

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER FRAKSI ETIL
ASETAT DARI HYDROID *Aglaophenia cupressina* L.**

YAFETH TANDI BENDON

(H 311 06 018)



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKAN DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2013**

Isolasi dan Identifikasi Metabolit Sekunder Fraksi Etil Asetat dari Hydroid

Aglaophenia cupressina L.

Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat

Untuk memperoleh gelar sarjana sains

Oleh

Yafeth Tandi Bendon

H 311 06 018



Makassar

2013

SKRIPSI

Isolasi Dan Identifikasi Metabolit Sekunder Fraksi Etil Asetat Dari Hydroid

Aglaophenia cupressina L.

Disusun dan diajukan oleh

Yafeth Tandi Bendon

H 311 06 018

Skripsi ini telah diperiksa dan disetujui oleh

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama

Prof. Dr. Hanapi Usman. M. Sc.
NIP. 19570228 198703 1 001

Prof. Dr. Ahyar Ahmad
NIP. 19671231 199103 1 020

LEMBAR PERSEMBAHAN

The Fear
of the
LORD

is the
BEGINNING
of
KNOWLEDGE

But FOOLS
Despise
WISDOM
and
INSTRUCTION

PROVERBS OF SOLOMON

PRAKATA

Laut sebagai sumber bahan alam telah menyediakan banyak senyawa yang berguna untuk kehidupan manusia. Telah banyak senyawa obat yang telah diisolasi dari biota-biota laut. Penelitian inipun adalah salah satu dari sekian banyak penelitian yang membahas kandungan alam dari biota laut, terutama yang berasal dari spesies *hydroid Aglaophenia cupressina* L.

Penulis ingin berterima kasih pada semua pihak yang telah membantu sehingga skripsi ini berhasil diselesaikan:

1. TUHAN, Sang Pencipta, yang telah menciptakan alam semesta yang diteliti dan dimanfaatkan manusia. Segala hormat dan pujian hanya untuk-Nya. Amin!
2. Keluarga yang menjadi pendorong dan pendukung yang tidak tergantikan. Terima kasih pada orang tua (**Johanis Sulle Leppang** dan **Ludia Tumba**) dan saudari-saudari (**Lusia Ponno** dan **Charni Datu**) yang telah dengan sabar mengingatkan untuk secepatnya menyelesaikan penelitian ini. Kiranya TUHAN memberkati kita semua.
3. **Prof. Dr. Hanapi Usman, M.Si** dan **Prof. Dr. Ahyar Ahmad** yang telah berkenan menjadi pembimbing utama dan pembimbing pertama dari penelitian ini. Terima kasih pula pada ibu **Eva Johannes** yang telah mendukung penelitian ini hingga akhirnya selesai. Semoga TUHAN menganugerahkan kesehatan dan kebahagiaan pada bapak dan ibu. Amin!
4. Kawan seperjalanan semasa kuliah, Angkatan 2006 kimia UNHAS (**Sabir, Jamius, Dadang, Mahdi, Abel, Gusti, Yusuf, Dian, Dira, Dita, Ida, Ima,**

Masna, Maya, Tiur, Bhakti, Yanti, Mimi, Yulin, Yustin, Fite, Eki, Indri, Dila, Andre, Fadel, Sanjaya, Sunanjar Tayang, Kardinopel, Niesty).

Terima kasih telah menjadi teman seperjalanan dalam menempuh pendidikan di kampus ini. Semoga di manapun kalian berada selalu ada hal-hal yang baik di sana.

5. Para dosen jurusan kimia dan analisis laboratorium yang selama ini membantu pendidikan dan penelitian ini. Sekiranya TUHAN membalas budi baik beliau-beliau dengan kebaikan-kebaikan dalam hidup. Amin!

Semoga skripsi singkat ini bisa berguna bagi siapapun yang membacanya.

Terima kasih.

Makassar, April 2013

Penulis

ABSTRAK

Aglaophenia cupressina L. merupakan biota laut dengan metabolit sekunder yang berprospek tinggi. Penelitian terdahulu dari ekstrak nonpolar *A. cupressina* L. telah menemukan metabolit sekunder murni baru. Penelitian ini dilakukan untuk mengeksplorasi metabolit sekunder dari ekstrak polar dari *A. cupressina* L. Ekstrak polar yang berhasil diisolasi dalam penelitian ini menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloid di dalam ekstrak. Uji bioaktivitas terhadap senyawa ini menunjukkan keaktifan terhadap bakteri *E. coli* yang tergolong ke gram negatif.

Kata kunci: *Aglaophenia cupressina* L., metabolit sekunder, alkaloid, *E. coli*.

ABSTRACT

Aglaophenia cupressina L. is a marine organism with high prospect secondary metabolites. Previous research from *A. cupressina* L. nonpolar extract has discovered a new novel secondary metabolite. The goal of this research is to explore polar extract secondary metabolite from *A. cupressina* L. The polar extract isolated in this research showed a compound from alkaloid group. Bioactivity assay showed activity against *E. coli* from Gram negative group.

Keyword: *Aglaophenia cupressina* L., secondary metabolite, alkaloid, *E. coli*.

DAFTAR ISI

	Hal.
PRAKATA	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1. 1 Latar Belakang	1
1. 2 Rumusan Masalah	2
1. 3 Maksud dan Tujuan Penelitian	2
1. 3. 1 Maksud Penelitian	2
1. 3. 2 Tujuan Penelitian	2
1. 4 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2. 1 Tinjauan Umum Biota Laut dan Ekosistemnya	4
2. 2 Tinjauan Umum Bahan Alam Laut	5
2. 3 Metabolit Primer dan Sekunder	6
2. 4 Pendekatan Kekerabatan Dalam Penelusuran Bahan Alam	7
2. 5 Tinjauan Umum Filum Cnidaria	7
2. 6 Kandungan Bahan Alam Cnidaria	8
2. 7 Klasifikasi <i>Aglaophenia cupressina</i>	10
2. 8 Metode Isolasi Bahan Alam.....	11
2.8.1 Ekstraksi	11
2.8.2 Kromatografi	12
2.8.3 Rekrystalisasi	13
2. 9. Identifikasi	13
2.9.1 Uji Fitokimia	13
2.9.2 Spektroskopi Inframerah	14
2. 10 Uji Antibiotik	15
BAB III METODE PENELITIAN	
3. 1 Bahan	16
3. 2 Alat	16
3. 3 Waktu dan Tempat	16
3. 4 Prosedur	17
3. 4. 1 Penyiapan dan Pengolahan Sampel	17

3. 4. 2	Ekstraksi	17
3. 4. 3	Isolasi	17
3. 4. 4	Identifikasi Isolat	18
3. 4. 4. 1	Uji Fitokimia	18
3. 4. 4. 2	Identifikasi Spektra Infra Merah	19
3. 4. 5	Uji Bioaktivitas	20
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4. 1	Preparasi Sampel	21
4. 2	Ekstraksi dan Isolasi Sampel	21
4. 3	Identifikasi	25
4. 3. 1	Identifikasi Fisik Senyawa K	25
4. 3. 2	<i>Screening</i> Fitokimia	25
4. 3. 3	Pengukuran Spektrum IR	27
4. 4	Uji Bioaktivitas	28
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	
5. 1	Kesimpulan	33
5. 2	Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar		Hal.
Gambar 1.	Senyawa murni yang ditemukan dari <i>hydroid A. Pluma</i> .	9
Gambar 2.	Senyawa Aglaounhas dan Asam heksadekanoat dari fraksi nonpolar <i>hydroid Aglaophenia cupressina</i> L.	10
Gambar 3.	<i>Aglaophenia cupressina</i> .	11
Gambar 4.	Kromatogram senyawa K dengan perbandingan eluen kloroform: etil asetat: metanol; (a) 7:2:1 dan (b) 5:4:1.	25
Gambar 5.	Uji Wagner terhadap senyawa K.	26
Gambar 6.	Senyawa K dengan penambahan reagen Wagner dan HCl.	27
Gambar 7.	Spektrum IR senyawa K.	28
Gambar 8.	Kultur bakteri (a) <i>E. coli</i> dan (b) <i>S. aureus</i> pada 0 jam.	29
Gambar 9.	Kultur bakteri (a) <i>E. coli</i> dan (b) <i>S. aureus</i> setelah inkubasi 24 jam	30

DAFTAR TABEL

Tabel		Hal.
Tabel 1.	Metode Uji Golongan Senyawa Bahan Alam	14
Tabel 2.	Perbandingan eluen yang digunakan untuk tiap fraksi dan bobot masing-masing fraksi	23
Tabel 3.	Hasil uji fitokimia terhadap senyawa K.	26
Tabel 4.	Rata-rata diameter zona daya hambat antibiotik dan senyawa K terhadap bakteri uji.	30

Daftar Lampiran

Lampiran		Hal.
Lampiran 1.	Bagan Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Etil Asetat <i>Aglaophenia cupressina</i> L.	37
Lampiran 2.	Bagan Kerja Uji Fitokimia.	38
Lampiran 3.	Bagan Kerja Uji Antibakteri.	39
Lampiran 4.	Laporan Puncak Spektrum IR Senyawa K.	40
Lampiran 5.	Data diameter zona hambat Senyawa K dan dua antibiotik standar terhadap bakteri <i>E. coli</i> dan <i>S. aureus</i>	41

Daftar Singkatan

IR	Infrared (Infra merah).
mg	Miligram.
MHA	<i>Muller Hinton Agar.</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration.</i>
Mm	Millimeter.
L	Liter.
R_f	<i>Retention Factor.</i>
UV	Ultraviolet.

BAB I

PENDAHULUAN

1. 1 Latar Belakang

Keanekaragaman hayati di Indonesia telah dikenal luas sebagai salah satu yang terkaya di dunia. Telah banyak penelitian yang dilakukan terhadap keanekaragaman hayati Indonesia dalam upaya mengeksplorasi kandungan bahan alam yang terkandung di dalamnya. Namun selama ini kecenderungan penelitian bahan alam yang dilakukan oleh peneliti di Indonesia lebih mengarah pada makhluk hidup yang berada di daratan. Sedangkan penelitian bahan alam yang terkandung di dalam biota laut Indonesia masih kurang diminati oleh peneliti. Oleh karena itu peluang penelitian di bidang kimia bahan alam laut masih terbuka luas.

Beberapa penelitian yang telah dilakukan sebelumnya terhadap biota laut menunjukkan adanya berbagai isolat Kimia metabolit sekunder murni yang memiliki sifat bioaktif, bahkan telah ditemukan beberapa molekul yang bermanfaat sebagai antikanker, antibakteri, dan antivirus.

Aglaophenia cupressina L. merupakan salah satu biota laut yang hidup di sekitar perairan Takalar dan kepulauan Spermonde propinsi Sulawesi Selatan Indonesia. *Aglaophenia cupressina* L. merupakan spesies yang termasuk ke dalam golongan *hydroid* yang diketahui memiliki metabolit sekunder bersifat racun alami yang dikenal sebagai *marine toxin* (Beress, 1982). Pada fraksi nonpolar

hydroid Aglaophenia cupressina L. telah berhasil diisolasi beberapa metabolit sekunder yang memiliki sifat antibakteri (Johannes, 2008).

Penelitian ini dilakukan dengan maksud untuk menggali informasi lebih lanjut tentang metabolit sekunder yang terkandung di dalam *Aglaophenia cupressina* L., terutama yang terkandung di dalam fraksi polarnya. Diharapkan dengan penelitian ini dapat diperoleh informasi baru yang berguna di masa depan tentang kandungan apa saja yang terdapat dalam *hydroid* ini.

1. 2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diformulasikan dari latar belakang di atas antara lain:

- a. Apakah dalam fraksi etil asetat *Aglaophenia cupressina* terdapat metabolit sekunder yang prospektif?
- b. Kelompok metabolit sekunder apa yang dapat diisolasi dengan menggunakan pengekstraksi etil asetat dari *Aglaophenia cupressina*?
- c. Apakah metabolit sekunder dalam isolat etil asetat *Aglaophenia cupressina* L. memiliki kemampuan bioaktivitas?

1. 3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1. 3. 1 Maksud Penelitian

Maksud penelitian ini adalah untuk mengekstraksi dan menguji bioaktivitas metabolit sekunder yang terdapat dalam *hydroid Aglaophenia cupressina*, terutama yang terdapat dalam fraksi etil asetat.

1. 3. 2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari percobaan ini adalah:

- a. Mengisolasi kandungan metabolit sekunder *Aglaophenia cupressina* dengan menggunakan fraksi etil asetat.
- b. Mengidentifikasi kandungan metabolit sekunder fraksi etil asetat dari *Aglaophenia cupressina* L.
- c. Melakukan uji bioaktivitas antibakteri terhadap isolat.

1. 4 Manfaat Penelitian

Melalui penelitian ini diharapkan masyarakat mendapatkan manfaat berupa informasi tentang potensi sumber daya alam laut di sekitarnya berupa metabolit sekunder di dalam *Aglaophenia cupressina*. Melalui penelitian ini juga diharapkan peneliti mendapatkan kemampuan yang memadai dalam melakukan eksplorasi, isolasi, dan identifikasi kandungan metabolit sekunder dari makhluk hidup terutama biota yang berasal dari laut.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Laut merupakan gudang isolat Kimia yang menyimpan potensi besar sebagai sumber senyawa aktif. Laut dengan kondisinya yang unik dan ekstrim telah menempa morfologi dan sistem kimiawi makhluk yang hidup di dalamnya dengan cara yang luar biasa. Bentuk morfologi biota laut berevolusi sesuai adaptasi mereka terhadap lingkungan. Sedangkan sistem kimiawi mereka berevolusi dalam bentuk metabolit sekunder yang digunakan sebagai pertahanan (*marine toxin*) maupun untuk fungsi ekologi. Potensi biota laut dan metabolit sekundernya telah menarik perhatian banyak peneliti. Beberapa isolat Kimia yang berasal dari biota laut telah diketahui memiliki efek farmakologis. Hal inilah yang mendorong berkembangnya penelitian di bidang bahan alam laut.

2. 1 Tinjauan Umum Biota Laut dan Ekosistemnya

Laut menutupi sekitar 71 persen dari luas permukaan bumi. Lingkungan laut merupakan lingkungan hidup yang lebih baik daripada permukaan darat karena memiliki suhu yang relatif lebih stabil dan radiasi UV yang lebih rendah. Sekitar 80 persen dari tanaman dan hewan yang telah diketahui hidup di dalam laut. Karang koral mendominasi lingkungan laut dengan luas sekitar 19 milyar km² dengan variasi organisme dan produktivitas terbesar. Kompetisi untuk memperebutkan tempat dan nutrisi di antara organisme karang menyebabkan mereka mengembangkan mekanisme pertahanan yang unik, baik secara fisik maupun kimiawi (Ichiba, 1994).

Para ahli memperkirakan bahwa keragaman hayati di beberapa ekosistem laut, seperti pada karang koral di lantai bawah laut, lebih tinggi daripada di hutan hujan tropis. Organisme laut tanpa sistem pertahanan fisik mengembangkan mekanisme kimiawi sebagai kemampuan untuk mempertahankan diri. Mekanisme ini berupa sintesis *marine toxin* maupun simbiosis dengan mikroorganisme laut yang memiliki kemampuan menyintesis senyawa tersebut. Senyawa ini menghindarkan mereka dari gangguan seperti pemangsa dan pesaing lain dan juga digunakan untuk melumpuhkan mangsanya (Haefner, 2003).

2. 2 Tinjauan Umum Bahan Alam Laut

Prospek penelitian bahan alam di masa depan sangat cerah. Menurut Ichiba (1994), bahan alam merupakan sumber penting untuk pengembangan obat baru. Penelitian di bidang ini dapat mengarahkan penemuan senyawa obat baru yang efektif dan efisien. Dengan demikian, bahan baku dapat digunakan secara efisien dan hasil sampingan ataupun sampah yang dihasilkan tidak banyak dan tidak mengganggu lingkungan (Bohlin, dkk., 2010). Beberapa penelitian tentang bahan alam seperti metabolit sekunder bahkan telah menemukan senyawa-senyawa murni yang memiliki prospek sebagai antikanker (Schwartsmann, 2000), antibakteri (Blunt, 2005), dan antivirus (Goud, dkk., 2003).

Penelitian bahan alam laut baru dimulai beberapa dekade lalu, namun perkembangannya saat ini telah sangat pesat. Hal ini didukung oleh banyaknya senyawa murni dengan aktivitas biologis yang berguna bagi manusia yang telah diisolasi dari organisme yang hidup di dalam laut. Beberapa senyawa yang diisolasi dari organisme laut telah memberikan harapan bagi pengembangan obat baru untuk penyakit yang kini belum dapat disembuhkan (Fenical, 1996).

Penelitian bahan alam selama ini difokuskan pada pencarian senyawa obat, seperti obat antikanker dan sitotoksik. Pengujian sifat antikanker dan sitotoksik dilakukan dengan pengujian isolat pada biakan sel kanker maupun dengan metode sederhana dengan menggunakan *brine shrimp* (Corgiat, 1993).

2.3 Metabolit Primer dan Sekunder

Biota laut memproduksi bahan alam baik berupa metabolit primer maupun sekunder. Metabolit primer dimiliki oleh semua biota laut secara umum. Sedangkan metabolit sekunder merupakan metabolit unik yang diturunkan secara biosintetik dari metabolit primer dengan tujuan untuk bertahan dari serangan predator, memenangkan persaingan, dan sebagainya (Romimohtarto dan Juwana, 2007). Metabolit sekunder tidak memiliki fungsi esensial bagi kelangsungan organisme, namun memiliki fungsi strategis dalam mendukung kelangsungan hidup organisme tersebut (Mannito, 1981), contohnya untuk berevolusi (Bohlin, dkk., 2009) dan defensif (Wink, 2003). Selama ini spons dikenal mendominasi sumber bahan bioaktif dari laut, namun tidak menutup kemungkinan hewan lain juga memiliki bahan bioaktif, terutama organisme yang memiliki pertahanan kimiawi seperti *marine toxin* (Romimohtarto dan Juwana, 2007).

Metabolit sekunder dari hewan invertebrata laut diasumsikan sebagai bentuk pertahanan kimiawi. Salah satu alasannya adalah adanya korelasi kuat antara tidak adanya mekanisme pertahanan fisik pada invertebrata dan adanya produksi bahan kimia unik dari mereka. Hewan laut dengan badan lembut dan tidak bergerak terbukti memiliki lebih banyak metabolit sekunder daripada hewan laut yang memiliki pelindung dan dapat bergerak bebas (Pawlik, 1993). Salah satu contohnya adalah tridentatol yang ditemukan pada *hydroid* laut (filum:

coelenterata), *T.marginata*, yang menyusun 10 persen bobot keringnya. Tridentatol sangat penting dalam melindungi *T.marginata* dari paparan radiasi UV yang mematikan (Johnson, dkk., 1999). Metabolit sekunder dari filum coelenterata lainnya yang telah ditemukan berupa terpenoid seperti beragam jenis seskuiterpen (Blunt, dkk., 2007).

2. 4 Pendekatan Kekerabatan Dalam Penelusuran Bahan Alam

Penelusuran bahan alam kadang kala menggunakan pendekatan kekerabatan (*phylogenetic approach*). Pendekatan ini dilakukan dengan asumsi bahwa spesies-spesies yang memiliki kekerabatan taksonomi memiliki kemiripan pada komposisi kimianya. Hal ini disebabkan oleh karena spesies-spesies yang berkerabat berasal dari nenek moyang yang sama, sehingga jalur biogenetiknya memiliki kemiripan (sebagai contoh dalam Firm dan Jones, 2003). Melalui evolusi, spesies membentuk metabolit sekunder baru dan mewarisi metabolit sekunder dari pendahulunya (Wink, 2003).

Pendekatan kekerabatan ini sangat efisien dalam penelusuran bahan alam. Dengan memperhatikan hubungan taksonomi dari suatu spesies, peneliti dapat memperkirakan metabolit sekunder yang dimiliki dari spesies baru yang belum pernah diteliti sebelumnya.

2. 5 Tinjauan Umum Filum Cnidaria

Filum cnidaria (dikenal juga dengan coelenterata) merupakan filum dari hewan laut dengan ciri bentuk fisik simetrik radial dengan mulut berada di poros tubuh yang dikelilingi oleh tentakel. Bentuk badan cnidaria dapat dibedakan menjadi dua. Bentuk pertama adalah polipoid seperti pada hydra dan anemon laut,

berbentuk silinder dengan lubang oral menghadap ke atas dan lubang aboral melekat pada dasar. Bentuk kedua adalah bentuk medusoid seperti pada ubur-ubur (Vilee, 1978). Ciri khas filum cnidaria adalah sel-sel penyengat yang disebut nematosit. Nemosit merupakan sel penyengat yang unik yang ditemukan pada cnidaria, dimana tiap nematosit terdiri atas organel yang dikenal sebagai nematosist yang dilepaskan saat terjadi kontak dengan substrat asing yang sesuai (Lubbock, 1979). Filum ini juga memiliki kemampuan menyintesis produk seluler yang sangat kompleks yang disebut cnida (Daly, dkk., 2007).

Salah satu kelas dalam filum cnidaria adalah hydrozoa. Kelas hydrozoa terdiri atas hydra dan banyak macam spesies lainnya yang berkoloni yang dikenal sebagai *hydroid*. Hydrozoa tunggal seperti hydra tidak memiliki kerangka, sedangkan beberapa koloni *hydroid* di mana polipnya bertumbuh langsung dari dasarnya hanya memiliki kerangka penahan. Namun kebanyakan *hydroid* dengan tinggi 3 hingga 10 sentimeter memiliki kerangka luar yang menyerupai kitin yang dihasilkan oleh epidermisnya (Vilee, 1978).

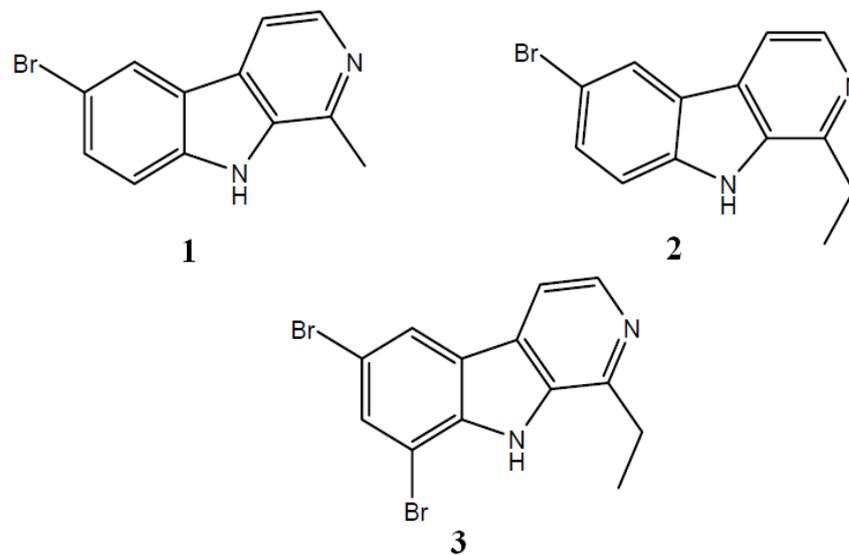
Kelas hidrozoa terdiri atas 2700 spesies. *Hydroid* bertumbuh pada bebatuan, cangkang kerang, dan tiang pancang dermaga. Hidrozoa memiliki baik struktur polipoid maupun struktur medusoid, dan beberapa spesies memiliki tahapan polipoid dalam siklus hidupnya (Rupert dan Barnes, 1994).

2. 6 Kandungan Bahan Alam Cnidaria

Cnidaria seperti koral memiliki kandungan senyawa organik dengan persentase bobot kering yang cukup banyak. Metabolit sekunder yang telah diisolasi dari filum ini umumnya merupakan kelompok terpenoid golongan seskuiterpen dan diterpen. Salah satu diterpen yang telah berhasil diisolasi dari

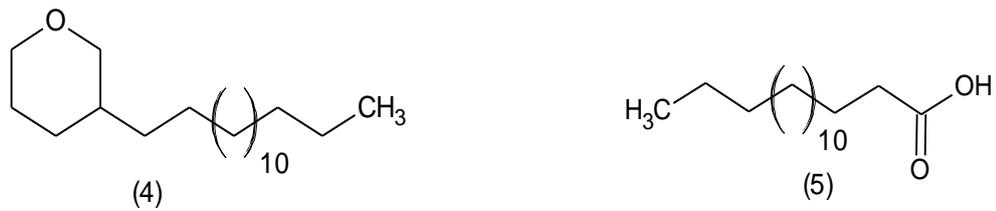
filum ini, sinularin, diketahui memiliki aktivitas antineoplastik (Scheuer, 1978 dan Beress, 1982). Kelompok lain dalam filum cnidaria selain koral masih sedikit diteliti, sehingga literatur penelitian bahan alam laut dari golongan cnidaria memiliki persentase yang lebih sedikit dibandingkan penelitian bahan alam dari golongan spons.

Beberapa hydrozoa dari genus *Aglaophenia* diketahui memiliki alkaloid. *Aglaophenia pluma* diketahui memiliki tiga jenis alkaloid dengan kerangka β – karbolin. Ketiga alkaloid tersebut antara lain 6-bromo-1-metil- β -karbolin (**1**), 6-bromo-1-etil- β -karbolin (**2**), dan 6,8-dibromo-1-etil- β -karbolin (**3**) (Till, 2007).



Gambar 1. Senyawa murni yang ditemukan dari *hydroid A. pluma*

Dalam penelitian sebelumnya (Johannes, 2008), telah ditemukan dua senyawa unik dalam fraksi nonpolar dari *hydroid Aglaophenia cupressina* L, Aglaounhas (**4**) dan asam heksadekanoat (**5**). Kedua senyawa ini diperoleh dari fraksinasi ekstrak n-heksana.



Gambar 2. Senyawa Aglaounhas dan Asam heksadekanoat dari fraksi nonpolar *hydroid Aglaophenia cupressina* L.

2. 7. Klasifikasi *Aglaophenia cupressina*

Aglaophenia cupressina L. termasuk golongan hewan laut yang dikenal sebagai *hydroid*. *Aglaophenia cupressina* L. membentuk koloni dengan morfologi seperti daun cemara. Koloni ini memiliki ciri khas berupa cairan lendir (mukus) gatal yang dikeluarkan sebagai pertahanan diri. Adapun klasifikasi dari spesies ini adalah sebagai berikut:

Filum: Cnidaria

Kelas: Hydrozoa

Ordo: Leptothecata

Famili: Aglaopheniidae

Genus: *Aglaophenia*

Spesies: *Aglaophenia cupressina* L.

(Zipcodezoo, 2009)



Gambar 3. *Aglaophenia cupressina*

2. 8. Metode Isolasi Bahan Alam

Bahan alam laut diperoleh dengan cara mengisolasi. Proses preparasi biota laut sedikit berbeda dengan biota yang hidup di daratan. Biota sampel sebelum digunakan harus dibersihkan dan dipisahkan dahulu dari kotoran berupa pasir atau makhluk hidup lain yang hidup bersama biota sampel. Pengolahan sampel selebihnya sama seperti pada umumnya, yaitu pengeringan sampel, maserasi bubuk halus sampel, dan pemekatan yang dilakukan dengan cara mengevaporasi maserat.

2.8.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan teknik yang sering digunakan dalam memisahkan senyawa bahan alam yang diinginkan dari campurannya. Ekstraksi juga digunakan dalam pemurnian bahan alam dari pengotornya. Pemisahan antara senyawa yang bersifat organik dengan pengotor atau bahan lain yang tidak diinginkan didasarkan pada perbedaan fasa antara bagian organik dan polar dari pelarut-pelarut yang digunakan untuk mengekstraksi (Mohrig, dkk., 2006). Proses ini merupakan proses paling awal dari isolasi bahan alam.

Proses ekstraksi yang umum digunakan adalah ekstraksi cair-cair. Dalam ekstraksi ini, pemisahan bahan alam didasarkan pada distribusi senyawa-senyawa dalam dua pelarut beda polaritas sesuai dengan kepolarannya. Pelarut yang digunakan biasanya memiliki beda polaritas, contohnya air atau metanol yang bersifat polar dengan heksana yang bersifat nonpolar. Karena senyawa lebih suka melarut dalam pelarut yang memiliki polaritas yang sama, maka pemisahan senyawa dari ekstrak kasarnya dapat lebih selektif (Mohrig, dkk., 2006).

2.8.2 Kromatografi

Metode kromatografi didasarkan pada pemisahan senyawa oleh fasa gerak dan fasa diam. Senyawa dengan tingkat kepolaran tertentu akan terpisah seiring gerakan fasa gerak, hingga pada titik tertentu gerakannya ditahan oleh fasa diam. Umumnya fasa gerak berupa gas atau cairan, sedangkan fasa diam adalah padatan atau cairan (Mohrig, dkk., 2006).

Senyawa dalam campuran terpisah karena perbedaan afinitasnya terhadap fasa diam dan kelarutannya terhadap fasa gerak. Terdapat keseimbangan dinamis antara komponen sampel yang terikat dengan fasa diam dengan yang terlarut dalam fasa gerak. Senyawa yang terpisah bergerak melalui fasa gerak, berinteraksi dengan fasa diam di sepanjang lintasannya. Pemisahan terjadi melalui dua proses:

- a. Adsorpsi ke dalam fase dan diikuti desorpsi ke dalam fasa gerak, atau
- b. Partisi antara fasa gerak dan fasa diam (Mohrig, dkk., 2006).

Teknik kromatografi yang sering digunakan dalam mengisolasi bahan alam adalah kromatografi lapis tipis, kromatografi kolom tekan, dan kromatografi kolom vakum.

2.8.3 Rekrystalisasi

Rekrystalisasi bertujuan untuk memurnikan senyawa yang telah difraksinasi dengan kromatografi. Secara garis besar, teknik ini merupakan proses pelarutan dan pengkristalan kembali kristal hasil isolasi. Kristal dilarutkan dalam pelarut panas hingga hampir mendidih, lalu kemudian didinginkan. Inti dari rekrystalisasi terletak pada kecermatan memilih pelarut yang sesuai. Senyawa harus memiliki kelarutan yang rendah dalam pelarut bersuhu dingin dan diharapkan dapat melarut perlahan saat pelarut dipanaskan. Diharapkan pula terdapat beda kelarutan yang besar antara pengotor dan senyawa target dalam pelarut yang digunakan, sehingga pengotor tidak ikut mengkristal saat proses rekrystalisasi (Mohrig. Dkk., 2006).

2. 9. Identifikasi

2. 9. 1 Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah salah satu uji yang umum dilakukan dalam indentifikasi senyawa bahan alam. Terdapat beberapa metode dasar uji fitokimia terhadap golongan-golongan senyawa bahan alam. Raaman (2006) merangkumkan beberapa metode dasar ini. Beberapa rangkuman metode tersebut disajikan di dalam Tabel 1.

Tabel 1. Metode Uji Golongan Senyawa Bahan Alam

Golongan senyawa bahan alam	Metode uji
Alkaloid	Tes Mayer
	Tes Wagner
	Tes Hager
	Tes Dragendorff
Karbohidrat	Tes Molish
	Tes Fehling
	Tes Barfoed
	Tes Benedict
Saponin	Tes gelembung
Fitosterol	Tes Liebermann – Burchard
Fenolik dan tannin	Tes FeCl ₃
	Tes gelatin
	Tes timbal asetat
	Tes reagen alkalin (NH ₄ OH)
	Tes reduksi Mg

2. 9. 2. Spektroskopi Inframerah

Selain dengan uji fitokimia, identifikasi senyawa bahan alam dapat juga dilakukan dengan spektroskopi inframerah. Radiasi inframerah mengacu pada spektrum elektromagnet yang berada pada daerah gelombang sinar tampak dan *microwave*. Batasan panjang gelombang yang umum digunakan untuk pendeteksian senyawa organik berkisar dari 4000 cm⁻¹ sampai 400 cm⁻¹. Posisi pita serapan IR ditentukan dengan menggunakan satuan cm⁻¹, sedangkan intensitasnya dapat ditentukan dengan satuan transmitan (T) ataupun absorbans (A) (Silverstein, dkk., 2005).

Tidak terdapat aturan-aturan baku tentang bagaimana mengidentifikasi spektrum IR. Namun beberapa persyaratan harus dipenuhi sebelum langkah intreperai spektrum dilakukan (Silverstein, 2005):

- a. Spektrum harus cukup terpisah dengan intensitas yang memadai.
- b. Spektrum harus berasal dari senyawa yang kemurniannya layak.

- c. Spektrofotometer harus dikalibrasi agar pita serapan teramati pada frekuensi atau panjang gelombang yang tepat.
- d. Metode penyiapan sampel harus spesifik.

2. 10. Uji Antibiotik

Antibiotik dapat didefinisikan sebagai senyawa organik alami dengan berat molekul kecil (metabolit sekunder) yang aktif melawan mikroorganisme pada konsentrasi yang rendah (Demain, 1999). Deteksi kemampuan antibiotik menjadi salah satu cara menguji bioaktivitas suatu metabolit sekunder.

Antibiotik yang aktif melawan bakteri disebut sebagai antibakteri. Antibakteri dapat digolongkan menjadi dua jenis: bakteriostatik yang hanya menahan pertumbuhan koloni bakteri, dan bakterisidal yang mampu membunuh koloni bakteri sepenuhnya (Pankey dan Sabbath, 2004).

Salah satu metode uji standar antibakteri adalah metode MIC (*minimum inhibitory concentration*). MIC dapat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan nampak mikroorganisme setelah inkubasi (Andrews, 2001).

Uji antibiotik umumnya dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan bakteri atau jamur yang didifusikan secara merata ke atas medium agar. Metabolit sekunder diimpregnasikan ke dalam *paper disc* (kertas saring yang dipotong menjadi lingkaran kecil) steril dan diletakkan ke atas medium agar. Bakteri dan metabolit sekunder selanjutnya diinkubasi dalam suhu sekitar 30 °C selama sehari (Tabarez, 2005). Daerah bening yang tampak pada medium agar di sekitar *paper disc* setelah inkubasi merupakan daerah zona hambat yang menunjukkan kemampuan antibiotik dari metabolit sekunder yang diujikan terhadap bakteri uji.