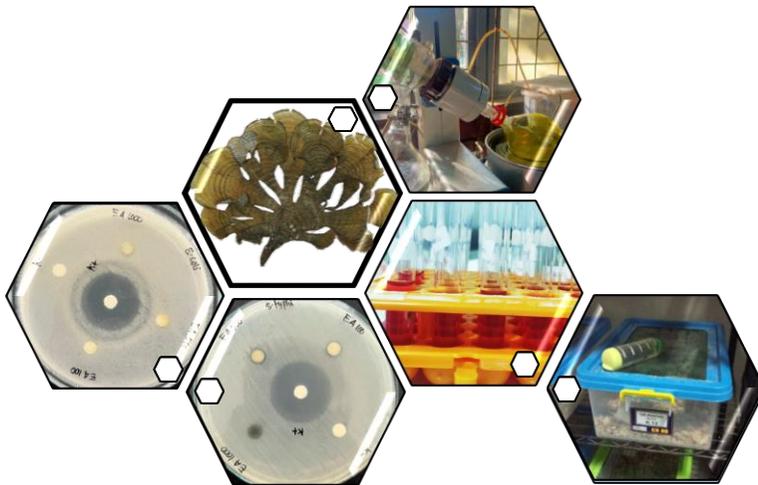


**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN ANTIBAKTERI METABOLIT SEKUNDER  
EKSTRAK ETIL ASETAT ALGA COKLAT (*Padina australis*) TERHADAP  
*Escherichia coli* DAN *Salmonella typhi***



**MUH. ARYA RAMADHAN A**  
**H031201066**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN ANTIBAKTERI METABOLIT SEKUNDER  
EKSTRAK ETIL ASETAT ALGA COKLAT (*Padina australis*) TERHADAP  
*Escherichia coli* DAN *Salmonella typhi***

**MUH. ARYA RAMADHAN A  
H031201066**



**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN ANTIBAKTERI METABOLIT SEKUNDER  
EKSTRAK ETIL ASETAT ALGA COKLAT (*Padina australis*) TERHADAP  
*Escherichia coli* DAN *Salmonella typhi***

MUH. ARYA RAMADHAN A  
H031201066

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

**PROGRAM STUDI KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

## SKRIPSI

# AKTIVITAS ANTIINFLAMASI DAN ANTIBAKTERI METABOLIT SEKUNDER EKSTRAK ETIL ASETAT ALGA COKLAT (*Padina australis*) TERHADAP *Escherichia coli* DAN *Salmonella typhi*

**MUH. ARYA RAMADHAN A**  
**H031201066**



telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Sains pada tanggal 10 Desember  
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Makassar

Mengesahkan:  
Pembimbing Utama,

  
Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS  
NIP. 19601215 198702 2 001

Menyetujui:  
Ketua Departemen Kimia,

  
Dr. St. Fauziah, M.Si  
NIP. 19720202 199903 2 002

**PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI  
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Aktivitas Antiinflamasi dan Antibakteri Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Alga Coklat (*Padina australis*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Prof. Dr, Nunuk Hariani Soekamto, M.S. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 10 Desember 2024



*Arya Ramadhan A*

ARYA RAMADHAN A  
H031201066

## Ucapan Terima Kasih

Alhamdulillah Rabbil Alamin, Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas berkah dan rahmatnya-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan skripsi ini dengan judul “**Aktivitas Antiinflamasi dan Antibakteri Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Alga Coklat (*Padina australis*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi***” sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dan dorongan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, M.S selaku pembimbing utama tugas skripsi. Terima kasih atas kesempatan, ilmu, dan kepercayaan serta bimbingan selama proses penyelesaian skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Ahyar Ahmad dan Bapak Dr. Syahrudin Kasim, S.Si., M.Si. selaku dosen penguji. Terima kasih atas segalam ilmu dan masukan yang diberikan selama penyusunan skripsi ini.
3. Ibu Dr. St. Fauziah, M.Si dan Ibu Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si selaku ketua dan sekretaris Departemen Kimia serta seluruh dosen dan staf pegawai Departemen Kimia FMIPA UNHAS atas bimbingan, ilmu dan bantuan yang diberikan selama proses perkuliahan.
4. Orang tua tercinta dan terkasih. Ayah Ambo Tuwo dan Ibu Rosmaladewi Amri bersama keempat kakak penulis tercinta Kak Efy, Eli, Ade, Dea atas jasa-jasa yang tak terbalaskan yang selalu memberikan dukungan, motivasi serta dorongan kepada penulis dan begitupula dengan seluruh keluarga.
5. *Organic Chemist*. Dewi, Dian, Sepri, Yupita, Dwi, Amel, Bernita, Kak Alfi, dan Kak Anrif. Terima kasih untuk pendampingan selama proses penelitian mulai awal hingga akhir yang melewati banyak hal.
6. *Ikan Hiu*. Imel, Qalbi, Nalar, Putri, Kayen, Fiki, dan Harwan. Terima kasih telah menemani semua proses perkuliahan mulai MABA hingga saat ini dan selamanya. Tiada hal yang dapat menggantikan setiap dukungan dan motivasi dalam menyelesaikan penelitian ini.
7. Teman seperjuangan di ruangan anorganik yakni Alya, Kadek, Leony, dan Andini. Terus memberikan dukungan hingga penyelesaian penelitian ini.
8. Teman-teman seangkatan Kimia 2020 (ISOMER) yang memberikan banyak kesan serta membantu membuat kisah selama proses perkuliahan.
9. *Asep Genk*. Kordes Fadly, Kisana, Chill, Emak Livi, Rara, Walda, Syifa, Isma, dan Ismi. Sahabat sekaligus keluarga KKN Unhas Gel.110 Kel. Mallawa, Barru yang menemani dan memberikan motivasi dengan canda tawanya.
10. *Bisquad*. Best friends yang tidak dapat disebutkan satu-satu. Terima kasih atas saran, masukan dan semangat yang diberikan dalam menyelesaikan skripsi ini.
11. *Me, Myself and I*. Terima kasih telah berjuang dan semangat dalam menyelesaikan skripsi ini walaupun mengalami banyaknya halangan dan rintangan dan tidak mengeluh hingga selesai.

12. Kepada segenap pihak yang tidak sempat penulis sebutkan satu-persatu yang telah banyak berjasa dan senantiasa membantu penulis dalam penyelesaian studi di Jurusan Kimia FMIPA UNHAS, Terima kasih.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna, sehingga dengan segala kerendahan hati penulis sangat mengharapkan kritikan dan saran yang bersifat membangun untuk memperbaiki kekurangan yang ada. Penulis pun tetap berharap agar tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya.

Penulis,

Muh. Arya Ramadhan A  
H031 20 1066

## ABSTRAK

MUH. ARYA RAMADHAN A. **Aktivitas Antiinflamasi dan Antibakteri Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat Alga Coklat (*Padina australis*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*** (dibimbing oleh Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS).

**Latar Belakang.** Alga coklat *Padina australis* teridentifikasi mengandung beragam senyawa bioaktif yang dapat diperoleh dari proses ekstraksi. Ekstrak etil asetat *Padina australis* menunjukkan potensi sebagai antibakteri, namun potensi antiinflamasinya masih kurang dieksplorasi. Pengujian antiinflamasi dan antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* penting untuk mengetahui potensi ekstrak dalam mengatasi infeksi bakteri dan inflamasi. **Tujuan.** Mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat *Padina australis*, aktivitas antiinflamasi dan antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dari ekstrak etil asetat *Padina australis*. **Metode.** *Padina australis* diekstraksi menggunakan metode maserasi bertingkat dengan tiga sistem pelarut yang kemudian diperoleh ekstrak etil asetat yang dilanjutkan fraksinasi, uji fitokimia, uji antiinflamasi dengan metode stabilitas sel darah merah, dan uji antibakteri secara *in vitro* serta uji titik leleh dan penentuan gugus fungsi isolat. **Hasil.** Ekstraksi *Padina australis* dengan pelarut etil asetat diperoleh rendemen sebesar 0,8937%. Uji fitokimia menunjukkan ekstrak mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, steroid, dan asam lemak. Isolat yang diperoleh sebesar 156,5 g dengan titik leleh 46-48 °C. Aktivitas antiinflamasi ekstrak etil asetat menunjukkan stabilitas membran sel darah merah terbaik sebesar 59,94% pada konsentrasi 400 ppm. Nilai IC<sub>50</sub> ekstrak yang diperoleh sebesar 277,977 ppm dengan potensi sangat lemah sebagai agen antiinflamasi. Aktivitas antibakteri ekstrak tergolong moderat terhadap *S. typhi* dengan penghambatan 7,15 mm pada 500 ppm, dan tidak aktif pada bakteri *E. coli*. **Kesimpulan.** Ekstrak etil asetat *Padina australis* mengandung senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid, alkaloid, steroid, dan asam lemak serta memiliki potensi sebagai agen antiinflamasi dan antibakteri, dengan isolat yang diperoleh dari ekstrak etil asetat adalah asam lemak.

**Kata kunci:** antibakteri; antiinflamasi; isolasi; metabolit sekunder; *Padina australis*

## ABSTRACT

MUH. ARYA RAMADHAN A. **Anti-Inflammatory and Antibacterial Activity Secondary Metabolite of Ethyl Acetate Extract of Brown Algae (*Padina australis*) Against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi*** (supervised by Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, MS).

**Background.** Brown algae *Padina australis* has been identified as containing various bioactive compounds that can be obtained from the extraction process. Ethyl acetate extract of *Padina australis* shows potential as an antibacterial, however its anti-inflammatory potential is still underexplored. Anti-inflammatory and antibacterial testing against *Escherichia coli* and *Salmonella typhi* is important to determine the potential of the extract to overcome bacterial infections and inflammation. **Objectives.** To determine the secondary metabolite compounds contained in the ethyl acetate extract of *Padina australis*, anti-inflammatory and antibacterial activity against *E. coli* and *S. typhi* bacteria from the ethyl acetate extract of *Padina australis* **Methods.** *Padina australis* was extracted using a multilevel maceration method with three solvent systems which then obtained ethyl acetate extract which was continued with fractionation, phytochemical tests, anti-inflammatory tests using the red blood cell stability method, and in vitro antibacterial tests as well as melting point tests and determination of isolate functional groups. **Results.** Extraction of *Padina australis* with ethyl acetate solvent obtained a yield of 0.8937%. Phytochemical tests showed that the extract contained flavonoid, alkaloid, steroid, and fatty acids compounds. The isolate was 156.5 g with a 46-48 °C melting point. The anti-inflammatory activity of ethyl acetate extract showed the best red blood cell membrane stability of 59.94% at a concentration of 400 ppm. The IC<sub>50</sub> value of the extract obtained was 277.977 ppm with very weak potential as an anti-inflammatory agent. The antibacterial activity of the extract was moderate against *S. typhi* with an inhibition of 7.15 mm at 500 ppm and was inactive on *E. coli* bacteria. **Conclusion.** Ethyl acetate extract of *Padina australis* contains secondary metabolite compounds of flavonoids, alkaloids, steroids, and fatty acids groups. It has potential as an anti-inflammatory and antibacterial agent, with the isolate obtained from the ethyl acetate extract being fatty acids.

**Keywords:** antibacterial; anti-inflammatory; isolation; *Padina australis*; secondary metabolite

## DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK .....	iii
ABSTRACT .....	iv
DAFTAR ISI .....	v
DAFTAR TABEL .....	vi
DAFTAR GAMBAR .....	vii
DAFTAR LAMPIRAN .....	viii
DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Teori .....	3
1.3 Rumusan Masalah .....	5
1.4 Maksud dan Tujuan Penelitian .....	5
1.4.1 Maksud Penelitian .....	5
1.4.2 Tujuan Penelitian .....	5
1.5 Manfaat Penelitian .....	5
BAB II METODE PENELITIAN .....	6
2.1. Bahan Penelitian .....	6
2.2. Alat Penelitian .....	6
2.3. Waktu dan Tempat Penelitian .....	6
2.4. Prosedur Penelitian .....	6
2.4.1 Preparasi Sampel .....	6
2.4.2 Ekstraksi .....	7
2.4.3 Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat .....	7
2.4.4 Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Kolom .....	8
2.4.5 Pemurnian .....	8
2.4.6 Karakterisasi Senyawa .....	8
2.4.7 Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara <i>In Vitro</i> dengan Metode HRBC .....	9
2.4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Secara <i>In Vitro</i> dengan Metode Difusi Cakram .....	10
BAB III HASIL PENELITIAN .....	12
3.1 Preparasi Sampel .....	12
3.2 Ekstraksi Alga Coklat <i>Padina australis</i> .....	12
3.3 Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat <i>Padina australis</i> .....	13
3.4 Fraksinasi dan Pemurnian Senyawa .....	16
3.5 Karakterisasi Senyawa Isolat .....	23
3.6 Uji Aktivitas Antinflamasi Ekstrak Etil Asetat <i>Padina australis</i> secara <i>In Vitro</i> .....	24
3.7 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat <i>Padina australis</i> secara <i>In Vitro</i> .....	27
BAB IV KESIMPULAN .....	29
4.1 Kesimpulan .....	29
DAFTAR PUSTAKA .....	30
LAMPIRAN .....	37

**DAFTAR TABEL**

<b>Nomor Urut</b>		<b>Halaman</b>
1.	Hasil uji fitokimia ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> .....	16
2.	Fraksi gabungan hasil KKV ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> .....	20
3.	Fraksi gabungan hasil KKV fraksi EA III <i>Padina australis</i> .....	22
4.	Hasil % inhibisi hemolisis ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> .....	27
5.	Regresi linear inhibisi hemolisis membran sel darah merah .....	28
6.	Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> .....	28

## DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Alga coklar <i>Padina australis</i> .....	3
2. Rendemen hasil ekstrak <i>Padina australis</i> .....	13
3. Reaksi senyawa alkaloid dengan reagen Wagner dan Dragendorff .....	14
4. Reaksi senyawa flavonoid dengan H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pekat .....	15
5. Reaksi senyawa steroid dengan reagen Lieberman-Burchard .....	15
6. Reaksi senyawa asam lemak dengan NaOH dan dipanaskan .....	16
7. Kromatogram ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> Setelah dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	16
8. Kromatogram ekstrak etil asetat <i>Padina australis</i> setelah dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (0,6:9,4) [1], etil asetat: <i>n</i> -heksana (1:9) [2], dan etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) [3] .....	17
9. Kromatogram hasil elusi sebanyak 4x menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (0,6:9,4) .....	17
10. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fraksinasi KKV yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	18
11. Kromatogram ekstrak etil asetat hasil fraksinasi KKV yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (5:5) .....	18
12. Kromatogram fraksi 1-15 yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	19
13. Kromatogram fraksi 15-23 yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (5:5) .....	19
14. Kromatogram fraksi gabungan EA I-VIII yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	20
15. Kromatogram profil noda fraksi EA III dengan pemisahan yang baik menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	21
16. Kromatogram hasil elusi sebanyak 5x menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (1:9) .....	21
17. Kromatogram fraksi 1-14 yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) .....	21
18. Kromatogram fraksi 15-21 yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (5:5) .....	22
19. Kromatogram fraksi gabungan (EA III.1-8) yang dielusi menggunakan eluen etil asetat: <i>n</i> -heksana (2,5:7,5) .....	22
20. Fraksi EA III. 1 .....	23
21. Kromatogram EA 1 hasil analisis KLT menggunakan 3 sistem eluen yang berbeda, yaitu aseton: <i>n</i> -heksana (1:9) [1], etil asetat: <i>n</i> -heksana (2:8) [2], dan metanol:etil asetat (0,5:9,5) [3] .....	23
22. Isolat murni EA 1 .....	24
23. Spektrum FT-IR isolat EA1 .....	25
24. Diagram stabilitas sel darah merah ekstrak etil asetat <i>P. australis</i> .....	27

**DAFTAR LAMPIRAN**

<b>Nomor Urut</b>		<b>Halaman</b>
1.	Diagram Alir Penelitian .....	38
2.	Prosedur Penelitian .....	39
3.	Perhitungan Data Penelitian .....	48
4.	Dokumentasi Penelitian .....	50
5.	Data Analisis Uji Antiinflamasi Metode <i>Human Red Blood Cell</i> .....	53

**DAFTAR SIMBOL DAN SINGKATAN**

---

<b>Simbol/singkatan</b>	<b>Arti dan Penjelasan</b>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
FT-IR	<i>Fourier Transform Infra-Red</i>
HRBC	<i>Human red blood cell</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Inhibitory Concentration 50%</i>
KLT	Kromatografi Lapis Tipis
KKG	Kromatografi Kolom Gravitasi
KKV	Kromatografi Kolom Vakum
NA	<i>Nutrient agar</i>
NSAID	<i>Nonsteroid anti-inflammation drug</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
UV-Vis	<i>Ultraviolet-visible</i>
WHO	<i>World health organization</i>

---

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Keberagaman alga di Indonesia dipengaruhi oleh kondisi perairan dan mewakili sekitar  $\pm 6.42\%$  bagian dari biodiversitas alga secara global (Sofiana et al., 2022). Menurut Kepel et al. (2019), Indonesia memiliki 452 spesies alga merah, 196 alga hijau, dan 134 alga coklat berdasarkan ekspedisi Siboga. Sebaran alga di Provinsi Sulawesi Selatan sangat melimpah. Berdasarkan penelitian Yaqin et al. (2011), ditemukan 70 spesies alga, yang terdiri dari 23 spesies alga hijau, 28 spesies alga merah, dan 19 spesies alga coklat di perairan Sulawesi Selatan. Hal ini menunjukkan kondisi perairan di Sulawesi Selatan memberikan dukungan yang baik bagi pertumbuhan alga. Hasil penelitian Anwar dan Burhanuddin (2016), menunjukkan perairan di Kabupaten Selayar cocok dilakukan budidaya alga coklat sehingga dipilih sebagai tempat pengambilan sampel.

Pertumbuhan alga coklat umumnya di daerah pesisir pantai yang menempel pada substrat batu dan cangkang sehingga mudah dikumpulkan dan melimpah. Selain itu, nutrisi yang terkandung dalam alga coklat sangat melimpah dibandingkan alga lainnya (Ilyas et al., 2023). Oleh karena itu, alga coklat banyak dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri. Selain itu, alga coklat memiliki potensi pada bidang kesehatan karena dapat menjadi agen antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antikanker.

Salah satu spesies alga coklat yang diketahui adalah *Padina australis*. Beberapa penelitian menunjukkan *P. australis* berpotensi sebagai antibakteri, antioksidan, antiinflamasi, antikanker, dan antiaterosklerosis (Sadvika et al., 2022). Metabolit sekunder yang terkandung dalam *P. australis* seperti, terpenoid, alkaloid, steroid, dan flavonoid dapat menjadi agen antibakteri dan antiinflamasi (Hasanela dan Souhoka, 2019). Selain itu, jenis metabolit sekunder lainnya adalah asam lemak seperti asam miristat, asam palmitat, asam oleat, dan asam linoleat yang dapat berpotensi menjadi agen antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antidiabetes, antibakteri dan antijamur (Hartanto dan Silitonga, 2018). Kandungan metabolit sekunder dari *P. australis* dapat diperoleh dari bentuk ekstrak dengan menggunakan pelarut organik seperti, *n*-heksana, etil asetat dan metanol.

Pelarut organik mempunyai kemampuan berbeda dalam melarutkan senyawa bioaktif. Salah satu contohnya adalah pelarut etil asetat dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa bioaktif yang bersifat semi polar seperti flavonoid, saponin, terpenoid, sterol, dan tanin (Hidayati et al., 2017). Berdasarkan beberapa penelitian yang terkait penggunaan ekstrak etil asetat *P. australis* dilaporkan berpotensi sebagai agen antibakteri dan antioksidan serta antikanker (Saputra et al., 2024). Penelitian terkait pemanfaatan ekstrak etil asetat *P. australis* sebagai agen antiinflamasi masih kurang, tetapi senyawa bioaktif yang terkandung didalamnya seperti, flavonoid, tanin, saponin, dan terpenoid berpotensi sebagai antiinflamasi (Sadvika et al., 2022). Oleh karena itu, diperlukan tindak lanjut pengujian antiinflamasi ekstrak alga coklat *P. australis*.

Beberapa penelitian menyatakan bahwa *P. australis* memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi. Berdasarkan penelitian Chellappan et al. (2020), melaporkan bahwa spesies *Padina* memiliki efek antiinflamasi yang lebih baik dibandingkan spesies *Sargassum* yang dibuktikan dengan proses penghambatan inflamasi yang lebih lama.

Ekstrak *P. australis* juga memiliki efek antiinflamasi yang lebih besar dibandingkan ekstrak *S. polycystum* yang dilakukan secara *in vivo* menggunakan tikus (Asmawati et al., 2016).

Pengujian antiinflamasi umumnya dilakukan secara *in vivo* menggunakan hewan uji, tetapi harus dilakukan uji *in vitro* terlebih dahulu untuk mengetahui potensi pengaruh biologis sebelum diujikan ke makhluk hidup. Salah satu metode pengujian antiinflamasi secara *in vitro* adalah metode stabilitas *human red blood cell* (HRBC). Metode ini digunakan karena adanya kemiripan struktur antara sel darah merah dengan sel lisosom, yang memiliki peran utama dalam proses inflamasi. Sel darah merah stabil dengan konsumsi sumber daya, seperti glukosa dari luar sel dan oksidasi sumber daya dalam sel untuk menghasilkan energi. Sel darah merah yang stabil dapat menghambat proses inflamasi (Burhanuddin dan Kasta, 2023).

Inflamasi biasanya disebabkan adanya infeksi, panas, alergi, dan cedera dengan dua kategori yaitu inflamasi akut dan kronis. Menurut data *World Health Organization* (2023) menunjukkan penderita inflamasi di dunia mencapai 18 juta jiwa dan kasus di Asia Tenggara mencapai 4,4 juta jiwa penderita inflamasi. Pengobatan dengan menggunakan obat antiinflamasi golongan steroid maupun nonsteroid yang berbahan kimia dilaporkan dapat menimbulkan efek samping seperti gangguan pencernaan, ginjal, dan fungsi trombosit (Zaini et al., 2016). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan alternatif obat menggunakan bahan alam yang tidak memiliki efek samping.

Penelitian lainnya telah menunjukkan bahwa *P. australis* memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri di berbagai jenis bakteri, baik bakteri gram positif maupun negatif. Berdasarkan penelitian Assegaf dan Insafitri (2023), menunjukkan bahwa ekstrak total metanol *P. australis* lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* dibandingkan rumput laut coklat lainnya. Selain itu, ekstrak metanol *P. australis* memiliki aktivitas penghambatan kategori sangat kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* dan aktivitas penghambatan kategori kuat terhadap bakteri *Salmonella typhimurium* (Kolanus dan dompeipen, 2017). Penelitian yang dilakukan oleh Warsidah et al. (2022), menunjukkan bahwa ekstrak etanol dan etil asetat dari *P. pavonica* memiliki potensi antibakteri terhadap *E. coli*. Berdasarkan data tersebut, pengujian antibakteri terhadap ekstrak etil asetat *P. australis* masih perlu dilanjutkan untuk mengetahui penghambatannya secara spesifik.

Pengujian antibakteri yang dilakukan menggunakan bakteri *E. coli* dan *S. typhi*. Bakteri *E. coli* dipilih karena termasuk bakteri gram negatif yang menyebabkan penyakit diare (Trisno et al., 2019). Menurut data WHO (2024), penyakit diare merupakan penyebab kematian kedua yang terjadi pada anak dengan kasus mencapai 1,7 miliar per tahun dengan angka kematian mencapai 443.832 jiwa pada anak balita dan 50.851 jiwa pada anak umur 5-9 umur. Bakteri lainnya adalah *S. typhi* yang termasuk bakteri gram negatif dapat menyebabkan demam tipes. Insiden demam tipes di Asia sebesar 267,6 kasus per 100.000 jiwa pertahunnya dengan kasus tipes di Indonesia mencapai 41.081 kasus (Atzmardina et al., 2023).

Berdasarkan data tersebut, perlu pencarian pengobatan alternatif dengan memanfaatkan penggunaan ekstrak bahan alam seperti alga coklat. Pemilihan bakteri dalam pengujian antibakteri memiliki signifikansi yang penting untuk menilai efektivitas antibakteri dan mengidentifikasi jenis bakteri yang paling responsif terhadap ekstrak atau

senyawa yang sedang diuji (Trisno et al., 2019). Kedua bakteri yang dipilih termasuk bakteri gram negatif karena berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh El-Fatimy dan Said (2011), menunjukkan bahwa ekstrak *P. australis* memiliki diameter zona hambat pada bakteri gram negatif lebih besar dibandingkan pada bakteri gram positif. Oleh karena itu, *P. australis* berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram negatif, namun diperlukan penelitian lebih lanjut untuk memperjelas hal ini.

Berdasarkan uraian tersebut, ekstraksi alga coklat *P. australis* dan identifikasi metabolit sekunder ekstrak etil asetat yang dilanjutkan dengan uji aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dengan metode stabilitas HRBC serta uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* dengan metode difusi cakram dapat dilakukan sebagai salah satu upaya pencarian alternatif obat dari bahan alam.

## 1.2 Teori

*Padina australis* dapat tumbuh baik pada substrat batu dan cangkang (Hidayati et al., 2022). Selain itu, variasi morfologi tumbuhan dipengaruhi oleh perbedaan kondisi lingkungan seperti substrat, nutrisi, kuat arus, dan oksigen terlarut (Ghazali et al., 2021). Bentuk alga coklat *P. australis* terdiri dari bagian *thallus* yang berbentuk seperti pipih dengan bentuk percabangan berpusat melingkari batang utama (*intricate*) (Kandati et al., 2021). Alga coklat ini berwarna keputihan hingga kecoklatan. Struktur *P. Australis* yang memiliki *holdfast* yang terdiri dari rizoid yang fleksibel sebagai alat perekat di substrat. *Blade* berbentuk kipas dengan panjang mencapai 15 cm dengan ketebalan 2 mm seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1 (Benita et al., 2018).



**Gambar 1.** Alga coklat *P. australis* (Benita et al., 2018)

*P. australis* memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi. Senyawa seperti saponin, alkaloid, flavonoid, fenol, triterpenoid, dan tanin merupakan contoh senyawa bioaktif yang terkandung dalam *P. australis* (Hidayati et al., 2022). Penelitian lain menunjukkan bahwa *P. australis* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, dan asam lemak jenuh (Khadijah et al., 2021). Penggunaan pelarut organik seperti etil asetat, sering digunakan untuk mengekstrak senyawa bioaktif yang terkandung di dalam bahan alam. Setiap pelarut organik mempunyai kemampuan berbeda dalam melarutkan senyawa bioaktif seperti etil asetat dapat digunakan untuk mengekstrak senyawa bioaktif yang bersifat semi polar seperti flavonoid, saponin, terpenoid, sterol, dan tanin. Senyawa bioaktif yang terkandung di dalam ekstrak etil asetat tersebut berpotensi dijadikan sebagai agen antiinflamasi dan antibakteri. Senyawa bioaktif lainnya yang diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi dan antibakteri adalah

senyawa golongan asam lemak tertentu seperti asam miristat, asam palmitat dan asam linoleat. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Caillas-Vargas et al. (2021), menyatakan asam miristat dapat mengganggu membran lipid bakteri yang menyebabkan kerusakan sel. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Dalimonthe (2017), menunjukkan asam palmitat dapat menghambat bakteri gram positif dan asam linoleat yang dapat menghambat mediator inflamasi yang menyebabkan terjadinya inflamasi.

Peradangan (inflamasi) merupakan respon protektif atau penyembuhan terhadap luka tubuh yang ditandai dengan rangkaian reaksi kompleks yang dapat disebabkan oleh zat beracun, bakteri, dan sel yang rusak (Adegbaju et al., 2020). *Non-Steroid Anti-Inflammation Drug* (NSAID) adalah salah satu pilihan pengobatan untuk mengatasi peradangan, nyeri dan demam, namun memiliki efek samping seperti iritasi lambung yang dapat menyebabkan tukak lambung (Gunathilake et al., 2018). Oleh karena itu, diperlukan alternatif obat dari bahan alam yang mengandung senyawa bioaktif seperti senyawa fenolik, tanin terkondensasi, tanin, flavonoid, kumarin, alkaloid, saponin, sterol, dan terpenoid yang berpotensi sebagai agen antiinflamasi (Mohammed et al., 2014).

Uji aktivitas antiinflamasi dari bahan alam dapat diamati melalui proses penghambatan terhadap sel atau enzim yang menyebabkan inflamasi terjadi. Salah satu pengujian antiinflamasi adalah stabilitas HRBC yang mengukur tingkat kerusakan membran eritrosit yang diinduksi oleh stresor tertentu, seperti panas atau hipotonisitas dan kemudian mengevaluasi tingkat stabilisasi membran oleh zat uji (Salve et al., 2022). Metode stabilitas HRBC dipilih untuk uji evaluasi *in vitro* antiinflamasi karena membran eritrosit mirip dengan membran lisosom dan stabilisasinya menyiratkan bahwa ekstrak dapat menstabilkan membran lisosom (Armadany dkk., 2019). Stabilisasi membran lisosom penting dalam membatasi respon inflamasi dengan mencegah pelepasan konstituen lisosom (Saleem et al., 2011).

Antibakteri adalah bahan kimia yang memiliki kemampuan untuk menonaktifkan bakteri. Inaktivasi bakteri dapat berupa hal-hal seperti penghambatan pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau membunuh bakteri (bakterisida) (Hamzah et al., 2019). Pemilihan bakteri dalam pengujian antibakteri didasarkan pada besarnya responsif bakteri terhadap ekstrak atau senyawa yang diujikan dan diamati dengan melihat diameter zona hambat yang terjadi (Trisno et al., 2019). Bakteri *E. coli* dan *S. typhi* dapat menyebabkan infeksi pada saluran pencernaan dan keduanya termasuk bakteri gram negatif. Kedua bakteri ini dipilih karena berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh El-Fatimy dan Said (2011), menunjukkan bahwa ekstrak *P. australis* memiliki diameter zona hambat pada bakteri gram negatif lebih besar dibandingkan pada gram positif. Hal ini ditunjang oleh penelitian yang dilakukan oleh Manivannan et al. (2011), menunjukkan bahwa ekstrak *P. gymnospora* menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *E. coli*, *Salmonella* sp. dan *Vibrio* sp., yang merupakan bakteri gram negatif. Data aktivitas antibakteri tersebut dapat menjadi dasar pemilihan kedua bakteri gram negatif tersebut, tetapi aktivitas antibakteri berbeda tergantung pada kondisi pengujian dan metode yang digunakan.

Uji aktivitas antibakteri bahan alam dapat diamati melalui respon pertumbuhan mikroorganisme terhadap sampel yang kontak langsung dengan bakteri uji tersebut. Salah satu pengujian antibakteri adalah metode difusi yang dilakukan untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap agen antibakteri (Sari et al., 2022). Jenis metode difusi

adalah difusi cakram dengan cakram kertas saring (berdiameter sekitar 6 mm) yang berisi senyawa uji ditempatkan pada permukaan media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Indikator pengamatan berupa ada tidaknya zona hambat (daerah bening) di sekeliling agen antibakteri pada waktu inkubasi. Keunggulan uji difusi cakram yaitu sederhana, biaya rendah, mampu menguji sejumlah mikroorganisme, dan mudah menafsirkan hasil yang diberikan (Balouiri et al., 2016).

### 1.3 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

1. apa saja golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* melalui uji fitokimia?
2. bagaimana aktivitas antiinflamasi ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis*?
3. bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*?

### 1.4 Maksud dan Tujuan Penelitian

#### 1.4.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis*, menguji aktivitas antiinflamasi ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* secara *in vitro* dengan metode stabilitas HRBC dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* secara *in vitro* dengan metode difusi cakram.

#### 1.4.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah:

1. mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* melalui uji fitokimia
2. menganalisis aktivitas antiinflamasi ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis*
3. menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat alga coklat *Padina australis* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*

### 1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hubungan aktivitas antiinflamasi dan antibakteri dengan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etil asetat *Padina australis* yang dihasilkan serta dapat menjadi alternatif obat berdasarkan bioaktivitasnya.

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu alga coklat *Padina australis*, n-heksana teknis, etil asetat teknis, metanol teknis, aseton teknis, plat KLT, silika gel 60 GF 254, kieselgel 60 (0,063-0,200 mm), akuades, serium sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ , Merck), etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , Merck), serbuk magnesium (Mg, Merck), asam klorida (HCl, Merck), merkuri klorida ( $\text{HgCl}_2$ , Merck), kalium iodida (KI, Smart Lab), besi (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ , Pudak), kloroform (Merck), asam asetat glasial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , Merck), asam sulfat ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , Merck), kalium bromida (KBr, Merck), tikus putih betina, natrium diklofenak, eter, dikalium hidrogen fosfat, kalium dihidrogen fosfat, natrium klorida, bakteri *Salmonella typhi*, bakteri *Escherichia coli*, alkohol 70% (Onemed), media *Nutrient Agar* (NA, Merck), barium klorida ( $\text{BaCl}_2$ , Merck), *paper disc*, ciprofloxacin, *aluminium foil*, plastik *wrapped*, kertas saring Whatman 01, dan pipa kapiler.

### 2.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu peralatan gelas yang umum di laboratorium, *blender*, stoples, timbangan, neraca analitik (Ohaus), pompa vakum, corong buchner, *rotary evaporator* (Hanhshin), mikropipet beserta *bluetip* dan *yellowtip*, *chamber* KLT, seperangkat alat kromatografi kolom vakum (KKV) dan kromatografi kolom gravitasi (KKG), lampu UV 245 nm dan UV 365 nm, *hotplate*, alat *melting point*, spektrofotometer FT-IR (Shimadzu 8501), pH meter, tabung Vaculab EDTA, *autoklaf*, *sentrifuge*, spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu), inkubator (Memmert), oven, jarum ose, bunsen, *laminar air flow* (Biobase), *magnetic stirrer*, *vortex*, jangka sorong, dan plat tetes.

### 2.3. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari – Juli 2024 di Laboratorium Kimia Organik Departemen Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Pengambilan sampel dilakukan di Dusun Boneria, Desa Barat Lambongan, Kec. Bontomatene, Kab. Kepulauan Selayar. Pengujian antiinflamasi dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin dan pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Analisis FT-IR dilakukan di Laboratorium Terpadu Departemen Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin.

### 2.4. Prosedur Penelitian

#### 2.4.1 Preparasi Sampel

Sampel alga coklat *P. australis* sebanyak 30 kg dicuci menggunakan air mengalir untuk menghilangkan pasir, garam, dan kontaminan makro lainnya. Sampel dipreparasi dengan cara dikeringanginkan pada suhu ruang. Setelah itu, *P. australis* dihaluskan sampai berbentuk serbuk menggunakan blender. *P. australis* yang telah halus kemudian ditimbang berat sampel yang diperoleh.

## 2.4.2 Ekstraksi

Sampel alga coklat *P. australis* yang telah dipreparasi diekstraksi dengan metode maserasi bertingkat. Sampel direndam dengan pelarut *n*-heksana sampai terendam sempurna dan disimpan di dalam ruang tertutup selama 3 x 24 jam serta dilakukan pengadukan secara berkala. Pergantian pelarut yang sama dilakukan setiap 24 jam. Penggantian pelarut dengan etil asetat dan metanol berturut-turut dilakukan saat hasil KLT menunjukkan noda yang memudar dengan membandingkan spot noda KLT maserat hari pertama, kedua, ketiga dan seterusnya. Kemudian maserat disaring dengan corong buchner dengan bantuan pompa vakum sehingga diperoleh residu dan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kering yang diperoleh, dianalisis dengan KLT untuk digunakan pada tahap fraksinasi.

## 2.4.3 Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak Etil Asetat

### 2.4.3.1 Uji Flavonoid

Ekstrak etil asetat alga coklat *P. australis* sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat. Uji flavonoid positif jika terjadi perubahan warna menjadi kuning tua, hijau kebiruan (kalkon) atau jingga merah (floanon) (Kurnianto, et al., 2021).

### 2.4.3.2 Uji Alkaloid

Ekstrak etil asetat alga coklat *P. australis* dimasukkan ke tabung A, B dan C. Tabung A ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendroff. Perubahan yang terjadi selama 30 menit, hasil uji dinyatakan positif apabila terbentuk warna jingga. Tabung B dan C ditambahkan 0,5 mL HCl 2N pada tabung B dan dikocok hingga homogen. Kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen Mayer ke dalam tabung B dan 2-3 tetes reagen Wagner ke dalam tabung C. jika terbentuk endapan putih pada tabung B dan endapan coklat pada tabung C maka sampel tersebut mengandung alkaloid

### 2.4.3.3 Uji Saponin

Ekstrak etil asetat alga coklat *P. australis* sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambahkan 5 mL air panas dan dikocok kuat. Adanya buih yang stabil menunjukkan adanya saponin (Faizah, 2021).

### 2.4.3.4 Uji Tanin

Ekstrak etil asetat alga coklat *P. australis* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam plat tetes lalu ditambahkan 1 mL larutan FeCl<sub>3</sub> 10%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Rubianti et al., 2022).

### 2.4.3.5 Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak etil asetat alga coklat *P. australis* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam plat tetes lalu ditambahkan dengan 1 mL kloroform dan 1 mL asam asetat anhidrat. Lalu ditetesi dengan 1 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Uji positif steroid ditandai dengan

terbentuknya warna hijau kebiruan. Uji positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan (Rubianti et al., 2022).

#### **2.4.3.6 Uji Saponifikasi Asam Lemak**

Ekstrak etil asetat *P. australis* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan NaOH dan dipanaskan. Uji positif asam lemak ditandai dengan adanya busa yang terbentuk.

#### **2.4.4 Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Kolom**

Ekstrak etil asetat *P. australis* dianalisis dengan KLT melalui metode trial and error untuk mencari jenis eluen yang sesuai. Tahap selanjutnya dilakukan fraksinasi dengan metode KKV menggunakan beberapa perbandingan eluen yang sesuai sehingga diperoleh fraksi-fraksi. Fraksi tersebut selanjutnya dianalisis profil nodanya dengan KLT, fraksi dengan profil noda yang mirip lalu digabung. Selanjutnya dilakukan refraksinasi dengan metode KKG apabila diperlukan serta diamati pertumbuhan isolat berupa kristal.

#### **2.4.5 Pemurnian**

Isolat hasil fraksinasi dimurnikan dengan menggunakan metode rekristalisasi hingga diperoleh kristal murni. Kristal dikatakan murni apabila hanya menunjukkan satu noda pada uji KLT.

#### **2.4.6 Karakterisasi Senyawa**

##### **2.4.6.1 Penentuan Titik Leleh**

Titik leleh isolat yang telah murni dapat ditentukan dengan menggunakan alat melting point. Isolat dimasukkan ke dalam pipa kapiler yang salah satu ujungnya tertutup, kemudian pipa kapiler dijatuhkan secara vertikal dengan ujung terbuka menghadap ke atas menggunakan pipa kaca hingga isolat memadat pada ujung pipa kapiler bagian bawah yang tertutup. Pipa kapiler kemudian dimasukkan ke dalam alat melting point dan suhu dinaikkan perlahan-lahan yaitu 1 °C tiap menit. Rentang titik leleh dihitung pada saat kristal mulai meleleh sampai kristal meleleh sempurna. Senyawa dikatakan murni apabila memiliki titik leleh dengan rentang kurang dari 2 °C.

##### **2.4.6.2 Penentuan Struktur Kimia**

Isolat yang diperoleh ditentukan struktur kimianya secara spektroskopi menggunakan alat FT-IR. Spektrofotometer FT-IR merupakan alat yang digunakan untuk menentukan adanya gugus fungsi (OH, CO, amina, aromatik, dan lain-lain) dalam struktur kimia. Karakterisasi isolat dengan spektrofotometer ini diawali dengan cara mencampur isolat dengan KBr menggunakan alat *mixture vibrator*, kemudian dicetak menjadi pelet dan dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer FT-IR yang diukur pada bilangan gelombang 4000-500 cm<sup>-1</sup>.

## **2.4.7 Uji Aktivitas Antiinflamasi Secara *In Vitro* dengan Metode HRBC (Parvin et al., 2015)**

### **2.4.7.1 Pembuatan Buffer Fosfat pH 7,4 0,15 M**

Sebanyak 3,48 g dikalium hidrogen fosfat ( $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ ) dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL (0,2 M). Sebanyak 2,722 g kalium dihidrogen fosfat ( $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ) dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL (0,2 M). Kemudian 81 mL larutan  $K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  (0,2 M) dicampurkan dengan 19 mL larutan  $KH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  (0,2 M) pada suhu ruang. Cek pH dengan pH meter. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam.

### **2.4.7.2 Pembuatan Larutan Isosalin**

Sebanyak 0,85 g NaCl dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,4 0,2 M sampai volume 100 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam (Saputra, 2015).

### **2.4.7.3 Pembuatan Larutan Hiposalin**

Sebanyak 0,25 g NaCl dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M) sampai volume 100 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam (Saputra, 2015).

### **2.4.7.4 Pembuatan Larutan Garam Fisiologis**

Sebanyak 0,9 g NaCl dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M) sampai volume 100 mL pada suhu ruang. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 2 jam (Saputra, 2015).

### **2.4.7.5 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etil asetat dan Natrium diklofenak**

Sebanyak 25 mg ekstrak etil asetat dilarutkan dalam isosalin sampai 50 mL (500 ppm) pada suhu ruang. Kemudian diencerkan menjadi beberapa seri konsentrasi (25, 50, 100, 200, dan 400 ppm). Lalu, sebanyak 25 mg natrium diklofenak dilarutkan dalam 50 mL isosalin (500 ppm) pada suhu ruang. Kemudian diencerkan menjadi konsentrasi 100 ppm (Saputra, 2015 dan Parvin et al., 2015).

### **2.4.7.6 Preparasi Suspensi Sel Darah Merah**

Darah diambil dari tikus putih betina sehat melalui mata dan dikumpulkan di dalam tabung vaculab EDTA. Semua sampel darah disimpan pada suhu 4 °C selama 24 jam sebelum digunakan. Sampel darah disentrifugasi pada 2500 rpm selama 5 menit dan supernatan dihilangkan. Suspensi sel dicuci dengan larutan garam fisiologis (0,9% b/v NaCl) dan disentrifugasi pada kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Hal ini diulangi sebanyak tiga kali sampai supernatan menjadi jernih dan tidak berwarna dan volume sel diukur. Komponen seluler dilarutkan menjadi suspensi 40% (v/v) dengan larutan buffer fosfat pH 7,4 0,2 M dan dilakukan pengujian (Parvin et al., 2015).

### 2.4.7.7 Uji Aktivitas Ekstrak Terhadap Stabilitas Membran Eritrosit

Menurut Saputra (2015), prosedur penentuan aktivitas ekstrak etil asetat terhadap stabilisasi membran eritrosit, larutan yang digunakan sebagai berikut:

#### a. Pembuatan larutan uji

Larutan uji terdiri dari 1 mL buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL ekstrak etil asetat, dan 2 mL hiposalin.

#### b. Pembuatan larutan kontrol positif

Larutan kontrol positif terdiri dari 1 mL buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan aspirin, dan 2 mL hiposalin.

#### c. Pembuatan larutan kontrol negatif

Larutan kontrol negatif terdiri dari 1 mL buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL larutan isosalin sebagai pengganti ekstrak etil asetat, dan 2 mL hiposalin.

Setiap larutan di atas kemudian diinkubasi pada 37 °C selama 30 menit dan disentrifugasi pada 5000 rpm selama 10 menit. Cairan supernatan yang didapat diambil dan kandungan hemoglobinya diperhitungkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Persen stabilitas membran sel darah merah dapat dihitung dengan rumus, sebagai berikut:

$$\% \text{ Stabilitas} = 100 - \left( \frac{\text{Abs. Larutan uji}}{\text{Abs. Larutan kontrol negatif}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

$$\% \text{ Inhibisi Hemolisis} = \left( \frac{\text{Abs. Larutan uji}}{\text{Abs. Larutan kontrol negatif}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

### 2.4.8 Uji Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro dengan Metode Difusi Cakram

#### 2.4.8.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu. Semua alat yang tahan panas termasuk alat gelas, dibungkus plastik tahan panas dan dimasukkan ke dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat kaca nonpresisi ditutup mulutnya dengan kapas dan untuk cawan petri dibungkus dengan kertas, kemudian semuanya dibungkus dalam plastik tahan panas dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 180 °C selama 2 jam. Alat yang terbuat dari karet disterilkan dengan alkohol 70%. Jarum ose disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan nyala bunsen. *Laminar air flow* disterilkan dengan lampu UV selama 15 menit dan disemprotkan dengan alkohol 70% untuk sebelum dan sesudah bekerja (Rahmadani, 2015).

#### 2.4.8.2 Pembuatan Media *Nutrient Agar*

Media NA ditimbang sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1000 mL akuades. Kemudian diaduk di atas *hotplate* menggunakan *magnetic stirrer* sampai larut sempurna. Selanjutnya, media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media yang steril dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dengan posisi miring 45° dan disumbat hingga memadat (Rahmadani, 2015).

#### **2.4.8.3 Peremajaan Bakteri *Salmonella typhi***

Satu koloni murni bakteri *S. typhi* diambil menggunakan ose steril dari kultur murni, lalu diinokulasikan dalam media NA, lalu diinkubasikan dalam inkubator suhu 37 °C selama 24 jam (Kolanus dan Dompeipen, 2017).

#### **2.4.8.4 Peremajaan Bakteri *Escherichia coli***

Satu koloni biakan murni bakteri *E. coli* diambil menggunakan jarum ose steril dari kultur murninya, kemudian diinokulasikan dalam medium NA, kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37 °C selama 24 jam (Adang, 2021).

#### **2.4.8.5 Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland***

BaCl<sub>2</sub> 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% sehingga setara dengan 1x10<sup>8</sup> CFU/mL, lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Densitas standar *Mc Farland* diperiksa dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum pada rentang 0,08-0,13 (Arula, 2021).

#### **2.4.8.6 Pembuatan Suspensi Bakteri**

Pembuatan suspensi bakteri *E. coli* dan *S. typhi* dilakukan dengan cara biakan *E. coli* dan *S. typhi* masing-masing diambil dengan kawat ose steril, kemudian disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan seperti standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Arula, 2021).

#### **2.4.8.7 Pembuatan larutan Uji**

Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100, 500 dan 1000 yang diencerkan dari larutan induk 10000 ppm. Larutan induk dibuat dengan melarutkan ekstrak kering etil asetat sebanyak 30 mg ke dalam 3 mL pelarut yang sesuai. Kemudian diencerkan ke konsentrasi tujuan. Kontrol negatif menggunakan pelarut ekstrak yang sesuai. Kontrol positif yang digunakan sebagai pembanding yaitu ciprofloxacin (Faizah, 2021).

#### **2.4.8.8 Pengukuran Diameter Zona Hambat**

Pengujian ini menggunakan metode difusi cakram. Bakteri uji dipindahkan ke dalam media NA dengan cara digoreskan. Kertas cakram kosong diteteskan konsentrasi ekstrak. Kemudian cakram diletakkan di atas media dan diberi label. Hal yang sama dilakukan untuk kontrol positif. Pengujian kontrol negatif dilakukan dengan cara meneteskan kertas cakram kosong dengan pelarut ekstrak yang sesuai lalu diletakkan pada media yang berisi bakteri. Tiap media yang diisi sediaan uji, kontrol positif, dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam. Setelah diinkubasi, diukur hasil diameter zona hambat (mm) yang diperoleh (Wulandari, 2021).