

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang telah lama menjadi masalah kesehatan utama, meskipun penyakit lain seperti penyakit degeneratif dan metabolik cenderung meningkat. Penyakit infeksi merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat di Indonesia, diantaranya infeksi usus (demam tifoid) (Hernawati et al., 2020). *World Health Organization* (WHO) (2023), mengklaim bahwa pada perkiraan tahun 2019 terdapat 9 juta kasus demam tifoid yang mengakibatkan sekitar 110.000 kematian per tahun. Demam tifoid merupakan penyakit infeksi akut pada usus halus yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* (Rahmasari dan Lestari, 2018).

Demam tifoid dapat ditularkan melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh bakteri *S. typhi*. Bakteri yang tertelan akan masuk melalui membran mukosa epitel usus dan berkembang biak, kemudian memasuki peredaran darah, lalu memasuki organ terutama hati dan sumsum tulang. Bakteri dari hati kembali ke usus menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi sehingga terjadinya reaksi inflamasi (peradangan) (Rahmasari dan Lestari, 2018). Peradangan pada usus akibat infeksi bakteri *S. typhi* dapat mengganggu kinerja usus dalam mencerna makanan sehingga muncul respon tubuh berupa diare. Selain itu, diare dapat juga disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. *S. typhi* dan *E. coli* merupakan bakteri dari kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang yang habitat alaminya berada pada usus manusia (Alina et al., 2018). Pengobatan penyakit infeksi usus umumnya dilakukan dengan pemberian antibiotik (Djarmiko et al, 2008).

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. 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).

Alga dapat diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok berdasarkan pigmentasi warnanya, yaitu alga merah (rhodophyta), alga hijau (chlorophyta), dan alga coklat (phaeophyta) (Kepel et al., 2018). Alga coklat mengandung metabolit sekunder yang beragam dibandingkan alga lainnya. Oleh karena itu, alga coklat banyak

dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri termasuk industri farmasi karena memiliki aktivitas biologis yang luas seperti sebagai antimikroba, antivirus, antibakteri, antiinflamasi, antijamur, antikanker, dan antioksidan (Taherpour et al., 2016).

Salah satu spesies alga coklat yaitu *Padina australis* dilaporkan mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid, saponin, tanin, terpenoid, dan flavonoid yang dapat menjadi agen antibakteri dan antiinflamasi (Mourena et al., 2021) (Gany et al., 2015). Selain itu, asam lemak seperti asam miristat, asam palmitat, asam oleat, dan asam linoleat adalah jenis metabolit sekunder lainnya yang dapat berfungsi sebagai analgesik, antiinflamasi, antidiabetes, antibakteri, dan antijamur (Hartanto dan Silitonga, 2018). Kandungan fitokimia dari alga coklat dapat diperoleh dengan ekstraksi pelarut. *P. australis* dapat diekstraksi secara bertingkat dengan pelarut *n*-heksana, etil asetat, dan metanol. Hal ini dilakukan agar senyawa yang terkandung dapat terekstrak sempurna, karena masing-masing pelarut mempunyai kemampuan berbeda dalam mengekstrak senyawa bioaktif (Hidayati et al., 2008).

Metanol merupakan pelarut yang bersifat universal yang dapat mengikat senyawa-senyawa organik yang bersifat polar maupun nonpolar. Adanya gugus hidroksil (-OH) pada strukturnya membuat metanol mampu menarik senyawa yang bersifat polar, sedangkan adanya gugus metil (-CH₃) membuat metanol mampu menarik senyawa nonpolar (Supriadin et al., 2017). Alam (2015), menyimpulkan bahwa metanol mampu menarik lebih banyak metabolit sekunder yaitu senyawa fenolik, flavonoid, dan tanin dibandingkan etanol. Hal tersebut didukung oleh Mourena et al. (2021), yang menemukan bahwa ekstrak total metanol spesies alga coklat *P. australis* positif mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin. Selain itu, Shiney dan Wilsy (2014) menemukan bahwa ekstrak total metanol *P. australis* mengandung senyawa metabolit sekunder lainnya yaitu asam lemak yang telah teridentifikasi, seperti asam 14-metil ester pentadekanoat; asam 1,2-benzenedi karboksilat; asam 10-metil ester oktadekanoat; asam oleat; dan asam 1,2-hidroksi metil ester oktadekanoat. Senyawa-senyawa asam lemak ini tidak hanya berkontribusi pada nilai gizi *P. australis*, tetapi juga memiliki potensi sebagai agen terapeutik dalam pengobatan berbagai kondisi, termasuk peradangan dan infeksi.

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. Obat-obat yang digunakan sebagai antiinflamasi yaitu golongan nonsteroid (*Non Steroid Anti-inflammation Drug/NSAID*) dan steroid. Pengobatan inflamasi mempunyai dua tujuan utama yaitu meringankan rasa nyeri yang merupakan gejala awal 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 menggunakan bahan alam yang tidak memiliki efek samping.

Penelitian yang menyatakan bahwa *P. australis* memiliki bioaktivitas sebagai antiinflamasi salah satunya oleh Gany et al. (2015), yang menemukan bahwa ekstrak total metanol *P. australis* secara *in vitro* dapat mengurangi produksi nitrogen monoksida (NO) dan PGE2 (mediator inflamasi) yang diinduksi oleh lipopolisakarida pada sel mikroglia BV-2. Penelitian lainnya yaitu oleh El Shafay et al. (2022), yang menemukan bahwa efek antiinflamasi ekstrak total metanol spesies alga coklat *Padina pavonica* pada konsentrasi 10-50 µg/mL secara *in vitro* efektif mencegah hemolisis membran eritrosit yang diinduksi pada kondisi hipotonisitas. Ekstrak total metanol *P. pavonica* dapat menstabilkan membran sel darah merah dengan menghambat pelepasan enzim siklooksigenase dan mediator inflamasi. Selain itu, Asmawati et al. (2016) melakukan pengujian antiinflamasi secara *in vivo* dari ekstrak total metanol spesies *Padina* dan spesies *Sargassum* melalui peningkatan volume kaki mencit setelah penyuntikan ekstrak. Penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak total metanol spesies *Padina* menunjukkan efek antiinflamasi yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak metanol spesies *Sargassum*.

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.

P. australis menunjukkan potensi sebagai agen antibakteri, terutama terhadap bakteri seperti *E. coli* dan *S. typhi* yang berperan dalam proses inflamasi. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak alga ini efektif dalam menghambat pertumbuhan berbagai bakteri (Haryani et al., 2015). Kolanus dan Dompeipen (2017), menemukan bahwa ekstrak total metanol spesies *Padina* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* (26,5 mm) dan *S. thypimiriium* (19 mm). Selain itu, Alam (2015) menemukan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak total metanol spesies *Padina* terhadap *Porphyromonas gingivalis* (bakteri gram negatif) menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus* (bakteri gram positif). Penelitian tersebut membuktikan bahwa ekstrak total metanol spesies *Padina* lebih efektif menyerang bakteri gram negatif.

Aktivitas antibakteri yang berbeda dipengaruhi oleh kondisi pengujian dan metode yang digunakan. Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi. Metode difusi dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Metode difusi dilakukan dengan membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Dewi, 2010). Bakteri dapat memberikan respons yang berbeda disebabkan oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang berbeda pada jenis ekstrak alga dalam melawan aktivitas antibakteri. Selain itu, ketebalan dan komposisi dinding selnya bakteri akan menentukan respons yang berbeda pula pada bakteri (Warsidah et al., 2022).

Pengujian antibakteri menggunakan bakteri gram negatif yaitu *S. typhi* dan *E. coli* karena komposisi sel bakteri gram negatif lebih tebal dan kompleks dibandingkan bakteri gram positif yang memberikan penghalang terhadap antibiotik yang mengakibatkan bakteri tersebut lebih resisten (Breijyeh et al., 2020). Selain itu, penggunaan bakteri gram negatif tersebut untuk mengetahui kekuatan senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi bertingkat dalam menghambat pertumbuhannya. Dengan demikian, pengujian antibakteri pada bakteri gram negatif sangat penting untuk pengembangan strategi pengobatan yang efektif dan untuk mengatasi masalah resistensi antibiotik yang semakin meningkat.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi bertingkat dan menganalisis aktivitas antiinflamasi dan antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. typhi* penyebab infeksi usus. Ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi bertingkat ini diharapkan memiliki bioaktivitas antiinflamasi dan antibakteri yang kuat sehingga penelitian ini dapat menjadi landasan awal untuk penelitian lebih lanjut terkait pemanfaatan *P. australis* sebagai alternatif sumber bahan baku obat dari bahan alam.

1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini, yaitu:

1. apa saja golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat melalui uji fitokimia?
2. bagaimana aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat?
3. bagaimana aktivitas antibakteri ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat terhadap bakteri *S. typhi* dan *E. coli*?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah untuk mengetahui golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi

bertingkat, mengetahui aktivitas antiinflamasi secara *in vitro* dengan metode HRBC ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi bertingkat, dan mengetahui aktivitas antibakteri secara *in vitro* dengan metode difusi cakram ekstrak metanol *Padina australis* yang diekstraksi bertingkat.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini, yaitu:

1. mengidentifikasi golongan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat
2. menganalisis aktivitas antiinflamasi ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat
3. menganalisis aktivitas antibakteri ekstrak metanol alga coklat *P. australis* yang diekstraksi bertingkat terhadap bakteri *S. typhi* dan *E. coli*

1.4 Manfaat penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terkait hubungan aktivitas antiinflamasi dan antibakteri dengan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak metanol *P. australis* yang diekstraksi bertingkat. Selain itu, diharapkan penelitian ini dapat menjadi landasan awal untuk penelitian lebih lanjut terkait pemanfaatan *P. australis* sebagai alternatif sumber bahan baku obat dari bahan alam.

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 , Puduk), 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*, toples, 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 2024 – Januari 2025 di Laboratorium Kimia Organik Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Pengambilan sampel *P. australis* dilakukan di Dusun Boneria, Desa Barat Lambongan, Kecamatan Bontomatene, Kabupaten Kepulauan Selayar. Pengujian antiinflamasi dilakukan di Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin. Analisis FT-IR dilakukan di Laboratorium Terpadu 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 menggunakan *blender* hingga menjadi serbuk dan selanjutnya ditimbang.

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. Maserat disaring dengan corong buchner dengan bantuan pompa vakum sehingga diperoleh residu dan filtrat. Filtrat yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kering metanol yang diperoleh, dianalisis dengan KLT untuk digunakan pada tahap fraksinasi.

2.4.3 Identifikasi Metabolit Sekunder Ekstrak

2.4.3.1 Uji Flavonoid

Ekstrak metanol alga coklat *P. australis* sebanyak 5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan dengan etanol. Selanjutnya ditambahkan dengan serbuk magnesium 0,1 g. Kemudian ditambahkan HCl pekat sebanyak 3 tetes. Uji positif flavonoid jika terjadi perubahan warna menjadi merah (Kurnianto, et al., 2021).

2.4.3.2 Uji Alkaloid

Ekstrak metanol 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 metanol 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 metanol alga coklat *P. australis* sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam plat tetes lalu ditambahkan 1 mL larutan FeCl₃ 10%. Uji positif tanin ditandai dengan terbentuknya warna biru tua kehitaman atau hitam kehijauan (Rubianti et al., 2022).

2.4.3.5 Uji Steroid dan Triterpenoid

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

steroid ditandai dengan terbentuknya warna hijau kebiruan dan positif triterpenoid ditandai dengan terbentuknya cincin kecoklatan (Rubianti et al., 2021).

2.4.3.6 Uji Saponifikasi Asam Lemak

Ekstrak metanol *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 metanol *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 tunggal pada analisis KLT.

2.4.6 Karakterisasi Isolat

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 Gugus Fungsi

Isolat yang diperoleh ditentukan struktur kimianya secara spektroskopi menggunakan alat FT-IR dan GC-MS. 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)

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

Dikalium hidrogen fosfat ($K_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) sebanyak 3,48 g 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

NaCl sebanyak 0,85 g dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,4 (0,15 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

NaCl sebanyak 0,25 g dilarutkan dalam buffer fosfat pH 7,4 (0,15 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

NaCl sebanyak 0,9 g 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 Metanol dan Natrium diklofenak

Ekstrak metanol sebanyak 25 mg 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).

3.4.7.6 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 pH 7,4 0,2 M dan dilakukan pengujian (Parvin et al., 2015).

3.4.7.7 Uji Aktivitas Ekstrak Terhadap Stabilitas Membran Eritrosit

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

1. Pembuatan Larutan Uji

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

2. Pembuatan Larutan Kontrol Positif

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

3. Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Larutan kontrol negatif terdiri atas 1 mL buffer fosfat pH 7,4 (0,2 M), 0,5 mL suspensi sel darah merah, 1 mL isosalin pengganti ekstrak metanol, 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, 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

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 *Nutrient Agar* (NA) sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu ditambahkan 1000 mL akuades. Diaduk di atas *hotplate* menggunakan *magnetic stirrer* hingga larut sempurna. Media disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C

selama 15 menit. Media steril dituang ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 mL dengan posisi miring 45° dan disumbat dengan kapas steril hingga padat (Rahmadani, 2015).

2.4.8.3 Peremajaan Bakteri *Salmonella typhi*

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

2.4.8.4 Peremajaan Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *E. coli* sebanyak satu koloni biakan murni diambil menggunakan ose steril dari kultur murninya, lalu 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*

BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H₂SO₄ 1% sehingga setara dengan 1x10⁸ CFU/mL, lalu dihomogenkan dengan vortex. Densitas standar *Mc Farland* diperiksa dengan mengukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer panjang gelombang maksimum dengan 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 sama dengan standar kekeruhan larutan *Mc. Farland* (Arula, 2021).

2.4.8.7 Pembuatan Larutan Uji

Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 100, 500 dan 1000 ppm yang diencerkan dari larutan induk 10000 ppm. Larutan induk dibuat dengan melarutkan ekstrak kering metanol sebanyak 30 mg ke dalam 3 mL pelarut yang sesuai. Kemudian diencerkan ke konsentrasi tujuan. Kontrol negatif menggunakan pelarut metanol. 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 ditetaskan konsentrasi ekstrak. 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 metanol lalu diletakkan pada media yang berisi bakteri. Tiap media yang telah diisi sediaan uji, kontrol positif, dan kontrol negatif diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 x 24 jam. Setelah diinkubasi, diukur diameter zona hambat (mm) yang diperoleh. Pengujian ini direplikasi 3 kali (Wulandari, 2021).