mikroba dihitung dengan metode hitungan cawan. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan konsentrasi minimum pertumbuhan (MBC = *minimum bacterial concentration*) merupakan konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri uji (Fitrial *et al.*, 2008).

Nilai MIC merupakan konsentrasi terendah dari tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Untuk mengetahui nilai MBC, dilakukan *streak* pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MBC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut (Roihanah *et al.*, 2012).

KHM ditentukan dengan membandingkan absorbansi setelah perlakuan inkubasi dikurangi absorbansi sebelum perlakuan. Apabila terdapat konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri, ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan (OD bakteri adalah  $\leq 0$ ), maka didapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) (Fatisa, 2013).

### 2.7.3 MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*)

Inokulum awal digunakan untuk menentukan KBM dimana telah disebutkan bahwa KBM merupakan konsentrasi terendah yang memungkinkan pertumbuhan hanya  $<0,1\%$  dari jumlah inokulum awal, sehingga  $0,1\%$  dari jumlah inokulum awal data diatas sebesar 44 koloni (11). Pada konsentrasi 10% didapatkan hanya isolat II yang mengalami pertumbuhan bakteri sedangkan isolat I, III, dan isolat IV tidak mengalami pertumbuhan koloni bakteri. Pada konsentrasi 10% belum dapat dikatakan sebagai KBM dikarenakan rata-rata jumlah pertumbuhan koloninya sebesar 342 ( $>44$  koloni) atau dengan kata lain pertumbuhan koloninya  $>0,1\%$  dari jumlah inokulum awal (Ardanarudin *et al.*, 2004).

Untuk menentukan nilai KBM dilakukan uji lanjutan, yaitu terhadap semua tabung yang digunakan dalam KHM yang tidak menunjukkan kekeruhan apapun terhadap bakteri, dengan cara mengambil 0,2 mL dari suspensi yang menunjukkan KHM tersebut, lalu ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml media NB steril. Tabung reaksi diinkubasi selama 12-18 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi (OD) dengan spektrofotometer UV-Vis ( $\lambda = 480 \text{ nm}$ ). Apabila hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi terendah ekstrak mempunyai OD adalah 0 (tidak ada kekeruhan), maka didapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau *Minimum Bacteriocidal Concentration* (MBC) (Fatisa, 2013).

Untuk mengetahui nilai MBC, dilakukan *streak* pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MBC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut (Roihanah *et al.*, 2012).

#### 2.7.4 Uji Kualitatif Fitokimia

Skrining fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam penelitian fitokimia. Secara umum dapat dikatakan bahwa sebagian besar metodenya merupakan reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Metode yang digunakan atau dipilih untuk melakukan skrining fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain sederhana, cepat, dapat dilakukan dengan peralatan minimal, bersifat semikuantitatif yaitu memiliki batas kepekaan untuk senyawa yang bersangkutan, selektif terhadap golongan senyawa yang dipelajari, dan dapat memberikan keterangan tambahan ada atau tidaknya senyawa tertentu dalam dari golongan senyawa yang dipelajari. Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, buah, bunga, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif seperti alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), dan sebagainya. Adapun tujuan pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan (Sundari, 2010).

Menurut Otari (2013), penapisan fitokimia dilakukan dengan menguji adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, dan fenolik. Prosedur pengujiannya adalah sebagai berikut:

a. Identifikasi Alkaloid

Untuk mengidentifikasi alkaloid, ekstrak dilarutkan dengan etanol 96% kemudian ditambahkan asam klorida encer 2 N. Filtrat yang diperoleh disaring kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Boauchardat LP, Drangendorff LP. Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif dragendorff LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Penambahan bouchardat LP memberikan hasil positif jika terbentuk endapan coklat sampai hitam.

b. Identifikasi Saponin

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kuning dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

c. Identifikasi Flavonoid

Tiga metode yang digunakan untuk menguji flavonoid. Pertama, amonia encer (5 mL) ditambahkan ke sebagian filtrat encer dari ekstrak. Kemudian sulfat pekat (1 mL) ditambahkan. Hilangnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid. Kedua, beberapa tetes larutan aluminium 1% ditambahkan ke sebagian dari filtrat, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid. Ketiga, sebagian dari ekstrak dipanaskan dengan 10 mL etil asetat yang telah diuapkan selama 3 menit. Campuran kemudian disaring dan 4 mL filtrat dikocok dengan penambahan 1 mL larutan amonia encer, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

d. Identifikasi Terpenoid

Sejumlah 0,5 g ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 2 mL kloroform. Kemudian dengan hati-hati ditambahkan (3 mL)  $H_2SO_4$  pekat sampai

membentuk lapisan, terbentuknya warna merah kecoklatan pada permukaan menunjukkan adanya terpenoid.

e. Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak digunakan dalam 10 mL air dalam tabung reaksi dan kemudian disaring. Ditambahkan beberapa tetes  $\text{FeCl}_3$  0,1% dan diamati perubahan warna menjadi hijau kecoklatan atau biru kecoklatan.

f. Identifikasi Fenolik

Sejumlah ekstrak ditambahkan 3-4 tetes larutan besi klorida, terbentuknya warna kebiru-biruan menunjukkan adanya fenolik.

### 2.7.5 Uji LC – MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) adalah suatu metode pemisahan modern dalam analisa farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas dan uji kemurnian. Yang menjadi titik beratnya yaitu untuk menganalisa senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak dapat dianalisis dengan Kromatografi Gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisa menggunakan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul. (Lindsay, 1992).

Menurut Ginting (2008), *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bioanalisis dimulai pada akhir tahun 1980an. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS antara lain:

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer massa “klasik”, penerapan LC-MS/MS tidak terbatas

untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da).

Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.

3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya informasi. Sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

