

UJI FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT, KLOOROFORM DAN PETROLEUM ETER EKSTRAK METANOL ALGA COKLAT *Sargassum vulgare* DARI PANTAI KAPONG PAMEKASAN MADURA

Siti Khoiriyah, Ahmad Hanapi, A. Ghanaim Fasya

Jurusan Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

ABSTRACT

Based on the Allah's decree in surah An Nahl verse 14, Allah SWT given His pleasures such seas and its contents for human being so as to thankfully for His sakes. Biological varieties like algae need to be used by its existences. One kind of algae species was brown algae called *Sargassum vulgare*. The purposes of this research were to conduct fraction which given highest antibacterial activity toward *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. Besides that, this study attempt to identify the active compound that contained in fraction which gives the highest antibacterial activity.

Kind of brown algae *Sargassum vulgare* is macerated to methanol then the methanol extract is hydrolyzed with HCl 2 N catalyst and neutralized to NaHCO₃. The result of hydrolyze partitioned to etil acetate, chloroform and petroleum ether. The chosen organic layer is tested its antibacterial activities using disk diffusion methods toward *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria with extract concentration 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 and 10 %. The fraction which gives highest antibacterial activity will be identifying its compound category using reagent test (phytochemical) then separated with thick layer of chromatography analytic (TLC).

The result of this research showed that fraction which can bring highest antibacterial activity was etil acetate. The highest antibacterial activity obtained by the most high concentration 10 %, with zone of inhibition 8,5 mm towards *Staphylococcus aureus* and 6 mm towards *Escherichia coli* bacteria. According to phytochemical test result, it showed the active compound group that already existed in etil acetate fraction is steroid. Based on segregation using thick layer chromatography analytics, it is acquired 6 spots which categorized in steroid compound.

Keywords: Antibacterial, fraction, brown algae *Sargassum vulgare*.

ABSTRAK

Berdasarkan firman Allah SWT QS an Nahl ayat 14, Allah SWT telah memberikan nikmatNya berupa lautan beserta isinya agar manusia dapat bersyukur. Keragaman hayati dari laut berupa alga perlu dimanfaatkan keberadaannya. Salah satunya adalah alga coklat jenis *Sargassum vulgare*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui fraksi pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri tertinggi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* serta untuk mengidentifikasi golongan senyawa aktif yang terkandung dalam fraksi pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri tertinggi.

Alga coklat *S. vulgare* dimaserasi dengan metanol kemudian ekstrak metanol yang diperoleh dihidrolisis dengan katalis HCl 2 N dan dinetralkan dengan NaHCO₃. Ekstrak hasil hidrolisis dipartisi dengan etil asetat, kloroform, dan petroleum eter. Lapisan organik yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode difusi cakram terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dengan konsentrasi ekstrak 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5 dan 10 %. Fraksi pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri tertinggi diidentifikasi golongan senyawanya menggunakan uji reagen (fitokimia) kemudian dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis analitik.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri tertinggi adalah etil asetat. Aktivitas antibakteri terbaik diperoleh pada konsentrasi ekstrak paling tinggi yaitu 10 % dengan zona hambat 8,5 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 6 mm terhadap bakteri *E. coli*. Berdasarkan uji fitokimia diketahui bahwa golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah steroid. Berdasarkan pemisahan menggunakan KLTA diperoleh 6 spot yang merupakan golongan senyawa steroid.

Kata Kunci: Antibakteri, fraksi, alga coklat *Sargassum vulgare*.

I. PENDAHULUAN

Allah SWT menciptakan segala sesuatu di bumi ini dengan manfaatnya masing-masing, salah satunya adalah laut dan segala sesuatu yang ada di dalamnya. Pemanfaatan hasil laut tidak hanya berupa ikan, namun masih banyak makhluk hidup lainnya yang dapat dimanfaatkan keberadaannya. Sebagaimana firman Allah SWT dalam surat an Nahl ayat 14 :

وَهُوَ الَّذِي سَخَّرَ الْبَحْرَ لِتَأْكُلُوا مِنْهُ لَحْمًا طَرِيًّا وَتَسْتَخْرِجُوا مِنْهُ حِلْيَةً تَلْبَسُونَهَا وَتَرَى الْفُلْكَ مَوَاجِرَ فِيهِ وَلِيَبْتَلُوا مِنْ فَضْلِهِ وَلَعَلَّكُمْ تَشْكُرُونَ (١٤)

“Dan Dia-lah, Allah yang menundukkan lautan (untukmu), agar kamu dapat memakan daripadanya daging yang segar (ikan), dan kamu mengeluarkan dari lautan itu perhiasan yang kamu pakai, dan kamu melihat bahtera berlayar padanya, dan supaya kamu mencari (keuntungan) dari karuniaNya, dan supaya kamu bersyukur” (QS. an Nahl : 14).

Makna *sakhkhara al-bahra* menjelaskan bahwa Allah SWT telah memberikan nikmatNya yang ada di laut kepada hamba-hambaNya, sehingga memungkinkan bagi hamba-hambaNya untuk mengambil manfaat. Sebagaimana dalam ayat tersebut Allah SWT telah memerintahkan untuk memakan (*lii ta'kulu*), mengeluarkan (*tastakhriju*), melihat (*wa taraa*) dan mencari (*lii tabtaghu*) keuntungan dari karuniaNya yang sudah ada di laut agar dapat mensyukuri segala nikmat dan karunia berupa luasnya lautan beserta isinya.

Salah satu potensi biota laut perairan Indonesia adalah rumput laut yang secara taksonomi dikelompokkan ke dalam divisi *Thallophyta*. Berdasarkan penelitian sebelumnya diketahui bahwa alga berpotensi sebagai antivirus, antibakteri, antijamur, antitumor dan antioksidan.

Adanya penelitian yang menguji bioaktivitas suatu bahan alam sebagai obat khususnya antibakteri mempunyai tujuan

penting, yaitu untuk mengurangi penggunaan bahan kimia yang berakibat pada resistensi obat. Penggunaan suatu bahan alam sebagai obat antibakteri alami memiliki kelebihan dibandingkan dengan obat antibakteri sintesis. Hal ini dikarenakan mudah didapat dan efek samping yang ditimbulkan terhadap kesehatan umumnya relatif kecil.

Ekstrak alga coklat jenis *Sargassum* menunjukkan kemampuan menghambat pertumbuhan yang maksimal terhadap beberapa jenis bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*, dimana hal tersebut dapat diketahui setelah dilakukan suatu percobaan secara *in vitro* (Sastry dan Rao, 1994 dalam Alamsjah, 2011). Alga coklat *Sargassum* sp. memiliki kandungan Mg, Na, Fe, tanin, iodin dan fenol yang berpotensi sebagai bahan antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri patogen yang dapat menyebabkan diare (Sastry dan Rao, 1994 dalam Bachtiar, dkk., 2012).

Salah satu jenis bakteri yang merugikan manusia adalah bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Bakteri *E. coli* adalah kuman yang banyak ditemukan di usus besar manusia, akan tetapi kontaminasinya dapat menyebabkan diare. Organisme ini menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar saluran pencernaan (usus) khususnya saluran air kemih, saluran empedu, dan paru-paru (Jawetz, *et al.*, 1996). Bakteri *S. aureus* dapat mengakibatkan infeksi pada kulit atau luka pada organ tubuh jika bakteri inimengalahkan mekanisme pertahanan tubuh.

Beberapa penelitian tentang pengujian aktivitas antibakteri telah banyak dilakukan. Uji antibakteri alga merah jenis *Eucheuma spinosum* menghasilkan daya hambat tertinggi sebesar 6 mm dan 5,5 mm pada pelarut petroleum eter, 4 mm dan 3 mm pada pelarut etil asetat, 3 mm dan 2,5 mm pada pelarut kloroform terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus* (Miftahurrohmah, 2012).

Penggunaan pelarut metanol menghasilkan zona hambat 3,5 mm dan 1,3 mm terhadap bakteri yang sama pada alga jenis *Eucheuma cottoni* (Muhimmah, 2013).

Adanya aktivitas antibakteri dari suatu bahan alam tentunya dipengaruhi oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang berada di dalamnya. Senyawa metabolit sekunder yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri adalah golongan steroid (Alfiyaturohmah, 2013).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Alfiyaturohmah (2013), diketahui bahwa ekstrak kasar alga coklat *S. vulgare* mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi pada pelarut kloroform dengan konsentrasi ekstrak 1 % dan 10 %. Zona hambat yang dihasilkan sebesar 1,6 mm pada bakteri *E. coli* dan 1,8 mm pada bakteri *S. aureus*. Aktivitas tersebut masih tergolong lemah karena zona hambat yang dihasilkan kurang dari 5 mm (Yuningsih, 2007).

Miftahurrahmah (2012) melakukan uji aktivitas antibakteri alga merah jenis *E. spinosum* dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol dan hidrolisis kemudian dipartisi dengan variasi pelarut yang berbeda kepolarannya. Dari penelitian tersebut diketahui bahwa aktivitas antibakteri ekstrak yang telah dihidrolisis lebih besar dibandingkan dengan ekstrak kasar sebelum dihidrolisis. Zona hambat ekstrak hasil hidrolisis fraksi petroleum eter terhadap bakteri *E. coli* adalah 6 mm dan ekstrak metanol (sebelum dihidrolisis) adalah 3 mm. Sedangkan aktivitas terhadap bakteri *S. aureus* adalah 5,5 mm untuk fraksi petroleum eter dan 4 mm untuk pelarut metanol (sebelum dihidrolisis).

Menurut Tensiska, dkk. (2007) pada reaksi hidrolisis akan terjadi pemutusan hemiasetal dalam komponen glikon (polar/terikat gula) sehingga gugus gula dalam komponen glikon terlepas dan akhirnya komponen glikon berubah struktur menjadi komponen aglikon (nonpolar). Hidrolisis dapat dilakukan

dengan cara merendam ekstrak kental hasil maserasi dengan HCl 2 N selama 2-3 jam. Penambahan asam kuat seperti HCl pada sistem reaksi hidrolisis akan berpengaruh terhadap kekuatan pelepasan proton (H^+) yang berpengaruh terhadap pemutusan ikatan glikosida (Handoko, 2006).

Berdasarkan beberapa hasil penelitian di atas, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri ekstrak alga coklat jenis *S. vulgare* dengan adanya hidrolisis dan partisi. Pentingnya penelitian ini dikarenakan pada penelitian sebelumnya ditemukan potensi antibakteri dari alga coklat jenis *S. vulgare*. Penelitian ini akan dilakukan dengan metode ekstraksi maserasi dan hidrolisis kemudian dipartisi menggunakan variasi pelarut organik yaitu etil asetat, kloroform dan petroleum eter.

II. METODE PENELITIAN

Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari sampai dengan Mei 2014 di Laboratorium Kimia Organik dan Bioteknologi Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.

Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan blender, gunting, pisau, oven, neraca analitik, seperangkat alat gelas, *rotary evaporator vacumm*, *hot plate*, *magnetic stirrer*, spektrofotometer, spatula, gelas arloji, cawan petri, cawan penguap, tabung reaksi, kertas saring, kertas cakram, kapas, *shaker*, botol media, jarum ose, inkubator, pinset, autoklaf, bunsen, mikro pipet, plat KLT silika gel F₂₅₄ dan penggaris.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah alga coklat jenis *Sargassum vulgare*. Bahan kimia yang digunakan adalah metanol, etil asetat, kloroform, petroleum eter, HCl 2 N, Natrium bikarbonat, standar glukosa, reagen DNS, reagen Dragendorf, reagen Mayer, serbuk logam Mg, metanol 50 %, kloroform, HCl 2 %, HCl 1 N, asam asetat anhidrat, larutan

gelatin, asam sulfat pekat, *n*-heksana,aseton dan reagen Lieberman-Buchard. Uji antibakteri menggunakan bahan-bahan sebagai berikut: media nutrisi agar padat (NA), media nutrient cair (NB), etanol, kertas saring Wathman, aquades steril, aluminium foil, biakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, penisilin dan streptomisin.

PROSEDUR PENELITIAN

Preparasi Sampel

Alga coklat *S. vulgare* segar dicuci, kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dalam oven pada suhu 37-38 °C. Sampel yang telah kering dihaluskan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk yang selanjutnya serbuk diayak menggunakan ayakan ukuran 60-100 mesh.

Analisa Kadar Air

Sebanyak 5 gram serbuk sampel pada cawan konstan dipanaskan dalam oven pada suhu 100-105 °C sekitar 15 menit. Cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit selanjutnya ditimbang. Dilakukan pengulangan sampai diperoleh berat konstan.

Analisa Kadar Garam

Sebanyak 5 gram serbuk sampel diekstrak menggunakan aquades panas sebanyak 10 mL dan diaduk selama 10 menit. Ekstraksi diulangi sebanyak 10 kali. Kemudian filtrat diukur kadar garamnya menggunakan alat salinometer Atago PAL-06S refraktometer.

Ekstraksi

Sebanyak 200 gram serbuk sampel diekstraksi menggunakan 600 mL metanol p.a dan diaduk menggunakan *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan 120 rpm. Ekstraksi maserasi diulangi sebanyak 3 kali dan seluruh filtrat yang diperoleh selanjutnya digabung menjadi satu kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporatorvacuum* sehingga diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya dibagi menjadi dua bagian. Bagian I untuk diuji aktivitas

antibakteri dan analisis gula reduksi (ekstrak metanol kasar) dan bagian II untuk dihidrolisis.

Hidrolisis dan Partisi

Hidrolisis dilakukan dengan cara menyiapkan 3 wadah, yaitu A, B dan C kemudian masing-masing wadah diisi dengan ekstrak pekat sebanyak 7 gram. Kemudian setiap ekstrak ditambah 14 mL larutan HCl 2 N dan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu ruang selama 1 jam. Hidrolisat yang diperoleh ditambahkan NaHCO₃ sampai pHnya netral (pH 7), kemudian dipartisi dengan variasi pelarut organik yaitu: etil asetat, kloroform dan petroleum eter masing-masing sebanyak 25 mL. Dari hasil partisi akan diperoleh dua lapisan, lapisan organik digunakan untuk uji antibakteri dan identifikasi golongan senyawa sedangkan lapisan air digunakan untuk uji kadar gula reduksi.

Uji Gula Reduksi Metode DNS

Standar glukosa 10 ppm diukur absorbansinya pada panjang gelombang 500-600 nm untuk mendapatkan panjang gelombang optimum. Kurva standar dibuat dengan mengukur absorbansi glukosa standar 10, 20,30,40 dan 50 ppm pada panjang gelombang optimum. Masing-masing lapisan air hasil partisi dan ekstrak pekat metanol sebelum dihidrolisis diambil 1 mL dan ditambahkan 1 mL reagen DNS. Kemudian larutan divorteks dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit. Dalam keadaan panas ditambah 1 mL larutan KNa-Tartrat dan ditandabatkan dalam labu ukur 10 mL. Didinginkan hingga mencapai suhu ruang dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang optimum. Nilai pengukuran yang diperoleh diplot ke dalam kurva standar.

Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian dengan metode difusi cakram. Kertas cakram 5 mm diresapkan pada masing-masing fraski dengan konsentrasi 10 %, 7,5 %, 5 %, 2,5 %, 1 % dan 0,5 %. Kertas cakram yang

mengandung ekstrak diletakkan di atas permukaan media agar padat yang telah ditanami dengan 0,1 mL biakan aktif bakteri. Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C dan diamati terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram.

Uji Fitokimia

Fraksi pelarut yang memberikan aktivitas antibakteri tertinggi diuji golongan senyawanya dengan uji reagen (fitokimia).

Alkaloid

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 0,5 mL HCl 2 % dan larutan dibagi ke dalam dua tabung. Tabung I ditambahkan 2-3 tetes reagen Dragendorff, tabung II ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer. Jika tabung I terbentuk endapan jingga dan pada tabung II terbentuk endapan kekuning-kuningan, maka menunjukkan adanya alkaloid (Indrayani, dkk., 2006).

Flavonoid

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam 1-2 mL metanol panas 50 %. Setelah itu ditambah serbuk logam Mg dan 4-5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid (Indrayani, dkk., 2006).

Saponin

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah air (1:1) sambil dikocok selama 1 menit, apabila menimbulkan busa ditambahkan HCl 1 N. Jika busa yang terbentuk dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3 cm, maka menunjukkan adanya golongan senyawa saponin.

Triterpenoid

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Kemudian, ditambahkan 1-2 mL larutan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Jika terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada pembatas dua pelarut menunjukkan

adanya golongan senyawa triterpenoid (Indrayani, dkk., 2006).

Steroid

Ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Selanjutnya ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrida. Kemudian ditambahkan 1-2 mL larutan H₂SO₄ pekat melalui dinding tabung reaksi. Jika terbentuk warna hijau kebiruan menunjukkan adanya golongan senyawa steroid (Indrayani, dkk., 2006).

Tanin

Uji tanin dilakukan dengan dua cara yaitu uji FeCl₃ dan uji gelatin. Uji FeCl₃ dilakukan dengan memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 2-3 tetes larutan FeCl₃ 1 %. Jika larutan menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tinta, maka mengandung tanin. Uji gelatin dilakukan dengan memasukkan ekstrak ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah dengan larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, menunjukkan adanya tanin

Pemisahan Golongan Senyawa Aktif

Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis analitik dilakukan terhadap golongan senyawa yang dinyatakan positif dari hasil uji fitokimia melalui uji reagen. Pemisahan dengan kromatografi lapis tipis analitik dilakukan menggunakan plat silika gel F₂₅₄.

Analisa data

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji ANOVA dua arah untuk menguji adanya pengaruh antar perlakuan variasi konsentrasi dan variasi pelarut terhadap zona hambat yang dihasilkan. Apabila terdapat adanya pengaruh, maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) dengan tingkat signifikansi 5 % untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh atau berbeda nyata di antara perlakuan yang lain.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

Preparasi Sampel

Preparasi sampel meliputi pencucian, pengeringan, penghalusan dan pengayakan. Sampel dicuci sampai bersih menggunakan air mengalir untuk menghilangkan kotoran yang melekat. Pengeringan sampel bertujuan untuk menurunkan kadar air dan mempermudah proses penyimpanan sampel. Pengeringan dilakukan menggunakan oven pada suhu 35-38 °C untuk menghindari kerusakan atau hilangnya senyawa aktif yang diinginkan. Penghalusan dilakukan agar luas permukaan sampel semakin besar sehingga kontak sampel dengan pelarut semakin maksimal. Selain itu, penghalusan juga memungkinkan pecahnya sel-sel, sehingga mempermudah pengambilan senyawa aktif oleh pelarut. Setelah dilakukan penghalusan sampel diayak menggunakan ayakan dengan ukuran 60-100 mesh.

Analisa Kadar Air

Prinsip analisis kadar air adalah adanya pemanasan dan penimbangan (*Thermogravimetri*) menggunakan oven pemanas pada temperatur 105 °C sampai diperoleh berat konstan. Selisih berat sampel antara sebelum dan sesudah pemanasan menunjukkan jumlah air yang terkandung dalam sampel. Berdasarkan penelitian diketahui bahwa kadar air pada sampel basah *S. vulgare* sebesar 77,625 %, kadar air tersebut cukup tinggi karena sampel *S. vulgare* diambil dari habitat perairan. Sedangkan kadar air sampel setelah dikeringkan sebesar 9,352 %.

Hasil analisis kadar air sampel kering alga coklat *S. vulgare* menghasilkan nilai yang cukup baik karena kurang dari 10 %. Menurut Cahyono dkk. (2011) jika kadar air bahan lebih besar dari 10 % maka akan tumbuh mikroorganisme dan mempengaruhi reaksi enzimatik sehingga mempercepat pembusukan sampel. Penentuan kadar air juga berpengaruh terhadap proses ekstraksi zat aktif. Kadar air yang rendah dapat mempermudah

proses penarikan zat aktif dalam sampel karena pelarut mudah menembus dinding sel sampel tanpa adanya gangguan dari molekul air.

Analisa Kadar Garam

Penentuan kadar garam dilakukan untuk mengetahui kadar salinitas dari suatu sampel, karena beberapa mikroorganisme sensitif terhadap kadar salinitas yang tinggi. Analisis kadar garam ini dilakukan dengan *Salinometer Atago PAL-06S Refractometer*. Prinsip alat ini adalah dengan memanfaatkan indeks bias cahaya untuk mengetahui tingkat salinitas dari sampel yang berupa cairan. Berdasarkan perhitungan diperoleh kadar garam sebesar 15,6 %. Menurut Hudaya dan Derajat (1980) kadar garam pada konsentrasi 10-15 % dapat membunuh sebagian besar jenis bakteri, kecuali bakteri jenis "halofilik" yaitu jenis bakteri yang tahan terhadap konsentrasi garam 26,6 %. Bakteri *E. coli* dapat dihambat pertumbuhannya pada konsentrasi garam 13 % sedangkan bakteri *S. aureus* dapat dihambat pertumbuhannya pada konsentrasi garam 15-20 %.

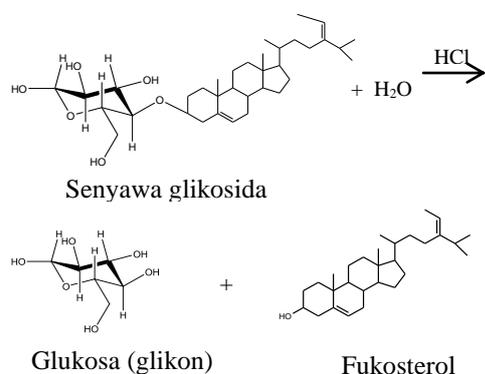
Ekstraksi

Ekstraksi maserasi dilakukan untuk mengambil atau mengekstrak zat aktif yang terkandung dalam sampel melalui perendaman. Adanya sistem perendaman ini maka pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam sel yang mengandung zat aktif. Dengan demikian maka zat aktifnya akan larut dalam pelarut. Berdasarkan perhitungan, sebanyak 200 gram serbuk alga coklat *S. vulgare* diperoleh ekstrak pekat metanol sebanyak 29,654 gram dengan rendemen ekstrak metanol sebesar 14,8 %.

Hidrolisis

Tujuan dilakukan hidrolisis adalah untuk memisahkan glikon (gugus gula) dengan aglikon (senyawa metabolit sekunder) pada suatu senyawa glikosida. Dengan adanya pemutusan ikatan glikosida ini, maka senyawa metabolit sekunder yang diperoleh menjadi lebih maksimal.

Dugaan reaksi pemutusan ikatan glikosida ditunjukkan pada Gambar 1:



Gambar 1 Dugaan reaksi hidrolisis

Tabel 1.1 Hasil ekstraksi dan rendemen

Pelarut	Warna filtrat	Warna ekstrak pekat	Rendemen (%)
Etil asetat	Hijau kecoklatan	Coklat kehitaman	26,3
Kloroform	Hijau kehitaman	Hijau kehitaman	27
Petroleum eter	Coklat kehitaman	Coklat kehitaman	25,3

Berdasarkan Tabel 1.1, diketahui bahwa rendemen ekstrak fraksi kloroform lebih besar dari pada rendemen fraksi lainnya. Hasil rendemen ini diduga bahwa kandungan golongan senyawa yang bersifat semi polar dalam alga coklat *S. vulgare* lebih banyak dari pada senyawa polar dan non polar.

Uji Gula Reduksi

Setelah dilakukan hidrolisis, maka gugus gula (glikon) akan terputus dari ikatan glikosida. Glukosa dalam ekstrak akan bereaksi dengan reagen DNS dan ditunjukkan dengan perubahan warna. Intensitas warna yang terbentuk menunjukkan konsentrasi atau banyaknya gula yang mereduksi. Data yang diperoleh ditunjukkan dalam Tabel 2.

Tabel 2 Kadar gula reduksi ekstrak methanol tiap fraksi

Sampel	Gula reduksi (ppm)
Ekstrak metanol	26,1
etilasetat	11,3
Kloroform	16,4
Etroleum eter	13,8

Partisi (Ekstraksi cair-cair)

Tujuan dari partisi ini adalah untuk melarutkan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak berdasarkan sifat kepolaran masing-masing. Prinsip ekstraksi cair-cair (partisi) yaitu proses pemisahan berdasarkan distribusi suatu zat diantara dua larutan yang tidak saling bercampur. Hasil ekstraksi dan rendemen masing-masing fraksi sebagaimana Tabel 1.

Berdasarkan Tabel 2, diketahui bahwa ekstrak kasar metanol sebelum dihidrolisis mempunyai kadar gula reduksi lebih tinggi dibandingkan dengan masing-masing lapisan air hasil hidrolisis. Hal tersebut dimungkinkan karena gugus gula yang berada dalam lapisan (fase) air hasil hidrolisis merupakan gula nonreduksi sehingga tidak dapat dideteksi dengan metode DNS. Hidrolisis yang kurang sempurna juga mempengaruhi pemutusan ikatan glikosida yang mengakibatkan glikon masih terikat pada aglikonnya. Dengan demikian, maka jumlah gula reduksinya telah tidak dapat terdeteksi.

Uji Aktivitas Antibakteri

Prinsip metode difusi cakram dalam pengujian antibakteri adalah terdifusinya zat antibakteri yang berada pada kertas cakram menuju permukaan media agar yang telah diinokulasi atau ditanami bakteri uji. Bakteri akan terhambat pertumbuhannya dengan pengamatan terbentuknya zona bening disekeliling kertas cakram. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak kasar metanol, fraksi etil asetat, kloroform dan petroleum eter ditunjukkan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri pada Tabel 3 dan Tabel 4 diketahui bahwa aktivitas antibakteri yang baik diberikan oleh fraksi etil asetat. Dalam fraksi etil asetat dimungkinkan senyawa yang terkandung adalah golongan senyawa yang bersifat semipolar. Kemampuan fraksi etil asetat dalam

menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* semakin besar dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan oleh kuantitas komponen aktif yang

bersifat antibakteri akan semakin banyak dalam konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi.

Tabel 3 Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak terhadap bakteri *S. aureus*

Konsentrasi (%)	Zona hambat (mm)			
	Ekstrak Kasar Metanol	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Kloroform	Fraksi Petroleum Eter
0,5	-	-	-	-
1	-	1	-	-
2,5	-	3,67	-	-
5	0,5	4	-	-
7,5	1,67	4,5	-	-
10	-	8,5	-	1,5
Kontrol positif (penisilin 2,5)			25	
Kontrol negatif (pelarut)	-	-	-	-
Total bakteri CFU/mL			2,88x10 ⁸	

Tabel 4 Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli*

Konsentrasi (%)	Zona hambat (mm)			
	Ekstrak Kasar Metanol	Fraksi Etil Asetat	Fraksi Kloroform	Fraksi Petroleum Eter
0,5	-	-	-	-
1	-	-	-	-
2,5	-	0,83	-	-
5	-	2,17	-	-
7,5	-	5,17	-	-
10	-	6	-	-
Kontrol positif (Streptomisin 0,6)			13,5	
Kontrol negatif (pelarut)	-	-	-	-
Total bakteri CFU/mL			2,96x10 ⁸	

Aktivitas antibakteri pada ekstrak semipolar juga ditunjukkan pada penelitian Eom *et al.* (2011) yang mengekstrak alga coklat *Eisenia bisiklis* dengan pelarut metanol kemudian dipartisi menggunakan variasi pelarut *n*-heksana, diklorometana, etil asetat dan *n*-butanol. Berdasarkan penelitian tersebut, fraksi etil asetat

mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan aktivitas yang paling besar. Didukung oleh penelitian Reveny (2011) yang menginformasikan bahwa fraksi etil asetat memberikan aktivitas antibakteri terbaik terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Fraksi etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri yang cenderung lebih kecil dibandingkan dengan senyawa dalam obat komersil seperti penisilin dan streptomisin. Pada penelitian ini digunakan kontrol positif yaitu penisilin untuk bakteri *S. aureus* dengan zona hambat 25 mm dan streptomisin untuk bakteri *E. coli* dengan zona hambat 13,5 mm. Menurut Davis dan Stout (1971) dalam Yuningsih (2007) daerah hambatan ekstrak kurang dari 5 mm tergolong lemah, antara 5 mm sampai 8 mm tergolong lemah, antara 10 sampai 20 mm tergolong kuat dan lebih dari 20 mm tergolong sangat kuat. Berdasarkan pengujian aktivitas antibakteri menghasilkan zona hambat terbaik yaitu 8,5 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 6 mm terhadap *E. coli*. Jika dimasukkan ke dalam rentang ketentuan kekuatan antibakteri, maka aktivitas antibakteri yang diberikan oleh fraksi etil asetat alga coklat *S. vulgare* tergolong sedang.

Kontrol negatif yang digunakan adalah pelarut dan dari hasil pengujian diketahui bahwa kontrol negatif tidak memberikan daya hambat terhadap kedua bakteri uji. Sehingga dapat disimpulkan bahwa zona hambat ekstrak yang terbentuk adalah murni dari aktivitas ekstrak dan tidak dipengaruhi oleh pelarut yang

digunakan. Selain itu, berdasarkan analisis kadar garam terhadap sampel diketahui bahwa kadar salinitas sampel juga tidak memberikan pengaruh terhadap penghambatan bakteri uji. Terhambatnya pertumbuhan bakteri uji cenderung disebabkan oleh senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak *S. vulgare*.

Bakteri *S. aureus* cenderung dapat dihambat oleh konsentrasi ekstrak yang lebih rendah dibandingkan dengan bakteri *E. coli*. Hal tersebut diduga karena adanya perbedaan komponen penyusun dinding sel bakteri gram positif (*S. aureus*) dan gram negatif (*E. coli*). Dinding sel bakteri gram positif mengandung lipid yang lebih rendah daripada bakteri gram negatif (Pelczar dan Chan, 1986). Diduga komponen senyawa aktif yang bersifat semipolar cenderung lebih mudah masuk ke dalam dinding sel bakteri gram positif dalam menghambat pertumbuhannya.

Uji Fitokimia

Fraksi *S. vulgare* yang mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi selanjutnya dilakukan uji fitokimia. Berdasarkan penelitian dan pengamatan diperoleh hasil uji fitokimia fraksi etil asetat *S. vulgare* sebagaimana pada Tabel 5.

Tabel 5 Hasil uji fitokimia fraksi etil asetat alga coklat *S. vulgare*

Uji	Ekstrak <i>S. vulgare</i>	Warna	Standar warna
Flavonoid	–	Hijau	Merah/ jingga
Tanin	–	Hijau kekuningan	Hijau kehitaman/ biru tua
FeCl ₃	–	Hijau kecoklatan	Endapan putih
Gelatin	–		
Alkaloid			
Dragendrof	–	Merah kekuningan	Endapan jingga, merah bata
Mayer	–	Hijau	Endapan kekuning-kuningan
Saponin	–	Hijau	Terbentuk busa
Steroid	+	Hijau kebiruan	Hijau kebiruan
Triterpenoid	–	Hijau kebiruan	Terbentuk cincin kecoklatan

Hasil uji fitokimia pada Tabel 4.6 menunjukkan bahwa fraksi etil asetat *S. vulgare* diduga mengandung golongan

senyawa steroid. Diduga aktivitas antibakteri disebabkan oleh adanya kandungan golongan senyawa yaitu

steroid. Hal ini sesuai dengan pendapat Farouk *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa antimikroba adalah golongan atau turunan dari senyawa terpenoid, diantaranya yaitu steroid. Golongan steroid menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu proses pembentukan membran dan dinding sel bakteri. Pada keadaan tersebut fosfolipid yang merupakan lapisan tipis yang menyelimuti peptidoglikan tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma. Akibatnya, membran sitoplasma akan mengalami lisis dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan kematian (Robinson, 1995). Didukung oleh penelitian Morin

dan Gorman (1995) yang menyebutkan bahwa senyawa steroid mempunyai struktur lipofilik yang akan berinteraksi dengan fosfolipid pada membran sel bakteri. Adanya reaksi ini menyebabkan integritas membran menurun dan morfologi membran berubah yang mengakibatkan rapuhnya membran sel bakteri dan sel mengalami lisis.

Pemisahan Golongan Senyawa dengan KLTA

Pemisahan golongan senyawa steroid menggunakan larutan pengembang campuran yaitu *n*-heksana : etil asetat (8:2). Hasil pemisahan golongan senyawa steroid pada fraksi etil asetat *S. vulgare* pada Tabel 6.

Tabel 6 Hasil pemisahan golongan senyawa steroid

No	Rf (cm)	Warna noda di bawah sinar UV pada λ 366 nm		Dugaan Senyawa
		Sebelum disemprot reagen Lieberman-Buchard	Setelah disemprot reagen Lieberman-Buchard	
1	0,05	Merah muda	Merah muda	-
2	0,11	Kuning	Merah muda	-
3	0,25	-	Ungu	Steroid
4	0,32	Ungu	Merah muda	-
5	0,38	Merah muda	Ungu	Steroid
6	0,53	Merah muda	Ungu	Steroid
7	0,58	Merah muda	Ungu	Steroid
8	0,62	Merah muda	Merah muda	-
9	0,68	Merah muda tengah ungu	Merah muda tengah ungu	Steroid
10	0,81	Merah muda tengah ungu	Merah muda tengah ungu	Steroid
11	0,91	Merah muda	Merah muda	-

Identifikasi spot yang merupakan golongan senyawa steroid diperoleh sebanyak 6 spot. Spot ke 3, 5, 6, 7, 9 dan 10 dinyatakan positif golongan senyawa steroid yang ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu setelah disemprot dengan reagen Lieberman-Buchard dan dideteksi di bawah sinar UV366. Identifikasi golongan senyawa steroid setelah disemprot dengan reagen

Lieberman-Buchard dan dideteksi di bawah sinar UV366 akan menghasilkan warna spot di antaranya hijau, biru, ungu, coklat dan ungu.

Analisis Data

Berdasarkan analisis statistika diketahui bahwa perlakuan variasi konsentrasi terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diperoleh $F_{hitung} < F_{tabel}$. Dengan demikian maka H_0 diterima yang berarti

perlakuan variasi konsentrasi ekstrak tidak berpengaruh nyata. Sedang pengambilan keputusan untuk perlakuan variasi pelarut terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diperoleh $F_{hitung} > F_{tabel}$. Dengan demikian maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, yang berarti perlakuan variasi pelarut berpengaruh nyata.

Berdasarkan uji beda nyata terkecil diketahui bahwa rata-rata zona hambat *S. aureus* terhadap perlakuan variasi pelarut metanol, kloroform dan petroleum eter tidak berbeda secara signifikan. Sedangkan pelarut etil asetat merupakan pelarut yang lebih baik jika direkomendasikan sebagai pelarut untuk mengekstraksi golongan senyawa yang berpotensi sebagai obat antibakteri.

IV. KESIMPULAN DAN SARAN

Hasil hidrolisis ekstrak metanol alga coklat *S. vulgare* yang mempunyai aktivitas antibakteri tertinggi adalah fraksi etil asetat dengan zona hambat 8,5 mm terhadap bakteri *S. aureus* dan 6 mm terhadap bakteri *e. coli*. Golongan senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat alga coklat *S. vulgare* diduga golongan senyawa steroid.

Saran

Sebaiknya pengujian kadar garam dilakukan pada ekstrak hasil maserasi, untuk mengetahui kadar garam yang terkandung dalam ekstrak setelah dilakukan ekstraksi. Ekstraksi menggunakan variasi pelarut organik lain perlu dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak dalam pelarut yang berbeda. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan penggunaan bakteri uji dan metode uji yang lain, seperti metode dilusi cair.

V. DAFTAR PUSTAKA

Alamsjah, M.A., Nurhayati, D. dan Thahjaningsih, W. 2011. Pengaruh Ekstrak Alga Cokelat (*Sargassum sp.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherechia coli* Secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*, Vol.3,No.1.

Alfiyaturohmah. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Etanol, Klorofom dan *n*-heksana Alga Coklat *Sargassum vulgare* Asal Pantai Kapong Pamekasan Terhadap Bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. *Tugas Akhir* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

Bachtiar, S.Y., Tjahjaningsih, W. dan Sianita, N. 2012. Pengaruh Ekstrak Alga Coklat (*Sargassum sp.*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal of Marine and Coastal Science*, Vol.1, No.1, 53-60.

Cahyono, B., Huda, M.D.K. dan Limantara, L. 2011. Pengaruh Proses Pengerinan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* ROXB) Terhadap Kandungan Dan Komposisi Kurkuminoid. *Reaktor*, Vol.13, No.3.

Eom, *et al.* 2011. Antimicrobial Activity of Brown Alga *Eisenia bicyclis* against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fish Aquat Sci.* Vol.14, No.4.

Farouk, A.E., Faizal A.H.G. dan Ridzwan B.H. 2007. New Bacterial Species Isolated from Malaysian Sea Cucumbers with Optimized Secreted Antibacterial Activity. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*.

Handoko, S.P. 2006. Kinetika Hidrolisis Maltosa Pada Variasi Suhu dan Jenis Asam Sebagai Katalis. *Sigma*, Vol. 9, No. 1: 9-17.

Hudaya, S. dan Derajat, S. 1980. *Dasar-Dasar Pengawetan I*. Jakarta: Departemen Pendidikan dan Kebudayaan.

Indrayani, L., Soetjipto, H. dan Sihasale, L. 2006. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Daun Pecut Kuda (*Stachytarpheta jamaicensis* L. Vahl) Terhadap Larva Udang *Artemia salina* Leach. *Jurnal Fakultas Sains dan Matematika*.

- Salatiga: Universitas Kristen Satya Wacana.
- Jawetz, E., Adelberg E.A. dan Melnick J. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan Edi Nugroho dan Maulana R.F. Jakarta: Kedokteran EGC.
- Miftahurrahmah. 2012. Ekstraksi, Uji Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Alga Merah *Eucheuma spinosum* Dari Pesisir Laut Banyuwangi. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Morin, R.B dan Gorman, M. 1995. *Kimia dan Biologi Antibiotik β -lactam Edisi III*. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Muhimmah, A.A. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Dan *N*-Heksana Rumput Laut Merah (*Eucheuma cottonii*) Pesisir Pantai Lobuk Madura Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 1. Alih Bahasa: Hadioetomo, R. S., Imas, T., Tjitrosomo, S.S., dan Angka, S.L., Jakarta: UI Press.
- Reveny, J. 2011. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol. 12, No.1.
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB Press.
- Tensiska, Marsetio dan Yudiastuti, S.O.N 2007. Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Isoflavon Dari Ampas Tahu. *Hasil Penelitian*. Bandung: Universitas Padjadjaran.
- Yuningsih, R. 2007. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jawer Kotok (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth.). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.