

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Dua pertiga dari luas negara Indonesia terdiri dari laut dan dilewati garis khatulistiwa serta kaya akan sumber daya lautnya. Selain keanekaragaman fauna laut, keragaman flora laut seperti alga dapat dimanfaatkan untuk bahan makanan. Indonesia mempunyai peluang yang sangat besar dalam pemanfaatan hasil-hasil dari sektor kelautan, terutama dalam pemanfaatan alga yang berhubungan dengan bidang kesehatan (Nuzul et al., 2018). Alga merupakan kelompok tumbuhan berklorofil yang terdiri dari satu atau berbagai sel dan berbentuk koloni. Alga mengandung bahan-bahan organik seperti polisakarida, hormon, vitamin, mineral, dan juga memiliki senyawa bioaktif (Pakidi dan Suwoyo, 2017).

Alga diklasifikasikan dalam tiga kelas yaitu Rhodophyceae (alga merah), Phaeophyceae (alga cokelat) dan Chlorophyceae (alga hijau) (Kepel et al., 2017). 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, 2022). Kandungan metabolit sekunder dari *P. australis* dapat diperoleh dari ekstraksi dengan menggunakan pelarut organik. *P. australis* dapat diekstraksi secara bertingkat menggunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Pelarut yang digunakan masing-masing mempunyai kemampuan yang berbeda-beda dalam mengekstrak senyawa bioaktif. Pelarut *n*-heksana dapat melarutkan senyawa non polar, etil asetat dapat melarutkan senyawa semi polar, dan metanol dapat melarutkan senyawa non polar. Pelarut *n*-heksana dapat mengekstrak senyawa seperti flavonoid, alkaloid, triterpenoid, dan steroid. Menurut Wijayanti et al. (2021), ekstrak *n*-heksana *P. australis* mengandung senyawa metabolit sekunder seperti steroid, terpenoid, polifenol, saponin, alkaloid, flavonoid, fenol hidrokuinon dan tanin yang dapat menjadi agen antibakteri, sedangkan flavonoid, steroid, dan tanin yang mampu menjadi agen antiinflamasi (Santi, 2015).

Beberapa penelitian menyatakan bahwa *P. australis* memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi. Berdasarkan penelitian Chellappan et al. (2020), 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). Penelitian telah membuktikan bahwa ekstrak *n*-heksana pada *Padina australis* berpotensi sebagai agen antiinflamasi (Tajrin et al., 2020).

Inflamasi atau peradangan adalah reaksi normal tubuh untuk melindungi jaringan dari luka yang disebabkan oleh cedera fisik, zat kimia yang merusak, atau mikroorganisme (Hidayati et al., 2008). Respons inflamasi dapat dipicu oleh infeksi, kerusakan jaringan atau gangguan respons imun dan proses ini biasanya diikuti oleh pelepasan mediator inflamasi (Chellappan et al., 2020). Salah satu tujuan penggunaan antiinflamasi yaitu untuk memperbaiki jaringan yang rusak dan melindunginya dari infeksi.

Metode pengujian aktivitas antiinflamasi dapat dilakukan secara *in vivo* dan *in vitro*. Pengujian antiinflamasi yang umum dilakukan yaitu secara *in vivo* menggunakan hewan uji, tetapi harus dilakukan uji *in vitro* terlebih dahulu sebagai skrining awal untuk mengetahui potensi pengaruh biologis sebelum diujikan ke makhluk hidup. Pada penelitian ini dipilih pengujian aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dengan menggunakan metode stabilitas membran sel darah merah atau *Human Red Blood Cell* (HRBC). Metode ini digunakan karena sel darah merah identik dengan membran lisosom yang dapat mempengaruhi proses inflamasi (Sari et al., 2024). Dalam kondisi fisiologi, stabilisasi pada membran lisosom penting untuk membatasi respon inflamasi dengan cara mencegah pelepasan enzim dari dalam lisosom (Burhanuddin dan Karta, 2023). Selama inflamasi, enzim lisosom yang dilepaskan akan menghasilkan berbagai gangguan. Obat-obat golongan NSAID bekerja dengan menghambat enzim lisosom. Prinsip metode ini yaitu stabilisasi membran sel darah merah manusia yang diinduksi larutan hipotonis yang menyebabkan membran menjadi lisis (Erlinda, 2019). Jika stabilitas sel darah merah dipertahankan maka stabilitas membran lisosom juga akan terjaga, sehingga aktivitas antiinflamasinya dapat diukur (Sari et al., 2024). Penghambatan bakteri dapat berperan penting dalam mengurangi inflamasi, karena infeksi bakteri sering kali memicu respon inflamasi yang berlebihan.

Data *World Health Organization* (WHO) (2023), menunjukkan penderita inflamasi di dunia mencapai 18 juta jiwa dan kasus di Asia Tenggara mencapai 4,4 juta jiwa penderita inflamasi. Obat-obat yang sering digunakan sebagai antinflamasi yaitu golongan nonsteroid (NSAID) dan steroid. Pengobatan inflamasi mempunyai dua tujuan utama yaitu meringankan rasa nyeri yang merupakan gejala awal yang terlihat dan memperlambat atau membatasi proses kerusakan jaringan. Namun, kedua golongan obat tersebut seringkali menimbulkan efek yang berbahaya seperti kerusakan gastrointestinal, nefrotoksik, dan hepatotoksik (Mamarimbing et al., 2022). Oleh karena itu, perlu dilakukan pengembangan alternatif obat dengan menggunakan bahan alam. Selain sebagai antiinflamasi *P. australis* juga dapat berperan sebagai agen antibakteri.

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. (Sampulawa et al., 2024) mengatakan bahwa ekstrak *n*-heksana *P. australis* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* yang menunjukkan zona hambat terbentuk pada konsentrasi 80% 13 mm, dan pada konsentrasi 60% zona hambat yang terbentuk sebesar 11 mm. Kemampuan ekstrak *n*-heksana dalam menghambat bakteri hal ini dikarenakan dinding sel bakteri *Escherichia coli* terdiri dari lapisan peptidoglikan yang tipis dan membran luar yang mengandung lipid. Penelitian lainnya menurut Assegaf dan Insafitri (2023), menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksana *P. australis* efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio* Sp. dibandingkan rumput laut coklat lainnya. Selain itu, ekstrak *n*-heksana *P. australis* memiliki aktivitas penghambatan kategori kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* (Kolanus dan dompeipen, 2017).

Pengujian antibakteri menggunakan bakteri gram negatif yaitu *E. coli* dan *S. thypi* karena komposisi sel bakteri Gram negatif lebih tebal dan kompleks dibandingkan bakteri Gram positif (Breijyeh et al., 2020). Menurut data WHO (2024), penyakit diare merupakan penyebab kematian kedua yang terjadi pada anak dengan kasus mencapai 1,7 juta per tahun dengan angka kematian mencapai 443.832 jiwa pada anak balita dan 50.851 jiwa pada anak umur 5-9 umur. Bakteri lainnya yaitu *Salmonella typhi* yang merupakan bakteri Gram negatif dapat menyebabkan penyakit demam tifoid atau tipes (Imara, 2020). Menurut WHO demam tifoid di Indonesia kejadiannya bervariasi antara 358–810 kasus per 100.000 penduduk dengan angka mortalitas antara 3,1–10,4 % pada tahun 2007. Obat yang biasa digunakan adalah antibiotik (Mulyani et al., 2021).

Antibiotik adalah senyawa kimia yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme atau dihasilkan secara sintetik yang dapat digunakan untuk menghambat perkembangan mikroorganisme lain (Sahputri dan Khairunnisa, 2020). Saat ini penggunaan antibiotik dalam mengobati infeksi masih menjadi pilihan utama, tetapi dengan meluasnya penggunaan antibiotik, secara tidak langsung menyebabkan terjadinya resistensi terhadap bakteri (Ismail, 2010). Resistensi bakteri terhadap antibiotik yaitu kondisi ketika bakteri menjadi kebal terhadap antibiotik yang biasanya efektif dalam mengobati infeksi. Hal ini terjadi akibat perubahan genetik atau mutasi pada bakteri yang sering kali dipicu oleh penggunaan antibiotik yang berlebihan atau tidak tepat. Sifat resistensi dan infeksi bakteri terhadap manusia semakin meningkat, sehingga perlu adanya pengembangan alternatif obat baru. Penelitian terkini dalam pencarian obat baru berfokus dari sumber biota laut, karena beberapa organisme laut menghasilkan senyawa yang tidak terdapat atau jarang ditemukan pada organisme yang hidup di darat. Invertebrata laut memproduksi senyawa bioaktif terbanyak seperti spons, cnidarians, bryozoa, tunicates dan alga (Dali et al., 2011). Oleh karena itu, perlu pencarian pengobatan alternatif dengan memanfaatkan bahan alam.

Berdasarkan uraian tersebut, ekstraksi alga coklat *P. australis* dan identifikasi metabolit sekunder ekstrak *n*-heksana 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 bahan baku obat dari bahan alam.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

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

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.4.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana 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 *n*-heksana alga coklat *Padina australis* melalui uji fitokimia
2. menganalisis aktivitas antiinflamasi ekstrak *n*-heksana alga coklat *Padina australis*
3. menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak *n*-heksana alga coklat *Padina australis* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang hubungan aktivitas antiinflamasi dan antibakteri dengan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak *n*-heksana *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, serum 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 (HgCl_2 , Merck), kalium iodida (KI, Smart Lab), besi (III) klorida (FeCl_3 , Pudak), kloroform (Merck), asam asetat glasial (CH_3COOH , Merck), asam sulfat (H_2SO_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 (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), analisis GC-MS, 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 Agustus 2024 – Januari 2025 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.

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 dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kering yang diperoleh, dianalisis dengan KLT untuk digunakan pada tahap fraksinasi.

2.4.3 Uji Kandungan Metabolit Sekunder Ekstrak *n*-Heksana

a. Uji Flavonoid

Ekstrak *n*-heksana alga coklat *P. australis* sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 3 tetes H_2SO_4 pekat. Uji flavonoid positif jika terjadi perubahan warna menjadi kuning tua, hijau kebiruan (kalkon) atau jingga merah (flovanon) (Kurnianto, et al., 2021).

b. Uji Alkaloid

Ekstrak *n*-heksana 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

c. Uji Saponin

Ekstrak *n*-heksana 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).

d. Uji Tanin

Ekstrak *n*-heksana alga coklat *P. australis* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam plat tetes lalu ditambahkan 1 mL larutan FeCl_3 10%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuk warna biru tua, biru kehitaman, atau hitam kehijauan (Rubianti et al., 2022).

e. Uji Steroid dan Triterpenoid

Ekstrak *n*-heksana 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).

2.4.4 Fraksinasi dengan Metode Kromatografi Kolom

Ekstrak *n*-heksana *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

a. 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.

b. 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⁻¹.

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

a. Pembuatan Buffer Fosfat 0,15 M pH 7,4

Dikalium hidrogen fosfat (K₂HPO₄·2H₂O) sebanyak 3,48 g dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL (0,2 M). Sebanyak 2,722 g kalium dihidrogen fosfat (KH₂PO₄·2H₂O) dilarutkan dalam akuades sampai 100 mL (0,2 M). Kemudian 81 mL larutan K₂HPO₄·2H₂O (0,2 M) dicampurkan dengan 19 mL larutan KH₂PO₄·2H₂O (0,2 M) pada suhu ruang. Cek pH dengan pH meter. Kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 2 jam.

b. Pembuatan Larutan Isosalin

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

c. Pembuatan Larutan Hiposalin

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

d. Pembuatan Larutan Garam Fisiologis

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

e. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak *n*-Heksana dan Natrium diklofenak

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

f. Preparasi Suspensi Sel Darah Merah

Sesuai Peraturan BPOM No. 18 tahun 2021, pengambilan darah hewan uji menggunakan alat suntik steril. Pada umumnya pengambilan darah hanya dilakukan sekitar 1% dari berat tubuh dengan interval 24 jam. Pengambilan darah dapat dilakukan melalui mata tikus. Hewan sebelumnya dianestesi, lokasi pengambilan darah pada sinus retro-orbitalis mata dengan menggunakan pipa kapiler atau tabung hematokrit. Aplikasi dapat dilakukan dengan menusukkan pipa dengan sudut kemiringan 45° selanjutnya darah ditampung ke dalam tabung vaculab EDTA. Sampel dapat diperoleh dari kedua mata secara bergantian.

Darah yang telah dikumpulkan lalu 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 0,2 M pH 7,4 dan dilakukan pengujian (Parvin et al., 2015).

g. Uji Aktivitas Ekstrak Terhadap Stabilitas Membran Eritrosit

Menurut Saputra (2015), prosedur penentuan aktivitas ekstrak *n*-heksana terhadap stabilisasi membran eritrosit, larutan yang digunakan sebagai berikut:

1 Pembuatan larutan uji

Larutan uji terdiri dari 1 mL buffer fosfat 0,2 M pH 7,4, 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL ekstrak *n*-heksana, dan 2 mL hiposalin.

2 Pembuatan larutan kontrol positif

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

3 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 n-heksana, 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 hemoglobinnnya diperhitungkan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum. Persen stabilitas membran sel darah merah dapat dihitung dengan rumus pada persamaan 1 dan persamaan 2, 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

a. 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).

b. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

Media NA ditimbang sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1000 mL akuades. 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).

c. Peremajaan Bakteri *S. 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).

d. Peremajaan Bakteri *E. 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).

e. Pembuatan Larutan Standar *Mc Farland*

BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1% sehingga setara dengan 1×10^8 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).

f. 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).

g. Pembuatan larutan Uji

Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100, 500 dan 1000 yang diencerkan dari larutan induk 10000 mg/L. Larutan induk dibuat dengan melarutkan ekstrak kering *n*-heksana 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).

h. 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)