

## SURAT TUGAS

Nomor : 00523/B.7.9/ST.FTP/02/2021

Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang dengan ini memberikan tugas kepada :

- Nama : **Dea Nathania Hendryanti, S.TP., M.S. (Penulis Utama & Korespondensi)**  
**Dr. Ir. Lindayani, MP. (Anggota)**
- Status : Dosen Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.
- Tugas : Sebagai Peneliti Dan Penulis Di Jurnal Nasional Vitasphere Dengan Judul Artikel "**Pengaruh Kondisi Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antibakteri Caulerpa Lentilifera Terhadap Human Pathogenic Bacteria Secara In-Vitro**".
- Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata, Semarang.
- Waktu : 01 November - 18 Desember 2020
- Lain-lain : Harap melaksanakan tugas dengan sebaik-baiknya dan penuh tanggung jawab, serta memberikan laporan setelah selesai melaksanakan tugas.

Semarang, 19 Februari 2021

Dekan,

  
**Dr. R. Probo Y. Nugraedi, M. Sc.**  
NPP : 0581 2001 244

UNIVERSITAS KATOLIK  
SOEGIJAPRANATA  
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN  
JURUSAN TEKNOLOGI PANGAN

## Pengaruh Kondisi Ekstraksi Terhadap Aktivitas Antibakteri *Caulerpa lentilifera* terhadap *Human Pathogenic Bacteria* secara *In-vitro*

Dea N. Hendryanti<sup>1</sup>, Lindayani<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Staf Pengajar Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Soegijapranata

### Korespondensi Penulis:

Nama : Dea N. Hendryanti  
Alamat : Fakultas Kedokteran Universitas Katolik Soegijapranata  
Jl. Pawiyatan Luhur Selatan IV No.1, Semarang, Jawa Tengah  
Nomor Telepon : (024) 8441555, 8505003  
Email : deanathania17@gmail.com

### Abstrak

**Latar belakang:** *Caulerpa lentilifera* atau dikenal juga sebagai anggur laut merupakan jenis rumput laut yang tersebar luas di Indonesia (nama lokal: Lato) namun, studi aktivitas antibakteri bahan pangan tersebut masih kurang diteliti.

**Tujuan penelitian:** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh waktu ekstraksi (1, 2, 3 hari) dan rasio sampel terhadap pelarut (1: 5, 1:10, 1:15) terhadap aktivitas antibakteri ekstrak *C. lentilifera* kering. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui total kandungan fenolik dan korelasinya terhadap aktivitas antibakteri

**Metode:** Penelitian ini menggunakan metode *agar-disk diffusion* untuk mengetahui aktivitas antibakteri secara *in-vitro* yang kemudian dilanjutkan dengan uji *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC). Metode Folin-Ciocalteu digunakan untuk mengetahui total kandungan fenolik.

**Hasil:** Uji antibakteri menunjukkan aktivitas tertinggi, baik melawan bakteri Gram negatif maupun Gram positif (*Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium* dan *Staphylococcus aureus*) ketika sampel dimaserasi selama 72 jam dengan rasio sampel terhadap pelarut 1:15. Nilai MIC berkisar 1,5 - 6 mg/mL dengan rasio MBC : MIC kurang dari 4 yang merepresentasikan kemampuan *C. lentilifera* sebagai inhibitor kuat dan agen bakterisidal. Hasil pengamatan juga menunjukkan adanya korelasi yang sangat kuat (koefisien korelasi = 0,594) dan signifikan (Sig. = 0,001) antara kandungan total fenolik dengan aktivitas antibakteri.

**Kesimpulan:** Penelitian ini memberikan bukti bahwa *Caulerpa lentilifera* memiliki potensi yang menjanjikan sebagai agen antibakteri alami melawan bakteri patogen penyebab penyakit pada manusia dimana, salah satu komponen bioaktifnya adalah senyawa fenolik

**Kata kunci :** aktivitas antibakteri, *Caulerpa lentilifera*, total komponen fenolik

## Pendahuluan

Rumput laut atau makroalga yang dapat dimakan merupakan sumber hayati terbaru yang diklaim memiliki berbagai macam senyawa bioaktif seperti aktivitas sitostatik, antivirus, antijamur dan antibakteri<sup>1</sup>. Ekstrak sel tumbuhan dan komponen aktif dari berbagai makroalga telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri secara *in-vitro* terhadap bakteri Gram-negatif dan Gram-positif<sup>2</sup>. Salah satu rumput laut yang populer di kalangan peneliti saat ini adalah *Caulerpa lentilifera* atau dikenal juga sebagai *round seagrape* atau kaviar hijau, yaitu rumput laut bernilai tinggi dan tersebar luas di Jepang (umi-budo), Korea, Filipina (lato) serta Indonesia (Lato)<sup>3</sup>. Sebagian besar informasi yang tersedia dari rumput laut ini berkaitan dengan aktivitas antioksidan, hasil analisa proksimat dan pertumbuhannya namun masih kurang diselidiki terkait aktivitas antibakterinya.

Penelitian yang dilakukan di tahun 2014 melaporkan bahwa *Caulerpa lentilifera* memiliki total senyawa fenol yang lebih tinggi (ekstrak GAE g-1 42,85 mg) dibandingkan dengan semua spesies chlorophyta dan sebagian besar spesies *phaeophyta* dan *rhodophyta* kecuali *Spatoglossum polycystum* (45,16 mg GAE/g ekstrak) dan *Amansia multifida* (45,40 mg GAE/g ekstrak)<sup>4</sup>. Mengingat bahwa senyawa fenolik berperan penting sebagai agen antibakteri pada rumput laut<sup>5</sup> maka *Caulerpa lentilifera* berpotensi memiliki fungsi antibakteri untuk mendukung kesehatan manusia. Prospek masa depan rumput laut ini dapat digunakan sebagai pangan fungsional yang dapat membantu meningkatkan kesehatan dan mengurangi risiko penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri.

Langkah penting dalam isolasi senyawa bioaktif adalah ekstraksi. Ekstraksi senyawa aktif tergantung pada waktu ekstraksi, rasio sampel terhadap pelarut dan jenis pelarut<sup>6</sup>. Jumlah senyawa bioaktif dari tanaman yang diekstrak akan meningkat dengan bertambahnya lama waktu ekstraksi namun, waktu ekstraksi yang terlalu lama dapat meningkatkan resiko degradasi akibat terjadinya oksidasi<sup>7</sup>. Selain itu, konsentrasi gradien senyawa target antara permukaan partikel dan bagian dalamnya yang dipengaruhi oleh rasio sampel terhadap pelarut serta karakteristik pelarut (kelarutan, kompatibilitas dengan zat terlarut, stabilitas dan viskositas) merupakan faktor penting untuk mendapatkan kualitas senyawa target yang optimal<sup>8</sup>. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh waktu ekstraksi (1, 2, 3 hari) dan rasio sampel terhadap pelarut (1: 5, 1:10, 1:15) terhadap aktivitas antibakteri ekstrak *C. lentilifera* kering dengan metode difusi cakram, uji *minimum inhibitory concentration* (MIC) dan uji *minimum bactericidal concentration* (MBC). Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui total kandungan fenolik dan korelasinya terhadap aktivitas antibakteri.

## Metode

### A. Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Caulerpa lentilifera* (Gambar 1), kultur bakteri Gram-Positif: *Staphylococcus aureus* (FNCC 167); *Bacillus cereus* (FNCC 0057), kultur bakteri Gram-negatif: *Escherichia coli* (FNCC 194); *Salmonella*

*typhimurium* (FNCC 0050), Nutrient Broth (NB), Nutrient Agar (NA), Muller Hinton Agar (MHA), etil asetat, etanol 96% dan dimethylsulphoxide (DMSO). Alat dan instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Vacuum Rotary Evaporator* (BUCHI, model R-200), mikropipet, spektrofotometer (UV-VIS 1240), shaker (STUART-FRANCE, model SSL 1), cabinet dryer (Memmert), *laminar air flow hood*, autoklaf, kertas saring Whatman no 1, cawan petri, kertas cakram steril (Whatman).

**Gambar 1. Rumput Laut *Caulerpa lentilifera***



## **B. Penelitian Pendahuluan**

Penelitian pendahuluan dilakukan sebelum penelitian utama guna membandingkan efektivitas proses ekstraksi yang ditunjukkan melalui diameter zona hambat (mm). Pelarut (etil asetat, etanol), konsentrasi ekstrak (0,1, 0,5, 10 dan 100 mg/mL), kondisi sampel (kering, segar) dan metode analisis aktivitas antibakteri (metode *agar-disk diffusion* dan *agar-well diffusion*) yang terbaik akan diterapkan pada penelitian utama.

### **1. Preparasi Sampel**

Dalam pembuatan ekstrak kering, *Caulerpa lentilifera* dikeringkan pada suhu 40°C selama 24 jam dengan menggunakan *cabinet dryer* hingga beratnya konstan. Rumput laut kering dan segar kemudian dihaluskan dan masing-masing sebanyak 25 gram dilarutkan dengan dua jenis pelarut yang berbeda (etanol 96%, etil asetat) dengan perbandingan sampel terhadap pelarut sebesar 1:5 mg/mL. Setelah 24 jam ekstraksi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 120 rpm, campuran disaring menggunakan kertas saring Whatman no 1. Selanjutnya, cairan dibuat dalam beberapa konsentrasi yaitu 0,1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 10 mg/mL dan 100 mg/mL.

### **2. Metode Agar -Well Diffusion**

Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *Agar-well diffusion*<sup>9</sup>. Ekstrak kering dan ekstrak segar diuji melawan *Staph. aureus*. Media MHA yang telah ditumbuhkan *Staph. aureus* berumur 18 jam, kemudian dibuat tiga buah lubang berdiameter 6 mm pada masing-masing cawan. Ekstrak yang telah disiapkan secara terpisah ditempatkan di dalam lubang menggunakan pipet steril sebanyak 20 µL. Di setiap cawan terdapat kontrol negatif (DMSO, 10 mL per lubang) dan kontrol positif (amoksisilin 10 mL per lubang). Cawan petri kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Analisa dilakukan sebanyak 3x ulangan.

### 3. Metode Agar-Disk Diffusion

Aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *Agar-disk diffusion*<sup>10</sup>. Ekstrak kering dan segar diuji melawan *Staph. aureus*. Dalam metode ini, media yang digunakan adalah media MHA yang telah ditumbuhkan *Staph. aureus* berumur 18 jam. Kertas cakram steril berdiameter 6 mm yang berisi sampel (20 µL), amoxicillin (10 µL) dan DMSO (10 µL) ditempatkan di setiap cawan. Cawan petri kemudian diinkubasi selama 18 pada suhu 37°C. Analisa dilakukan sebanyak 3x ulangan

## C. Penelitian Utama

### 1. Persiapan dan Ekstraksi Sampel

*Caulerpa lentilifera* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP), Jepara. Untuk membuat ekstrak kering, rumput laut dikeringkan di dalam *cabinet dryer* pada suhu 40°C sampai berat konstan kemudian diblender untuk memperkecil ukurannya. Sebanyak 25 g serbuk rumput laut kemudian diekstrak dengan etil asetat dalam berbagai rasio sampel terhadap pelarut (1: 5, 1:10 dan 1:15 mg/mL) serta berbagai lama waktu ekstraksi (1, 2, 3 hari) dalam botol gelap tertutup yang diletakkan di atas *shaker* (120 rpm, 28°C). Ekstrak kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C kemudian dilarutkan kembali dengan etil asetat hingga menghasilkan konsentrasi 100 mg/mL<sup>11</sup> Ekstrak yang dihasilkan disimpan dalam *freezer* pada suhu -20°C sampai digunakan.

### 2. Preparasi Inokulum

Kultur stok *Staph. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* dan *B. cereus* digunakan untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak *C. lentilifera*. Setiap bakteri diinokulasi ke dalam NA kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk pembuatan kultur intermediet. Koloni tunggal dari setiap inokulum dipindahkan ke dalam NB segar kemudian diinkubasi selama 18 jam menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm. Setelah itu, 1% kultur dipindahkan ke labu NB steril dan diinkubasi pada suhu 37°C menggunakan inkubator hingga mencapai *optical density* (OD)<sub>600</sub> 0,1 atau sama dengan 0,05 *Mcfarland Standard* di mana merepresentasikan bahwa bakteri sudah berada pada fase log awal. OD diukur dengan spektrofotometer. Pembuatan inokulum dilakukan di *laminar air flow hood* dalam kondisi aseptik<sup>10</sup>.

### 3. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Anggur Laut Menggunakan Metode Agar-Disk Diffusion

Aktivitas antimikroba dari sampel uji dilakukan dengan metode *Agar-disk diffusion*<sup>10</sup>. Dalam metode ini, MHA dan kertas cakram berdiameter 0,6 mm ditempatkan secara aseptik. Kultur (100 µL) diseka pada agar. Kertas cakram steril berisi 20 µL ekstrak kering ditempatkan pada posisi yang tepat di atas cawan. Semua cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil zona hambat diukur

dari tepi cakram kertas ke ujung zona hambat dengan skala milimeter dimana, besarnya zona hambat merepresentasikan besarnya aktivitas antibakteri. Semua percobaan dilakukan dalam 3x ulangan. Etil asetat steril (10 $\mu$ L) digunakan sebagai kontrol negatif dan Amoksisilin (10 $\mu$ L) digunakan sebagai kontrol positif. Hasil terbaik dari analisis *Agar-disk diffusion* akan digunakan untuk penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC).

#### 4. Analisis MIC dan MBC

Pada analisis MIC, masing-masing kultur diinokulasi dalam NB kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam hingga mencapai 0,1 (OD<sub>600</sub>). Kemudian 10% dari 0,1 (OD<sub>600</sub>) kultur dipindahkan ke NB segar untuk membuat larutan kultur kerja. Ekstrak *C. lentilifera* kemudian ditambahkan ke dalam 1 mL larutan kultur kerja dengan jumlah yang berbeda sebagai berikut 120, 60, 30, 15, dan 7,5  $\mu$ L. Tabung hasil uji MIC negatif dipilih untuk uji MBC dimana sampel akan diinkubasi lagi pada suhu 37°C selama 24 jam<sup>10</sup>.

#### 5. Analisa Kandungan Total Fenolik

Kandungan Total Fenolik (KTF) ekstrak *C. lentilifera* dianalisa dengan metode Folin-Ciocalteu. Ekstrak dengan konsentrasi 100 mg/mL dilarutkan dalam metanol sehingga diperoleh konsentrasi 0,1 mg/mL. Selanjutnya, ekstrak sebanyak 0,2 mL ditambah 1,58 ml akuades dan 1 ml pereaksi follin dan dibiarkan selama lima menit kemudian ditambahkan 3 mL larutan natrium karbonat 20%, dihomogenisasi dan diinkubasi pada suhu kamar selama dua jam dalam kondisi gelap. Absorbansi sampel diukur pada 750 nm menggunakan spektrofotometer. Perhitungan KTF didasarkan pada kurva standar asam galat yang dihasilkan sebelumnya dan hasilnya dinyatakan dalam mg *gallic acid equivalent* (GAE)/g ekstrak.

#### D. Analisa Statistik

Data hasil analisis aktivitas antibakteri (*Agar-well diffusion* dan *Agar-disk diffusion*) serta data KTF diuji dengan Two-way ANOVA Uji *Two Independent T-test* digunakan untuk membandingkan aktivitas antibakteri sampel terhadap kontrol positif. Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan SPSS for Windows 21.0.

### Hasil dan Pembahasan

#### A. Hasil Uji Pendahuluan

##### 1. Perbandingan antara Metode *Agar-Disk Diffusion* dan *Agar-Well Diffusion*

Terdapat beberapa metode berbeda yang efisien dan sesuai untuk pengujian aktivitas antibakteri yaitu *Agar-disk diffusion* dan *Agar-well diffusion*. Tabel 1 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara zona hambat ekstrak kering dengan pelarut etil asetat pada konsentrasi yang sama menggunakan kedua jenis metode

analisa aktivitas antibakteri tersebut. Aktivitas antibakteri tertinggi melawan *Staph. aureus* terdapat pada sampel ekstrak *C. lentilifera* kering yang dimaserasi dalam etil asetat dan dibuat dalam konsentrasi 100 mg/mL ( $0,25 \pm 0,01$  mm).

Hasil serupa juga dilaporkan oleh penelitian sebelumnya<sup>12</sup> bahwa ekstrak etanol dari *Baccharis ligustrina* (daun), *Baccharis platypoda* (batang), *Baccharis pseudotenuifolia* (batang), *Croton celtidifolius* (batang), *Cyathea phalerata* (batang), *Eugenia jambolana* (daun), *Eugenia uniflora* (daun), *Lippia Ekstrak alba* (daun) dan ekstrak etil asetat *Ganoderma anulare* (jamur) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan secara statistik terkait aktivitas antibakterinya antara metode *Agar-disk diffusion* dan *Agar-well diffusion*.

Secara keseluruhan aktivitas antibakteri menunjukkan hasil yang lebih baik bila menggunakan metode *Agar-disk diffusion* dibuktikan dengan tidak terdeteksinya efek penghambatan oleh ekstrak etanol kering, ekstrak etanol segar dan ekstrak etil asetat segar pada seluruh konsentrasi yang diujikan (0,1; 0,5; 10 dan 100 mg/mL) apabila menggunakan menggunakan metode *Agar-well diffusion*. Oleh karena itu, metode *Agar-disk diffusion* selanjutnya akan digunakan dalam penelitian utama.

## 2. Pengaruh Jenis Pelarut

Prinsip umum dalam ekstraksi pelarut adalah “*like dissolves like*”, yang berarti bahwa pelarut hanya mengekstrak komponen bioaktif yang memiliki polaritas serupa dengan pelarut. Komponen bioaktif pada *C. lentilifera* dapat diekstraksi dengan etanol dan etil asetat. Namun, hasil ekstraksi menggunakan etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap bakteri patogen dibandingkan dengan hasil ekstraksi etanol. Pada konsentrasi 100 mg/mL ekstrak *C. lentilifera* kering dengan pelarut etanol menunjukkan adanya zona hambat sebesar  $0,05 \pm 0,01$  mm sedangkan ekstrak *C. lentilifera* kering dengan pelarut etil asetat memiliki zona hambat sebesar  $0,25 \pm 0,01$  mm melawan bakteri *Staph. aureus* menggunakan metode *Agar-disk diffusion* (Tabel 1).

Penelitian sebelumnya juga melaporkan bahwa ekstrak *Caulerpa sertulorides* dengan pelarut etil asetat memiliki zona hambat yang lebih tinggi terhadap bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus acidophilus*) dan bakteri Gram negatif (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*) dibandingkan dengan ekstrak etanol<sup>9</sup>.

Perbedaan hasil ini dapat disebabkan oleh perbedaan polaritas etanol dan etil asetat. Etanol memiliki bilangan polaritas 65,4 sedangkan bilangan polaritas etil asetat jauh lebih rendah yaitu 23<sup>13</sup>. Dengan demikian, dapat diperkirakan bahwa senyawa bioaktif pada *C. lentilifera* yang memiliki aktivitas antibakteri merupakan senyawa non-polar sehingga lebih mudah larut dan terekstraksi dalam etil asetat (non-polar) daripada etanol (polar).

**Tabel 1. Zona Hambat (mm) ekstrak *C. lentilifera* melawan *Staphylococcus aureus* FNCC 167**

Metode	Konsentrasi (mg/mL)	Sampel Kering		Sampel Segar	
		Etanol	Etil Asetat	Etanol	Etil Asetat
<i>Agar-disk diffusion</i>	100	0.05 ± 0.01	0.25 ± 0.01 <sup>a</sup>	-	0.19 ± 0.16
	10	-	0.09 ± 0.05 <sup>b</sup>	-	-
	0.5	-	0.00 ± 0.00 <sup>c</sup>	-	-
	0.1	-	-	-	-
<i>Agar-well diffusion</i>	100	-	0.23 ± 0.02 <sup>a</sup>	-	-
	10	-	0.09 ± 0.04 <sup>b</sup>	-	-
	0.5	-	0.03 ± 0.01 <sup>c</sup>	-	-
	0.1	-	-	-	-

Keterangan :

- Data pada tabel merepresentasikan rata-rata ± standar deviasi ( $n= 3$ ).
- *Superscript* yang berbeda mengindikasikan adanya perbedaan yang signifikan ( $p < 0.05$ ) pada kolom yang sama (Two-way ANOVA, Duncan post-hoc test).
- Simbol ‘-’ melambangkan tidak ada zona hambat

### 3. Pengaruh Persiapan Sampel

Bahan pangan segar dan kering dapat digunakan sebagai sumber komponen tanaman sekunder. Tabel 1 menunjukkan bahwa ekstrak *C. lentilifera* kering memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi terhadap bakteri patogen dibandingkan dengan ekstrak *C. lentilifera* segar. Ekstrak *C. lentilifera* kering dengan pelarut etanol berkonsentrasi 100 mg/ mL memiliki zona hambat  $0,05 \pm 0,01$  mm dimana pada ekstrak *C. lentilifera* segar dengan pelarut dan konsentrasi yang sama tidak memiliki aktivitas antibakteri. Selain itu, pada hasil ekstraksi dengan etil asetat, aktivitas antibakteri 100 mg/mL ekstrak *C. lentilifera* kering lebih tinggi dibandingkan 100 mg/mL ekstrak *C. lentilifera* segar dengan zona hambat secara berurutan yaitu  $0,25 \pm 0,01$  mm dan  $0,19 \pm 0,16$  mm melawan bakteri patogen *Staph. aureus*.

Penelitian sebelumnya tentang aktivitas antibakteri *Falkenbergia hillebrandii* melaporkan bahwa ekstrak tumbuhan kering memberikan aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan ekstrak segar yang menggunakan pelarut yang sama. Ekstrak

etil asetat tanaman kering memiliki zona hambat  $6,32 \pm 2,05$  mm dan ekstrak etil asetat segar hanya memberikan aktivitas antibakteri  $4,32 \pm 2,05$  mm terhadap *S. thypimurium*<sup>14</sup>.

Mekanisme peningkatan kekuatan antibakteri yang terkait dengan pengeringan kemungkinan terkait dengan inaktivasi enzim deterioratif seperti lipoksigenase dan polifenol oksidase (PPO). PPO terdiri dari enzim katekol oksidase dan monofenol oksidase yang banyak terdapat pada tanaman. PPO dapat mengoksidasi difenol dengan adanya molekul oksigen, sehingga menyebabkan oksidasi enzimatis pada komponen bioaktif alami seperti polifenol yang berperan besar sebagai agen antibakteri<sup>15</sup>. Penelitian ini menduga bahwa inaktivasi PPO mungkin menjadi alasan mengapa *C. lentilifera* kering memiliki aktivitas antibakteri yang lebih tinggi antibakteri yang lebih tinggi daripada sampel segar.

#### 4. Pengaruh Konsentrasi Sampel

Tabel 1 menunjukkan bahwa diameter zona hambat *C. lentilifera* meningkat pada konsentrasi yang semakin tinggi. Zona hambat tertinggi dicapai pada sampel dengan konsentrasi 100 mg/mL. Zona hambat kemudian menurun dan menunjukkan hasil yang dapat diabaikan (0.00 mm) pada konsentrasi 0,1 mg/mL bila menggunakan metode *Agar-well diffusion* dan 0,5 mg/mL bila menggunakan metode *Agar-disk diffusion*. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka akan semakin tinggi pula aktivitas antibakterinya.

### B. Penelitian Utama

#### 1. Pengaruh Rasio Sampel terhadap Pelarut terhadap Aktivitas Antibakteri

Rasio yang tepat antara bahan pelarut dan tanaman sangat penting untuk mendapatkan proses ekstraksi yang optimal. Komponen antibakteri pada *C. lentilifera* diekstraksi pada rasio sampel terhadap pelarut yang berbeda (1: 5, 1:10 dan 1:15). Zona hambat tertinggi melawan seluruh bakteri patogen yang diujikan pada penelitian ini (Gambar 2a-d) diperoleh pada rasio 1:15. Aktivitas antibakteri *C. lentilifera* meningkat seiring dengan peningkatan rasio sampel terhadap pelarut. Hal ini dapat terjadi karena dengan meningkatkan volume pelarut maka dapat meningkatkan laju absorpsi, laju pengembangan dan laju difusi dinding sel tanaman sehingga proses ekstraksi berjalan semakin optimal<sup>16</sup>.

Pada Tabel 2, aktivitas antibakteri ekstrak *C. lentilifera* kering melawan *B. cereus*, *E. coli* dan *Staph. aureus* meningkat secara signifikan hingga rasio 1:10, kemudian *trend* peningkatan terus teramati meskipun tidak berbeda secara signifikan. Hal ini dapat diamati pada zona hambat ekstrak *C. lentilifera* kering yang tidak berbeda secara signifikan antara rasio 1:10 dibandingkan dengan rasio 1:15. Menurut teori, ketika rasio bahan baku terhadap pelarut mencapai terlalu tinggi sehingga mencapai titik jenuh maka, memungkinkan proses ekstraksi/jumlah komponen bioaktif yang terekstrak tidak meningkat secara signifikan lebih lanjut<sup>17</sup>

## 2. Pengaruh Waktu Ekstraksi terhadap Aktivitas Antibakteri

Waktu ekstraksi sangat penting dalam meminimalkan energi dan biaya proses ekstraksi. Gambar 2a-d menunjukkan pengaruh waktu ekstraksi terhadap aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut. Secara umum, semakin lama waktu ekstraksi maka akan diikuti dengan peningkatan aktivitas antibakteri. Dinding sel tumbuhan terdiri dari bagian selulosa yang kuat dan rapat sehingga membutuhkan waktu ekstraksi yang optimal untuk menghancurkan struktur selulosa tersebut. Rumput laut yang tergolong dalam keluarga *Caulerpaceae* memiliki  $\alpha$ -selulosa sekitar 102 g/kg dan hemiselulosa 254 g/kg<sup>18</sup>.

Tabel 2 menunjukkan adanya kecenderungan pengaruh lama waktu ekstraksi yang serupa pada kedua bakteri Gram-positif (*B. cereus* FNCC 0057 dan *Staph. aureus* FNCC 167) dimana semakin lama waktu ekstraksi maka akan semakin meningkat pula aktivitas antibakteri ekstrak *C. lentilifera* kering. Sementara, pada bakteri Gram-negatif penambahan waktu ekstraksi ternyata dapat meningkatkan aktivitas antibakteri namun, secara statistik tidak signifikan.

Pada penelitian ini, sampel dengan kondisi ekstraksi yang paling optimal terdapat pada ekstrak *C. lentilifera* kering dengan rasio sample terhadap pelarut sebesar 1:15 dengan waktu ekstraksi 72 jam dimana zona hambat melawan bakteri *B. cereus*, *E. coli*, *S. thypimurium* dan *Staph. aureus* secara berurutan adalah  $0,29 \pm 0,1$  mm,  $0,093 \pm 0,031$  mm,  $0,19 \pm 0,044$  mm dan  $0,24 \pm 0,069$  mm.

**Tabel 2. Zona Hambat Ekstrak *C. lentilifera* Kering**

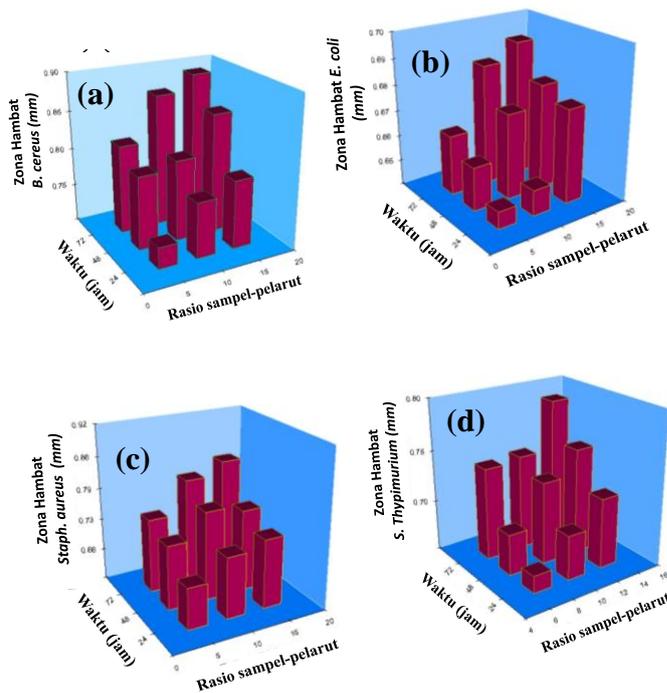
Rasio	Waktu (jam)	Zona Hambat (mm)			
		<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Staph. aureus</i>	<i>S. thypimurium</i>
		FNCC 0057	FNCC 194	FNCC 167	FNCC 0050
1:5	24	$0.13 \pm 0.054^{a1}$	$0.047 \pm 0.025^{a1}$	$0.083 \pm 0.032^{a1}$	$0.067 \pm 0.006^{a1}$
	48	$0.19 \pm 0.035^{ab1}$	$0.057 \pm 0.038^{a1}$	$0.13 \pm 0.031^{ab1}$	$0.090 \pm 0.017^{a1}$
	72	$0.22 \pm 0.076^{b1}$	$0.63 \pm 0.015^{a1}$	$0.15 \pm 0.02^{b1}$	$0.017^{a1}$
1:10	24		$0.050 \pm 0.026^{a12}$	$0.12 \pm 0.012^{a2}$	$0.14 \pm 0.12^{a1}$
	48	$0.17 \pm 0.031^{a12}$	$0.073 \pm 0.015^{a12}$	$0.18 \pm 0.078^{ab2}$	$0.093 \pm 0.023^{a1}$
	72	$0.22 \pm 0.070^{ab12}$	$0.087 \pm 0.025^{a12}$	$0.22 \pm 0.077^{b2}$	
1:15	24	$0.27 \pm 0.072^{b12}$	$0.077 \pm 0.021^{a2}$	$0.14 \pm 0.055^{a2}$	$0.13 \pm 0.046^{a1}$
	48	$0.19 \pm 0.072^{a2}$	$0.082 \pm 0.013^{a2}$	$0.17 \pm 0.050^{ab2}$	$0.143 \pm$

72	$0.26 \pm 0.064^{ab2}$	$0.093 \pm 0.031^{a2}$	$0.24 \pm 0.069^{b2}$	$0.015^{a1}$
	$0.29 \pm 0.1^{b2}$			$0.12 \pm 0.13^{a1}$
				$0.15 \pm 0.095^{a1}$
				$0.19 \pm 0.044^{a1}$

Keterangan :

- Data pada tabel merepresentasikan rata-rata ± standar deviasi ( $n = 3$ )
- *Superscript* huruf membandingkan antar waktu ekstraksi. *Superscript* angka membandingkan antar rasio sampel terhadap pelarut. Simbol yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) dalam kolom yang sama (Two-way ANOVA, Duncan post-hoc test)

**Gambar 2. Zona Hambat ekstrak *C. lentilifera* terhadap *B. cereus* (a), *E.coli* (b), *Staph. aureus* (c) dan *S. thypimurium* (d).**



### 3. Perbandingan *C. lentilifera* dan Amoksisilin sebagai Agen Antibakteri

Untuk mengetahui efektivitas dan kekuatan *C. lentilifera*, maka, hasil ekstraksi terbaik (maserasi selama 72 jam dengan rasio 1:15) dibandingkan dengan antibiotik komersial (amoksisilin) untuk dipelajari lebih lanjut. Semakin kecil angka rasio (Tabel 3), menunjukkan bahwa kekuatan aktivitas antibakteri rumput laut semakin mendekati kekuatan amoksisilin.

Meskipun *C. lentilifera* tidak memiliki aktivitas antibakteri sekuat amoksisilin, namun penelitian ini menemukan bahwa ekstrak *C. lentilifera* kering memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif (*Staph. aureus* dan *B. cereus*) sekaligus juga bakteri Gram-negatif (*E. coli* dan *S. thypimurium*) dimana kemampuan *C. lentilifera* dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif lebih baik bila dibandingkan dengan Gram-negatif.

**Tabel 3. Perbandingan Zona Hambat (mm) antara Sampel dan Antibiotik Komersial**

Bakteri	Zona Hambat (mm)		Rasio Kekuatan Sampel Terhadap Amoksisilin
	Sampel Uji	Amoksisilin	
<i>Bacillus cereus</i> FNCC 0057	0.29 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.045 <sup>b</sup>	0.43
<i>Escherichia coli</i> FNCC 194	0.093 ± 0.031 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.052 <sup>b</sup>	0.15
<i>Salmonella thypimurium</i> FNCC 0050	0.19 ± 0.044 <sup>a</sup>	0.75 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.25
<i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 167	0.24 ± 0.069 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.15 <sup>b</sup>	0.27

Keterangan :

- Data pada tabel merepresentasikan rata-rata ± standar deviasi ( $n = 3$ )
- *Superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) dalam baris yang sama (Two Independent T-test)

**Tabel 4. Nilai MIC dan MBC ekstrak *C. lentilifera* kering**

Bakteri	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	Rasio MBC : MIC
<i>Bacillus cereus</i> FNCC 0057	1.5	6	4
<i>Escherichia coli</i> FNCC 194	6	6	1
<i>Salmonella thypimurium</i> FNCC 0050	6	6	1
<i>Staphylococcus aureus</i> FNCC 167	1.5	1.5	1

Keterangan :

- Data pada tabel merepresentasikan rata-rata ± standar deviasi ( $n = 3$ )
- *Superscript* yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ( $P < 0,05$ ) dalam baris yang sama (Two Independent T-test)

Penelitian sebelumnya tentang aktivitas antibakteri pada ekstrak rumput laut dengan pelarut etil asetat juga menunjukkan hasil yang serupa. *Acanthophora spicifera* (Rhodophyceae) memberikan efek penghambatan yang lebih tinggi terhadap *Staphylococcus* sp dibandingkan *E. coli* *Turbinaria conoides* (Phaeophyceae) dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus* sp lebih baik daripada *Salmonella* sp. namun tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. Coli* <sup>19</sup>. *Caulerpa racemosa* (Chlorophyceae), *Sargassum hystix* dan *Cystoesira myrica* (Phaeopyceae) memiliki zona hambat yang lebih tinggi terhadap *B. cereus* dan *Staph. aureus* bila dibandingkan dengan *E. coli* dan *Salmonella* sp. <sup>20</sup>

Bakteri Gram-negatif lebih resisten bila dibandingkan dengan bakteri Gram-positif karena bakteri Gram-negatif memiliki tiga lapisan utama yaitu membran luar (OM), dinding sel peptidoglikan dan membran sitoplasma atau dalam <sup>21</sup>. OM adalah sebuah ciri pembeda bakteri Gram-negatif dimana Bakteri Gram-positif tidak memiliki organel ini. OM bertindak sebagai penghalang permeabilitas untuk beberapa senyawa antibakteri <sup>22</sup> sehingga membuat bakteri Gram-negatif lebih resisten.

#### 4. Penentuan MIC dan MBC

MIC didefinisikan sebagai konsentrasi obat atau senyawa terendah yang dapat menghambat pertumbuhan organisme secara *in vitro* setelah inkubasi selama satu malam <sup>23</sup>. Tabel 4 menunjukkan nilai MIC *C. lentilifera* terhadap kedua bakteri Gram-positif yang diujikan adalah 1,5 mg/mL sementara konsentrasi yang lebih tinggi diperlukan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif *E. coli* dan *S. thypimurium* yaitu sebesar 6 mg/mL.

Berdasarkan referensi <sup>24</sup>, ekstrak dengan nilai MIC kurang dari 100 mg/mL digolongkan sebagai inhibitor kuat, pada 100-500 mg/mL sebagai inhibitor sedang, pada 500-1000 mg/mL sebagai inhibitor lemah dan di lebih dari 1000 mg/mL sebagai tidak aktif. Dengan demikian, penelitian ini menemukan bahwa *C. lentilifera* dapat bertindak sebagai agen inhibitor yang kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif.

Selanjutnya, penelitian di tahun 2014 juga melaporkan bahwa agen antibakteri dapat diklasifikasikan sebagai dalam 2 kategori yaitu bakteristatik dan bakterisidal <sup>25</sup>. Agen bakteristatik akan menghambat pertumbuhan dan perkembangbiakan bakteri. Setelah terpapar agen bakteristatik, sel dalam populasi yang rentan berhenti membelah diri. Namun jika agen tersebut dihilangkan, sel-selnya sekali lagi berkembang-biak. Sedangkan pengaruh dari agen bakterisidal bersifat *irreversible*, artinya bakteri akan mati. Oleh karena itu, penelitian ini juga meneliti nilai MBC untuk memastikan apakah aktivitas antibakteri *C. lentilifera* termasuk dalam bakterisidal atau hanya bakteristatik.

Suatu komponen bioaktif bersifat bakterisidal bila rasio MBC / MIC  $\leq 4$ , dan bersifat bakteristatik bila rasio MBC: MIC  $> 4$  <sup>25</sup>. Tabel 4 bahwa *C. lentilifera* bertindak sebagai agen antibakteri yang bersifat bakterisidal melawan seluruh *human pathogenic bacteria* yang diujikan dalam penelitian ini.

## 5. Korelasi antara Kandungan Total Fenolik (KTF) dan Aktivitas Antibakteri

Analisis statistik menunjukkan korelasi yang sangat kuat dan sangat signifikan antara KTF dan aktivitas antibakteri pada *C. lentilifera* dengan nilai koefisien korelasi 0,594 dan nilai signifikansi 0,001 pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil ini menunjukkan bahwa komponen fenolik merupakan salah satu agen antibakteri utama pada *C. lentilifera*. Peningkatan jumlah komponen fenolik yang diekstraksi akan meningkatkan aktivitas antibakterinya.

Komponen fenolik yang bersifat non-polar telah teridentifikasi memiliki fungsionalitas sebagai agen antibakteri. Informasi profil komponen bioaktif yang mungkin berperan sebagai agen antibakteri pada *C. lentilifera* masih kurang diteliti hingga saat ini. Oleh karena itu, penelitian selanjutnya masih perlu dilakukan untuk mendapatkan pemahaman yang lebih mendalam.

## Kesimpulan

Aktivitas antibakteri *C. lentilifera* meningkat dengan bertambahnya waktu ekstraksi dan rasio pelarut sampel. Penghambatan tertinggi dicapai pada ekstraksi 72 jam dengan rasio sampel terhadap pelarut adalah 1:15. *C. lentilifera* memiliki nilai MIC sekitar 1,5 - 6 mg/mL yang tergolong sebagai inhibitor kuat dan rasio MBC: MIC  $\leq 4$  sehingga dianggap sebagai agen bakterisida yang mampu melawan bakteri Gram-negatif (*Escherichia coli*, *Salmonella thypimurium*) dan bakteri Gram-positif (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) yang sering menyebabkan penyakit pada manusia. Senyawa fenolik memiliki korelasi yang sangat kuat dan sangat signifikan dengan aktivitas antibakteri *C. lentilifera*.

## Konflik Kepentingan

Tidak ada benturan kepentingan terkait materi, metode dan temuan dalam penelitian ini.

**Daftar Pustaka**

1. Vallinayagam K, Arumugam R, Ragupathi R, Kannan R, Thirumaran G, Anantharaman P, editors. Antibacterial Activity of Some Selected Seaweeds from Pudumadam Coastal Regions. 2009.
2. Hellio C, Bremer G, Pons A, Gal Y, Bourgougnon N. Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany, France. *Applied microbiology and biotechnology*. 2000;54:543-9.
3. Mary A, Matias J. Rediscovery of naturally occurring seagrape *Caulerpa lentillifera* from the Gulf of Mannar and its mariculture. *Current Sci*. 2009;97:1418-20.
4. Alencar D, Silva S, Pires-Cavalcante K, Lima R, Pereira F, Sousa M, et al. Antioxidant potential and cytotoxic activity of two red seaweed species, *Amansia multifida* and *Meristiella echinocarpa*, from the coast of Northeastern Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2014;86:251-63.
5. Choudhury S, Sree A, Mukherjee S, Pattnaik P, Maringanti B. In Vitro Antibacterial Activity of Extracts of Selected Marine Algae and Mangroves against Fish Pathogens. *Asian Fisheries Science* 18 (2005): 285-294 Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 2005;18.
6. Cacace JE, Mazza G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*. 2003;59(4):379-89.
7. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*. 2004;1054(1):95-111.
8. Meireles MA. *Extracting Bioactive Compounds for Food Products: Theory and Applications* 2008.
9. Pushparaj A, R S R, Thangasamy B. An antibacterial activity of the green seaweed *Caulerpha sertularioides* using five different solvents. *International Journal of PharmTech Research*. 2014;6:1-5.
10. Wikler MA, Cockerill FR, Craig WA, Dudley MN, Eliopoulos GM, Hecht DW, et al. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - ninth edition. CLSI. 2006;26:1-35.
11. Yasurin P, Pitinidhipat N. Antibacterial Activity of *Chrysanthemum indicum*, *Centella asiatica* and *Andrographis paniculata* against *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes* under Osmotic Stress. *AU Journal of Technology*. 2012;15:239-45.
12. Valgas C, Souza SMD, Smânia E, Smânia A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2007;38:369-80.

13. Smallwood IM. Handbook of Organic Solvent Properties 2012. 1-306 p.
14. Manilal A, Sugathan S, Selvin J, Shakir C, Kiran S. Antibacterial activity of *Falkenbergia hillebrandii* (Born) from the Indian coast against human pathogens. *Phyton*. 2009;78:161-6.
15. Yi W, Wetzstein H. Anti-tumorigenic activity of five culinary and medicinal herbs grown under greenhouse conditions and their combination effects. *Journal of the science of food and agriculture*. 2011;91:1849-54.
16. Rajaei A, Barzegar M, Hamidi Esfahani Z, Sahari MA. Optimization of Extraction Conditions of Phenolic Compounds from Pistachio (*Pistachia vera*) Green Hull through Response Surface Method. *J Agr Sci Tech*. 2010;12.
17. Xu Y, Zhang R, Fu H. Studies on the Optimal Process to Extract Flavonoids from Red-raspberry Fruits. *Nature and Science*. 2005;3.
18. Sampath M. Optimization of the extraction process of phenolic antioxidant from *Polyalthia longifolia* (Sonn.) Thawaites. *Journal of applied pharmaceutical science*. 2013;3(2):148.
19. Lavanya R, Veerappan N. Antibacterial Potential of Six Seaweeds Collected from Gulf of Mannar of Southeast Coast of India. *Advances in Biological Research*. 2011;5.
20. Salem W, Galal H, El-Deen F. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). *African journal of microbiology research*. 2011;5:2160-7.
21. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2(5):14.
22. Hui YH, Kitts D, Stanfield PS. Foodborne disease handbook, second edition, revised and expanded: Volume 4: Seafood and environmental toxins 2018. 1-660 p.
23. Barros L, Calhella RC, Vaz JA, Ferreira ICFR, Baptista P, Estevinho LM. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology*. 2007;225(2):151-6.
24. Thirunavukkarasu R, Pandiyan P, Balaraman D, Subramanian K, George EGJ, Manikkam S, et al. Isolation of bioactive compound from marine seaweeds against fish pathogenic bacteria *Vibrio alginolyticus* (VA09) and characterisation by FTIR. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2013;1.
25. Pankey G, Sabath LD. Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2004;38:864-70.