

**DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
TERHADAP KAPANG *Aspergillus niger***

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

Oleh :
HAMDAN NUR CAHYANTO
NIM. 115080300111006

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

**DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
TERHADAP KAPANG *Aspergillus niger***

SKRIPSI

**PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh :

HAMDAN NUR CAHYANTO

NIM. 115080300111006



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

SKRIPSI

DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR MIKROALGA *Chlorella vulgaris*
TERHADAP KAPANG *Aspergillus niger*

Oleh:

HAMDAN NUR CAHYANTO
NIM. 115080300111006

telah dipertahankan didepan penguji
pada Tanggal 21 Desember 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I


(Dr. Ir. Yahya, MP)
NIP. 196600322 198601 1 001

Tanggal:

13 JAN 2016

Dosen Pembimbing I


(Dr. Ir. Hardoko, MS)
NIP. 19620108 199802 1 001

Tanggal:

13 JAN 2016

Dosen Pembimbing II


(Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes)
NIP. 19611022 198802 2 001

Tanggal:

13 JAN 2016

Mengetahui,

Ketua Jurusan


Dr. Ir. Arning Wujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001

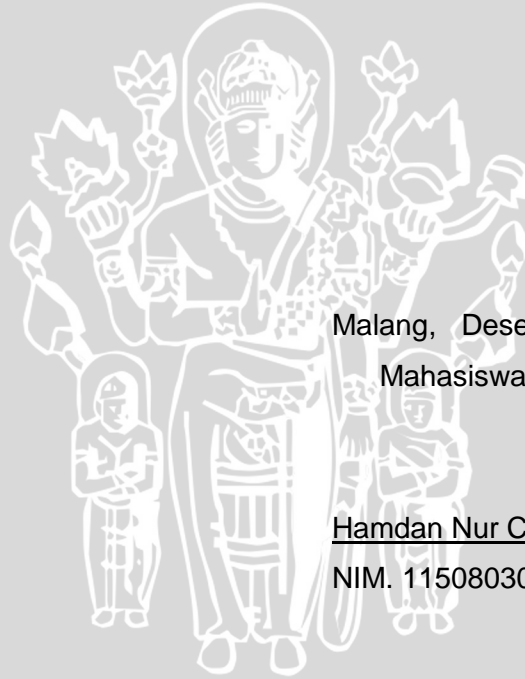
Tanggal:

13 JAN 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Desember 2015

Mahasiswa

Hamdan Nur Cahyanto

NIM. 115080300111006

UCAPAN TERIMAKASIH

Segala puji syukur penulis ucapkan kepada Allah SWT atas berkah, rahmat-Nya, penulis bisa menyelesaikan Laporan Skripsi ini. Laporan Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Dalam penyusunan Laporan Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Dr. Ir. Hardoko, MS selaku dosen pembimbing I, yang telah banyak memberikan pengarahan-pengarahan sejak penyusunan usulan sampai dengan selesainya penyusunan laporan skripsi ini.
2. Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes selaku dosen pembimbing II, yang telah banyak memberikan pengarahan dan bimbingan terkait tentang aturan penulisan dan penyusunan sejak penyusunan usulan sampai dengan selesainya penyusunan laporan skripsi ini.
3. Dr. Ir. Yahya, MPselaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran pada laporan skripsi ini.
4. Kedua Orang Tuaku yang memberikan doa dan dukungan selama penyusunan laporan skripsi ini.
5. Tim Mikroalga, yang setia menemani dalam suka maupun duka mulai dari awal penelitian hingga terselesaikannya laporan skripsi ini.
6. Teman-teman THP 2011 dan Dilla Passrelela yang telah banyak membantu dan memberikan semangat selama penyusunan laporan skripsi ini.
7. Serta seluruh pihak yang telah membantu terselesaikannya Laporan skripsi ini, yang tidak bisa disebutkan satu-persatu, saya ucapkan terima kasih.

Malang, Desember 2015

Penulis

RINGKASAN

HAMDAN NUR CAHYANTO (NIM. 115080300111006). Laporan Skripsi dengan judul Daya Hambat Ekstrak Kasar Mikroalga (*Chlorella vulgaris*) Terhadap Kapang *Aspergillus niger*. (Di Bawah Bimbingan : **Dr. Ir. Hardoko, MS** dan **Dr. Ir. Dwi Setijawati, M.Kes**)

Mikroalga merupakan produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan energi. Selain itu mikroalga juga dapat menghasilkan metabolit yang sangat bermanfaat sebagai pakan alami dan makanan sehat, mikroalga juga memiliki potensi yang dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya. Salah satu jenis mikroalga yang potensial untuk dikembangkan adalah *Chlorella* sp. yang mana telah diproduksi untuk pangan sehat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral. Selain itu juga dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya.

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui daya hambat ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap jamur *Aspergillus niger* serta mengetahui senyawa-senyawa bioaktif pada *Chlorella vulgaris*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium LIPI Serpong Tangerang pada Mei - Juli 2015.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian tahap pertama adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan variabel bebas yaitu perbedaan jenis pelarut (n-Hexan, etil asetat, dan etanol) dan lama waktu ekstraksi (24 jam, 48 jam, dan 72 jam). Sedangkan parameter uji pada penelitian ini adalah rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*, aktivitas antijamur ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger*, Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*), uji kualitatif fitokimia, dan identifikasi senyawa bioaktif dengan uji LC-MS. Kemudian pada penelitian tahap kedua adalah berdasarkan ekstrak terbaik penelitian tahap pertama yaitu untuk mengetahui pengaruh pH pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger*. Rancangan penelitian yang digunakan pada tahap kedua adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana. Perlakuan dari penelitian tahap kedua adalah menggunakan perlakuan pH yang berbeda (pH 4, pH 5, pH 6, pH 7 dan pH 8). Adapun parameter uji pada penelitian ini adalah uji pengaruh pH terhadap diameter

hambat antijamur *Aspergillus niger*, Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*), dan MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*). Data kemudian di analisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA), uji normalitas *kolmogronov-smirnov*.

Hasil penelitian pada tahap pertama adalah rendemen tertinggi didapatkan dengan jenis pelarut etanol dan lam awaktu ekstraksi 72 jam sebesar 8,33 %.Perlakuan ekstraksi dengan pelarut etanol dan lama ekstraksi 72 jam mendapatkan diameter hambat sebesar 13,45 mm. Nilai MIC sebesar 0,38 ppm dan MFC sebesar 1,50 ppm. Ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa fitokimia antara lain alkaloid, steroid, saponin dan fenol. Hasil uji LC-MS ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa ketoconazole yang bersifat antijamur.Hasil penelitian pada penelitian tahap kedua adalah pH terbaik yang berpengaruh terhadap stabilitas ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* adalah pH 8 dengan diameter hambat sebesar 10,82 mm, MIC sebesar 1,02 ppm dan MFC sebesar 4,04ppm.

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian tahap pertama yaitu Jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* adalah pelarut etanol dan lama ekstraksi 72 jam dengan diameter hambat sebesar $13,45 \pm 0,71$ mm, nilai MIC sebesar $0,38 \pm 0,04$ ppm dan MFC sebesar $1,50 \pm 0,15$ ppm.pH terbaik yang berpengaruh terhadap stabilitas ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* adalah pH 8 diameter hambat sebesar $10,82 \pm 0,12$ mm, nilai MIC sebesar $1,02 \pm 0,02$ ppm dan MFC sebesar $4,04 \pm 0,06$ ppm.

KATA PENGANTAR

Segala puji dan ucapan syukur kami panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan usulan proposal Skripsi ini. Dalam penyusunannya, penulis banyak mengambil literatur -literatur yang bersumber dari buku teks, artikel, jurnal untuk dijadikan tinjauan pustaka yang dapat mendukung pembuatan laporan tersebut.

Penulis menyadari dalam usulan proposal Skripsi ini tentunya ada kekurangan, maka diharapkan kritik dan saran sehingga dapat menjadi lebih sempurna. Semoga usulan Skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya, dan bagi pembaca pada umumnya terutama para Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Malang, Desember 2015

Penyusun

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMAKASIH	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	x
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan penelitian.....	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Mikroalga <i>Chlorella vulgaris</i>	5
2.2 Pelarut	6
2.2.1 Etanol.....	6
2.2.2 Etil Asetat	6
2.2.3 <i>n</i> -Hexan	7
2.3 Ekstraksi	7
2.4 Senyawa Bioaktif	8
2.5 Antibakteri.....	9
2.5.1 Mekanisme Kerja Antijamur.....	10
2.5.2 Uji Aktivitas Antijamur.....	10
2.6 Jamur Uji.....	10
2.6.1 <i>Aspergillus niger</i>	10
2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif	11
2.7.2 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)	12
2.7.3 Uji <i>Minimum Fungiocidal Concentration</i> (MFC)	13
2.7.4 Uji Kualitatif Fitokimia	14
2.7.5 Uji LC-MS.....	16
3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Materi Penelitian	18
3.1.1 Bahan Penelitian	18
3.1.2 Alat Penelitian	18
3.2 Metode Penelitian	19
3.2.1 Penelitian Tahap Pertama	19
3.2.2 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap Pertama	19
3.2.3 Prosedur Penelitian	20
3.2.4 Parameter Yang Diamati	26
3.3 Penelitian Tahap Kedua.....	26
3.3.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap Kedua	26

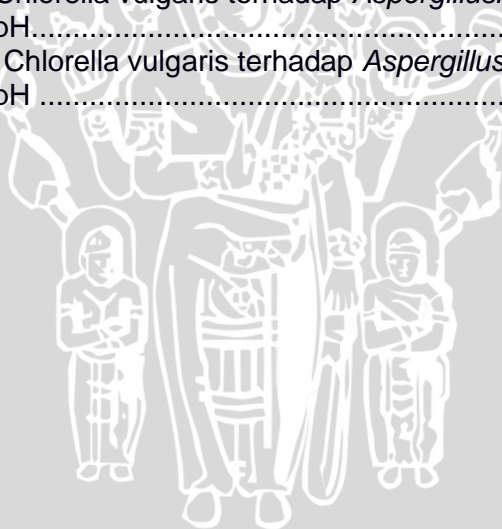


3.3.2. Karakterisasi pH pada Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	27
3.3.3 Parameter yang Diamati	28
3.4 Prosedur Analisis Parameter.....	28
3.4.1 Rendemen	28
3.4.2 Uji Diameter Zona Hambat	28
3.4.3 MIC dan MFC.....	28
3.4.4 Uji Kualitatif Fitokimia	30
3.4.4.1 Uji Tanin	30
3.4.4.2 Uji Alkaloid.....	30
3.4.4.3 Uji Flavonoid.....	31
3.4.4.4 Uji Saponin	31
3.4.4.5 Uji Steroid.....	31
3.4.4.6 Uji Fenol	31
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama.....	32
4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	32
4.1.2 Aktivitas Antijamur Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillus niger</i>	35
4.1.3 Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dan MFC (<i>Minimum Fungiocidal Concentration</i>) Tahap Pertama.....	38
4.1.4 Uji Kualitatif Fitokimia	42
4.1.1 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LC-MS	44
4.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua.....	47
4.2.1 Pengaruh pH Terhadap Stabilitas Antijamur.....	47
4.2.2 Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dan MFC (<i>Minimum Fungiocidal Concentration</i>) Tahap Kedua.....	49
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1 Kesimpulan	53
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN.....	59



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Chlorella vulgaris</i>	5
2. Diagram Alir Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari <i>Tetraselmis chuii</i> Metode Maserasi(Widayanti, 2012)	8
3. Diagram Alir Ekstraksi <i>Chlorella vulgaris</i> dengan Metode Maserasi Bertingkat(Modifikasi Widayanti, 2012)	24
4. Diagram Alir Pembuatan Suspensi jamur	25
5. Diagram Alir Uji Aktivitas Antimikroba pada Jamur	25
6. Rendemen Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	33
7. Hasil diameter hambat pelarut etanol lama ekstraksi 72 jam	36
8. Aktivitas Antijamur Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillus niger</i>	37
9. MIC Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillusniger</i>	39
10. MFC Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillusniger</i>	41
11. Hasil Kromatograf Uji LC Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	45
12. Hasil Kromatograf Uji MS Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	45
13. Gambar struktur senyawa ketoconazole	46
14. Diameter Zona Hambat Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> Konsentrasi 5000 ppm terhadap <i>Aspergillus niger</i> dengan Perlakuan pH.....	48
15. MIC Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillusniger</i> dengan perlakuan pH.....	50
16. MFC Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillus niger</i> dengan perlakuan pH	51



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Model Rancangan Percobaan Penelitian Tahap Pertama.....	20
2. Model Rancangan Percobaan Penelitian Tahap Kedua.....	27
3. Kandungan Fitokimia Ekstrak Kasar Etanol 72 jam <i>Chlorella vulgaris</i>	43
4. Dugaan Pecahan Ion Molekul Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	46
5. Kisaran pH Kapang <i>Aspergillus niger</i>	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Rendemen Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	59
2. Foto Proses Ekstraksi <i>Chlorella vulgaris</i>	62
3. Aktivitas Antijamur Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i> terhadap <i>Aspergillus niger</i>	66
4. Foto Proses Pembuatan Inokulum jamur	69
5. Foto Uji Diameter Zona Hambat Tahap Pertama	70
6. Perhitungan MIC dan MFC tahap pertama	71
7. Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Tahap Pertama.....	89
8. Uji MFC (<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>) Tahap Pertama.....	92
9. Foto Proses Uji MIC dan MFC	95
10. Skema Kerja Uji Kualitatif Fitokimia	97
11. Hasil Uji LC-MS	101
12. Skema Kerja dan Perhitungan DMSO 10% Konsentrasi 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm	105
13. Skema Kerja Pembuatan Ekstrak dengan Perlakuan pH	109
14. Uji Penganguruh pH Terhadap Ekstrak Kasar <i>Chlorella vulgaris</i>	111
15. Perhitungan MIC dan MFC tahap kedua	113
16. Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Tahap Kedua	123
17. Uji MFC (<i>Minimum Fungicidal Concentration</i>) Tahap Kedua	124
18. Perhitungan Media MHB dan MHA, PDB dan PDA.....	125
19. Perhitungan konversi dari rpm menjadi satuan G	126



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mikroalga merupakan produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan energi. Selain itu mikroalga juga dapat menghasilkan metabolit yang sangat bermanfaat, sehingga keberadaannya sebagai organisme hidup yang berukuran mikroskopis sudah mulai banyak dikaji. Pemanfaatan mikroalga pada saat ini sudah cukup berkembang, selain sebagai pakan alami dan makanan sehat, mikroalga juga memiliki potensi yang dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya. Salah satu jenis mikroalga yang potensial untuk dikembangkan adalah *Chlorella* sp. yang mana telah diproduksi untuk pangan sehat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral. Selain itu juga dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya.

Selain itu *Chlorella* sp. memiliki banyak manfaat, telah diproduksi secara komersial dan digunakan sebagai makanan kesehatan (*health food*) maupun *food additive* untuk meningkatkan kandungan gizi suatu bahan makanan. Hal ini disebabkan karena *Chlorella* sp. memiliki kandungan gizi yang lengkap, diantaranya protein, lemak, karbohidrat, vitamin, mineral, serat, klorofil, β -carotene dan *Chlorella Growth Factor* (CGF). Sargowo dan Ratnawati (2005) menyatakan bahwa *Chlorella* sp mengandung: 60,5% protein, 11% lemak, 20,1% karbohidrat, 4,6% mineral dan serat 0,2% (Mercola, 2006).

Salah satu jenis komponen aktif dari *Chlorella* sp. berupa senyawa antibakteri yang merupakan hasil metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan bahan hasil metabolisme suatu organisme yang tidak diperlukan

oleh organisme tersebut untuk kelangsungan hidupnya (Bains, 1995). Bahan antibakteri tersebut merupakan campuran asam lemak yang disebut *chlorellin* yang memperlihatkan aktivitas antibakteri dan autotoksin. Autotoksin adalah bahan yang dihasilkan oleh suatu organisme yang bersifat toksik dan mempunyai efek menghambat pertumbuhannya sendiri.

Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa komponen *algisidal allelopatik* yang dihasilkan oleh mikroalga mempunyai fungsi sebagai *autoinhibitor*. Salah satu jenis mikroalga yang menghasilkan senyawa aktif bersifat *autoinhibitor* adalah *Chlorella vulgaris*. Senyawa tersebut merupakan produk metabolisme sel yang disekresikan dan diakumulasi ke medium yang mempunyai efek menghambat pertumbuhan mikroalga sendiri dalam kultur sehingga pertumbuhan sel mikroalga menurun. Pembentukan *autoinhibitor* terjadi karena adanya perubahan kondisi lingkungan (kultur), seperti pH dan konsentrasi nutrient, yang menyebabkan pembentukan senyawa *allelopatik* (Metting dan Pyne, 1986). *Allelopatik* merupakan gejala kemampuan tumbuhan mengeluarkan zat untuk mematikan tumbuhan atau tanaman penting di sekitarnya dalam mengamankan kelangsungan hidupnya.

Walaupun telah ada penelitian sebelumnya mengenai kandungan *chlorellin* dalam *Chlorella vulgaris*, namun masih sedikit informasi mengenai pemanfaatan *Chlorella vulgaris* ini sebagai anti jamur pada bahan pangan. Oleh sebab itu, pada penelitian tahap pertama ini sangat penting dilakukan untuk mendapatkan daya hambat tertinggi dari jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*. Dan pada penelitian tahap kedua adalah untuk memperoleh pH terbaik yang berpengaruh terhadap stabilitas ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*.

1.2 Rumusan Masalah

Dalam bahan pangan, yang sering menjadi masalah adalah adanya mikroba, terutama mikroba yang ditimbulkan akibat jamur. Salah satu jamur yang sering menyerang pada bahan pangan adalah *Aspergillus niger*. Dibutuhkan anti jamur alami yang dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger*. Anti jamur alami salah satunya didapatkan dari *Chlorella vulgaris*. Dari uraian tersebut, pemanfaatan *Chlorella vulgaris* masih memerlukan kajian yaitu:

- Apakah ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dapat menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*?
- Jenis pelarut apa yang digunakan hingga memperoleh ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terbaik?
- Berapa pH terbaik yang diperoleh sehingga berpengaruh terhadap stabilitas ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui daya hambat ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap jamur *Aspergillus niger*. Adapun tujuan penelitian secara khusus adalah:

- a. Pada penelitian tahap pertama adalah untuk mendapatkan jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik yang digunakan hingga memperoleh ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dengan metode ekstraksi maserasi bertingkat berdasarkan daya hambat tertinggi.
- b. Pada penelitian tahap kedua adalah untuk menentukan sejauh mana pengaruh pH terhadap stabilitas ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* sehingga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan nantinya senyawa anti jamur dari ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dapat menjadi alternatif kepada masyarakat, khususnya untuk menangani pertumbuhan jamur pada bahan pangan yang sering diakibatkan oleh jamur seperti *Aspergillus niger*. Selain itu juga diharapkan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ini dapat dikembangkan menjadi anti jamur alami yang bermanfaat dan berdaya guna tinggi.

1.5 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah:

1. Semakin tinggi tingkat kepolaran pelarut dan lama ekstraksi ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dapat menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*.
2. Senyawa bioaktif dalam *Chlorella vulgaris* berpotensi menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*.

1.6 Waktu dan Tempat

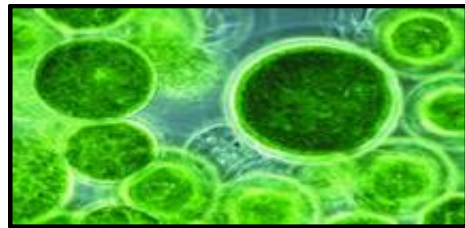
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Hidrobiologi, Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Laboratorium penyakit dan kesehatan ikan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada Mei – Juli 2015 dan pengujian LC-MS di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong pada Agustus 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Menurut Haryoto dan A. Wibowo (2004), plankton merupakan suatu organisme yang berukuran kecil yang hidupnya melayang-layang terombang-ambing oleh arus di lautan bebas. Fitoplankton terdiri dari makhluk hidup hewan yang disebut zooplankton dan tumbuh-tumbuhan yang disebut fitoplankton. Fitoplankton yang bersel satu yang penting adalah golongan diatom dan dinoflagelata. Beberapa kelompok dinoflagelata yang biasa terdapat di perairan adalah *Chlorella sp*, *Dunaliella sp*, *Tetracelmischuii* dan *Spirulina*. *Chlorella sp.* merupakan salah satu jenis fitoplankton dengan sistematika sebagai berikut:

Filum : Chlorophyta
Kelas : Chlorophyceae
Ordo : Chlorococcales
Familia : Chlorellaceae
Genus : Chlorella
Spesies : *Chlorella sp.*



Gambar 1. *Chlorella vulgaris*
Sumber: google images, 2015

C. vulgaris merupakan salah satu jenis mikroalga hijau yang berbentuk bulat atau bulat telur, serta memiliki kloroplas seperti cawan, dengan dinding yang keras, padat dan garis tengahnya 5 μm . *Chlorella sp.* merupakan kelompok alga yang paling beragam, dengan lebih dari 7000 spesies yang dapat tumbuh dalam habitat yang beragam. *Chlorella sp.* menggunakan energi cahaya sebagai bahan bakar penghasil gula. *Chlorella sp.* merupakan tumbuhan akuatik yang berkembang biak secara seksual dan aseksual. Pada umumnya, *C. vulgaris* digunakan sebagai pakan larva-larva biota laut seperti ikan, kerang dan udang yang langsung diberikan bersama media cair. Begitu pula untuk bahan baku

pakan dan pangan biomassa *chlorella* harus bebas dari unsur kimia anorganik yang membahayakan (Amini dan Syamdidi, 2005).

2.2 Pelarut

2.2.1 Etanol

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair, atau gas, yang menghasilkan larutan. Pelarut yang paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung karbon) yang juga disebut pelarut organik. Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Andrea, 2011).

Etanol disebut juga etil alkohol dengan rumus kimia C_2H_5OH atau CH_3CH_2OH dengan titik didihnya $78,4^\circ C$. Etanol memiliki sifat tidak berwarna, volatil dan dapat bercampur dengan air. Ada 2 jenis etanol, etanol sintetik sering disebut metanol atau metil alkohol atau alkohol kayu, terbuat dari etilen, salah satu derivat minyak bumi atau batu bara. Bahan ini diperoleh dari sintesis kimia yang disebut hidrasi, sedangkan bioetanol direkayasa dari biomassa (tanaman) melalui proses biologi (enzimatik dan fermentasi) (Rama, 2008)

2.2.2 Etil Asetat

Etil asetat adalah cairan jernih, tak berwarna, berbau khas. Etil asetat adalah pelarut polar menengah yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Etil asetat merupakan penerima ikatan hidrogen yang lemah, dan bukan suatu donor ikatan hidrogen karena tidak adanya proton yang bersifat asam (yaitu hidrogen yang terikat pada atom elektronegatif seperti fluor, oksigen, dan nitrogen). Etil asetat dapat melarutkan air hingga 3%, dan larut

dalam air hingga kelarutan 8% pada suhu kamar. Kelarutannya meningkat pada suhu yang lebih tinggi. Namun demikian, senyawa ini tidak stabil dalam air yang mengandung basa atau asam (Minarti, *et al.*, 2013)

2.2.3 n-Hexan

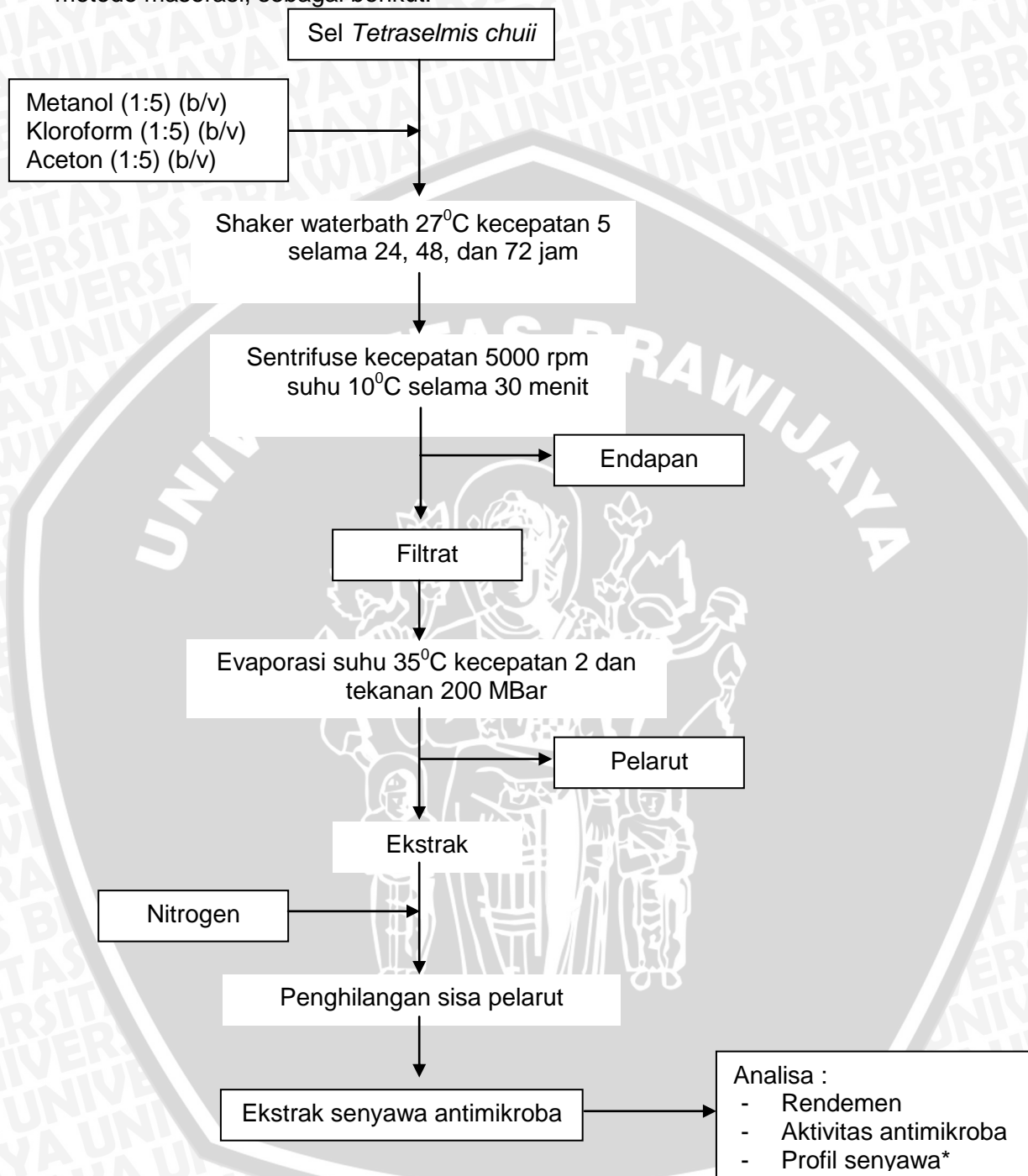
Senyawa-senyawa non-polar yang terkandung dalam sampel dapat diekstraksi dengan menggunakan pelarut yang bersifat nonpolar pula, salah satunya adalah n-heksan. Pelarut n-heksan merupakan salah satu pelarut yang baik untuk mengekstraksi senyawasenyawa yang bersifat non-polar karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya karena pelarut ini bersifat relatif stabil, mudah menguap serta selektif dalam melarutkan zat. (Satria, 2013).

2.3 Ekstraksi

Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueus phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueus phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organic. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1978).

Menurut Suyanti (2008), secara umum, tujuan ekstraksi ialah memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut (air). Teknik ekstraksi sangat berguna untuk pemisahan secara cepat dan “bersih” baik untuk zat organik maupun zat anorganik. Cara ini dapat digunakan untuk analisis makro maupun mikro. Melalui proses ekstraksi, ion logam dalam pelarut air ditarik keluar dengan suatu pelarut organik (fase organik).

Menurut Widayanti (2012), prosedur untuk melakukan ekstraksi dengan metode maserasi, sebagai berikut:



Gambar 2. Diagram alir Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari *Tertselmis chuii* Metode Maserasi (Widayanti, 2012).

Macam-macam metode ekstraksi menurut Harborne (1984), meliputi:

1. Maserasi: Metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dalam pelarut dengan atau tanpa pengadukan.
2. Diakolasi: Metode ekstraksi dengan penambahan tekanan udara.
3. Dekoksi (rebus): Metode paling sederhana dan mudah dilakukan menggunakan bahan yang larut air dan stabil terhadap panas.
4. Ekstraksi lengkap: Metode ekstraksi yang melibatkan ekstraksi berturut-turut menggunakan pelarut non polar, semi polar, dan pelarut polar
5. Arus balik: Metode ekstraksi secara berkesinambungan dimana sampel dan pelarut saling bertemu melalui gerakan aliran yang berlawanan.
6. Sonikasi: Metode ekstraksi menggunakan gelombang suara atau getaran dengan frekuensi antara 20 KHz-2000KHz.

2.4 Senyawa Bioaktif

Chlorella sp. mempunyai pigmen warna hijau dan kaya dengan warna biru yang disebut *Phycocyanin* merupakan protein komplek. *Phycocyanin* merupakan pembentuk darah putih didalam tubuh manusia dan merupakan antibodi atau pembentuk imunitas dari serangan racun kimia dan radiasi. Warna hijau dari klorofil pada *Chlorella sp.* disebut darah hijau (*greenblood*) mempunyai kandungan zat besi pembentuk hemoglobin yang berfungsi sebagai penambah makanan bagi penyandang anemia. Pada *Chlorella sp.* terdapat warna kuning oranye merupakan kandungan karoten terdiri dari *xanthopill*, *myxoxanthopill*, *zeaxathin*, *cryptoxanthin*, *echinenone*, *fucoxanthin*, *violaxanthin* dan *astaxanthin*. Total karoten yang terdapat pada *Chlorella sp.* per 10 g yaitu 0,37%. Karoten mempunyai khasiat pada manusia sebagai antioksidan. *Chlorella sp.* mengandung polisakarida sebanyak 15-25 g merupakan karbohidrat yang mudah diserap didalam darah. Pada *Chlorella sp.* kering terdapat enzim

Superoxidedismutase (SOD) sekitar 10.000-37.500 unit per 10 g yang merupakan anti radikal bebas untuk mencegah penuaan dini (Yadial *et al.*, 2011).

Clorella sp. adalah mikroalga hijau uniselluler yang pertama kali digunakan dalam penelitian. *Clorella* sp. merupakan salah satu spesies mikroalga yang memiliki banyak manfaat, telah diproduksi secara komersial dan digunakan sebagai makanan kesehatan (*health food*) maupun *food additive* untuk meningkatkan kandungan gizi suatu bahan makanan. Hal ini disebabkan karena *Chlorella* sp. memiliki kandungan gizi yang lengkap, diantaranya protein, lemak, karbohidrat, vitamin, mineral, serat, klorofil, β -carotene dan *Chlorella Growth Factor* (CGF) (Mercola, 2006). Sargowo dan Ratnawati (2005) menyatakan bahwa *Chlorella* sp mengandung: 60,5% protein, 11% lemak, 20,1% karbohidrat, 4,6% mineral dan serat 0,2%.

2.5 Anti jamur

2.5.1 Mekanisme Kerja Anti jamur

Obat atau senyawa yang digunakan untuk membunuh bakteri merupakan antibakteri, khusus bakteri yang merugikan manusia. Definisi ini berkembang bahwa antibakteri merupakan senyawa kimia yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh suatu mikroorganisme. Antimikroba yang ideal menunjukkan sifat toksisitas selektif, toksisitas yang selektif merupakan fungsi reseptor yang spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat atau karena hambatan biokimia yang terjadi bagi organisme namun tidak bagi inang (Ganiswara, 1995).

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri antara lain sebagai berikut; (1) menghambat sintesis dinding sel, (2) merusak permeabilitas membran sel, (3) menghambat sintesis RNA (proses transkripsi), serta (4) menghambat sintesis protein (proses translasi) dan replikasi DNA (Pradhika, 2008).

2.5.2 Uji Aktivitas Anti jamur

Menurut Jawetz *et al.*, (1995), semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer (1996) antara lain: (1) konsentrasi mikroba uji, (2) konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium.

Prosedur difusi-kertas cakram-agar (metode Kirby-Bauer, 1996) yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakkan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

2.6 Jamur Uji

2.6.1 *Aspergillus niger*

Aspergillus sp. adalah spesies jamur yang paling umum yang mampu menghasilkan mikotoksin dalam makanan dan bahan pakan. Mikotoksin diketahui hepatocarcinogens ampuh pada hewan dan manusia. Kehadiran dan pertumbuhan jamur dapat menyebabkan pembusukan dan mengakibatkan pengurangan kualitas dan kuantitas makanan (Irkin dan Mihriban, 2007).

Aspergillus niger kepala pembawa konidia yang besar yang dipak secara padat, bulat dan berwarna hitam, coklat hitam atau ungu coklat. Konianaya kasar dan mengandung pigmen. Kebanyakan galur dalam grup ini mempunyai sklerotia yang berwarna abu-abu sampai hitam. *Aspergillus niger* dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37 °C, dengan suhu minimum 6-8 °C, dan suhu maksimum 45-47 °C. Selain itu, dalam proses pertumbuhannya fungi ini memerlukan oksigen yang cukup (aerobik). (Fardiaz, 1992)

Aspergillus niger dapat menyebabkan beberapa penyakit yang disebut aspergilosis yang biasanya menyerang paru-paru burung, sapi, domba, dan kadang-kadang menyerang paru-paru manusia. Selain itu kapang ini juga dapat menyebabkan penyakit alergi rhinitis, asma bronchia dan peneumonitis hipertensif (Lewis *et al.*, 1997)

2.7 Uji Senyawa Bioaktif

2.7.1 Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Konsentrasi minimum penghambatan atau lebih dikenal dengan MIC (Minimum Inhibitory Concentration) adalah konsentrasi terendah dari antibiotika atau antimikrobal yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Nilai MIC adalah spesifik untuk tiap-tiap kombinasi dari antibiotika dan mikroba. MIC dari sebuah antibiotika terhadap mikroba digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari mikroba terhadap antibiotika. Nilai MIC berlawanan dengan sensitivitas mikroba yang diuji. Semakin rendah nilai MIC dari sebuah antibiotika, sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. MIC dari sebuah antibiotika terhadap spesies mikroba adalah rata-rata MIC terhadap seluruh strain dari spesies tersebut. Strain dari beberapa spesies mikroba adalah sangat berbeda dalam hal sensitivitasnya. Metode uji antimikrobal yang sering digunakan adalah metode Difusi Lempeng Agar. Uji ini dilakukan pada permukaan medium padat. Mikroba ditumbuhkan pada permukaan medium dan kertas saring yang

berbentuk cakram yang telah mengandung mikroba. Setelah inkubasi diameter zona penghambatan diukur. Diameter zona penghambatan merupakan pengukuran MIC secara tidak langsung dari antibiotika terhadap mikroba. Sensitivitas klinik dari mikroba kemudian ditentukan dari tabel klasifikasi (Jawetz *et al.*, 1996).

Nilai MIC merupakan konsentrasi terendah dari tabung yang tidak menunjukkan adanya kekeruhan. Untuk mengetahui nilai MFC, dilakukan *streak* pada medium PDA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MFC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut (Roihanah *et al.*, 2012).

KHM ditentukan dengan membandingkan absorbansi setelah perlakuan inkubasi dikurangi absorbansi sebelum perlakuan. Apabila terdapat konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri, ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan (OD bakteri adalah ≤ 0), maka didapatkan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau *Minimallnhibitory Concentration* (MIC) (Fatisa, 2013).

2.7.2 Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

Inokulum awal digunakan untuk menentukan KBM dimana telah disebutkan bahwa KBM merupakan konsentrasi terendah yang memungkinkan pertumbuhan hanya $<0,1\%$ dari jumlah inokulum awal, sehingga $0,1\%$ dari jumlah inokulum awal data diatas sebesar 44 koloni (11). Pada konsentrasi 10% didapatkan hanya isolat II yang mengalami pertumbuhan bakteri sedangkan isolat I, III, dan isolat IV tidak mengalami pertumbuhan koloni bakteri. Pada konsentrasi 10% belum dapat dikatakan sebagai KBM dikarenakan rata-rata jumlah pertumbuhan koloninya sebesar 342 (>44 koloni) atau dengan kata lain

pertumbuhan koloninya $>0,1\%$ dari jumlah inokulum awal (Ardanarudin *et al.*, 2004).

Untuk menentukan nilai KBM dilakukan uji lanjutan, yaitu terhadap semua tabung yang digunakan dalam KHM yang tidak menunjukkan kekeruhan apapun terhadap bakteri, dengan cara mengambil 0,2 mL dari suspensi yang menunjukkan KHM tersebut, lalu ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml media NB steril. Tabung reaksi diinkubasi selama 12-18 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi (OD) dengan spektrofotometer UV-Vis ($\lambda = 480 \text{ nm}$). Apabila hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi terendah ekstrak mempunyai OD adalah 0 (tidak ada kekeruhan), maka didapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) (Fatisa, 2013).

Untuk mengetahui nilai MFC, dilakukan *streak* pada medium PDA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan *colony counter*. Dari hasil perhitungan koloni tersebut dapat ditentukan MIC dan MFC dari ekstrak kasar bahan antibakteri tersebut (Roihanah *et al.*, 2012).

2.7.3 Uji Kualitatif Fitokimia

Skринing fitokimia merupakan tahap pendahuluan dalam penelitian fitokimia. Secara umum dapat dikatakan bahwa sebagian besar metodenya merupakan reaksi pengujian warna dengan suatu pereaksi warna. Metode yang digunakan atau dipilih untuk melakukan skrining fitokimia harus memenuhi beberapa persyaratan antara lain sederhana, cepat, dapat dilakukan dengan peralatan minimal, bersifat semikuantitatif yaitu memiliki batas kepekaan untuk senyawa yang bersangkutan, selektif terhadap golongan senyawa yang dipelajari, dan dapat memberikan keterangan tambahan ada atau tidaknya

senyawa tertentu dalam dari golongan senyawa yang dipelajari. Pendekatan skrinning fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, buah, bunga, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif seperti alkaloid, antrakinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), dan sebagainya. Adapun tujuan pendekatan skrinning fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan (Sundari, 2010).

Menurut Otari (2013), penapisan fitokimia dilakukan dengan menguji adanya golongan senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid, saponin, tanin, dan fenolik. Prosedur pengujiannya adalah sebagai berikut:

a. Identifikasi Alkaloid

Untuk mengidentifikasi alkaloid, ekstrak dilarutkan dengan etanol 96% kemudian ditambahkan asam klorida encer 2 N. Filtrat yang diperoleh disaring kemudian diidentifikasi menggunakan pereaksi Mayer LP, Boauchardat LP, Drangendorff LP. Pada penambahan Mayer LP, hasil positif ditandai dengan terbentuknya endapan berwarna putih atau kuning. Hasil positif dragendorff LP ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata. Penambahan bouchardat LP memberikan hasil positif jika terbentuk endapan coklat sampai hitam.

b. Identifikasi Saponin

Ekstrak ditambahkan 5 mL aquadest panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil selama tidak kuning dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan pada penambahan 1 tetes asam klorida 2 N buih tidak hilang.

c. Identifikasi Flavonoid

Tiga metode yang digunakan untuk menguji flavonoid. Pertama, amonia encer (5 mL) ditambahkan ke sebagian filtrat encer dari ekstrak. Kemudian sulfat pekat (1 mL) ditambahkan. Hilangnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid. Kedua, beberapa tetes larutan aluminium 1% ditambahkan ke sebagian dari filtrat, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid. Ketiga, sebagian dari ekstrak dipanaskan dengan 10 mL etil asetat yang telah diuapkan selama 3 menit. Campuran kemudian disaring dan 4 mL filtrat dikocok dengan penambahan 1 mL larutan amonia encer, terbentuknya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

d. Identifikasi Terpenoid

Sejumlah 0,5 g ekstrak masing-masing ditambahkan dengan 2 mL kloroform. Kemudian dengan hati-hati ditambahkan (3 mL) H_2SO_4 pekat sampai membentuk lapisan, terbentuknya warna merah kecoklatan pada permukaan menunjukkan adanya terpenoid.

e. Identifikasi Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak digunakan dalam 10 mL air dalam tabung reaksi dan kemudian disaring. Ditambahkan beberapa tetes $FeCl_3$ 0,1% dan diamati perubahan warna menjadi hijau kecoklatan atau biru kecoklatan.

f. Identifikasi Fenolik

Sejumlah ekstrak ditambahkan 3-4 tetes larutan besi klorida, terbentuknya warna kebiru-biruan menunjukkan adanya fenolik.

2.7.4 Uji LC - MS

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) adalah suatu metode pemisahan modern dalam analisa farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas dan uji kemurnian. Yang menjadi titik beratnya yaitu untuk menganalisa

senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak dapat dianalisis dengan Kromatografi Gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisa menggunakan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul. (Lindsay, 1992).

Menurut Ginting (2008), *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bioanalisis dimulai pada akhir tahun 1980an. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS antara lain :

1. Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.
2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer massa "klasik", penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi.
3. Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.
4. Kaya informasi. Sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah mikroalga *Chlorella vulgaris* yang didapat dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara, Jawa Tengah. Sedangkan biakan murni jamur *Aspergillus niger* dengan kepadatan 10^6 koloni/mL yang merupakan koleksi jamur dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : sebagai pelarut digunakan etanol p.a , etil asetat p.a dan n-Hexan p.a. Bahan-bahan pendukung yang digunakan adalah paku steril yang berdiameter 5,5 mm, aquades, media PDA (*Potato Dextro Agar*) dengan merk "Merck", PDB (*Potato Dextro Broth*) dengan merk "Merck" untuk menumbuhkan *Aspergillus niger* dan kertas saring, kertas label, aluminium foil, tali, alkohol, spiritus dan plastic.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, gunting, mortar, beaker glass (*pyrex*) 250 ml, erlenmeyer (*pyrex*) 250 ml, gelas ukur (*pyrex*) 100 ml, corong, *hot plate*, *magnetic stirrer*, spatula, botol sampel, *micropipet*, pipet tetes, cuvet, tabung reaksi (*pyrex*), rak tabung reaksi, beaker glass (*pyrex*) 100 ml, pinset, dan cawan petri. Peralatan untuk anti jamur antara lain erlenmeyer 250 ml, autoklaf dengan merk "HL-36Ae", tabung reaksi, rak tabung, cawan petri, sprayer, jarum ose, dan bunsen dan *rotary evaporator* dengan merk "IKA RV 10". Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) dengan merk "*Hitachi L 6200 Mariner Biospectrometry*" yang terdapat di LIPI Serpong, Tangerang Selatan.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada ekstrak *Chlorella vulgaris* terhadap kualitas antijamur. Hipotesis ini dibuktikan dengan melakukan uji daya penghambatan antijamur dari konsentrasi ekstrak yang berbeda terhadap pertumbuhan jamur *Aspergillus niger*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening (zona penghambatan jamur) pada setiap ekstrak yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif senyawa kimia dari sampel yang berhasil diekstraksi.

Metode eksperimen ini terdiri dari 2 tahap yaitu: (1) Ekstraksi *Chlorella vulgaris* dengan beberapa jenis pelarut berbeda (non polar, semi polar, dan polar) dan lama ekstraksi. (2) Mengetahui pengaruh pH terhadap stabilitas antijamur ekstrak *Chlorella vulgaris*.

3.1.1 Penelitian Tahap Pertama

Penelitian pendahuluan dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan ekstrak terbaik dari mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan lama maserasi terhadap jenis pelarut yang berbeda. Penelitian tahap pertama dilakukan terhadap mikroalga *Chlorella vulgaris* sebagai sampel bahan baku, dimana digunakan 3 jenis pelarut dengan sifat kepolaran yang berbeda yaitu *n*-Hexan (non polar), etil asetat (semi polar), dan etanol (polar). Ketiga pelarut tersebut digunakan untuk mendapatkan hasil ekstrak *Chlorella vulgaris* yang terbaik berdasarkan diameter hambat tertinggi.

3.2.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap Pertama

Perlakuan percobaan yang diterapkan dalam penelitian ini adalah jenis pelarut (A) dan lama ekstraksi (B). Jenis pelarut terdiri dari larutan (A1) pelarut *n*-

hexan (non polar), (A2) etil asetat (semi polar), (A3) etanol(polar). Lama ekstraksi terdiri dari (B1) 24 jam, (B2) 48 jam, (B3) 72 jam. Berdasarkan perlakuan percobaan yang diterapkan maka penelitian ini dirancang dengan dua faktorial dengan model Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Kedua faktor tersebut dilakukan dengan tiga kali ulangan. Penentuan ulangan ini dapat diketahui melalui persamaan :

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Dimana: t = Perlakuan

r = Ulangan

Sesuai dengan persamaan diatas ulangan dari perlakuan yang diinginkan dapat ditentukan. Banyaknya ulangan dapat dihitung sebagai berikut:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(6 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$6 (r - 1) \geq 15$$

$$6r - 6 \geq 15$$

$$6r \geq 15 + 6$$

$$6r \geq 21$$

$$r \geq 3 \text{ (penggunaan ulangan sebanyak 3 ulangan)}$$

Metode pengujian data yang digunakan adalah sidik ragam (ANOVA) dimana jika terdapat pengaruh yang nyata atau sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan uji lanjut BNT (Beda Nyata Terkecil). Model statistika yang digunakan dalam penelitian tahap pertama sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama ekstraksi taraf ke-j, pada ulangan ke -k

- μ = Rataan umum
- A_i = Pengaruh faktor jenis pelarut pada taraf ke- i
- B_j = Pengaruh faktor lama ekstraksi pada taraf ke- j
- $(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor jenis pelarut dan faktor lama ekstraksi pada faktor jenis pelarut taraf ke- i , faktor lama ekstraksi taraf ke- j
- ϵ_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor jenis pelarut taraf ke- i , faktor ke faktor lama ekstraksi taraf ke- j pada ulangan ke- k

Adapun model rancangan percobaan penelitian tahap pertama dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Model Rancangan Percobaan Penelitian Tahap Pertama
(A) Jenis Pelarut

Perlakuan	(A) Jenis Pelarut			
	A1 (n-Hexan)	A2 (Etil Asetat)	A3 (etanol)	
B Lama Ekstraksi	B1 (24 Jam)	(A1B1).1	(A2B1).1	(A3B1).1
		(A1B1).2	(A2B1).2	(A3B1).2
		(A1B1).3	(A2B1).3	(A3B1).3
	B2 (48 Jam)	(A1B2).1	(A2B2).1	(A3B2).1
		(A1B2).2	(A2B2).2	(A3B2).2
		(A1B2).3	(A2B2).3	(A3B2).3
	B3 (72 Jam)	(A1B3).1	(A2B3).1	(A3B3).1
		(A1B3).2	(A2B3).2	(A3B3).2
		(A1B3).3	(A2B3).3	(A3B3).3

3.2.2 Prosedur Penelitian

Pada penelitian tahap pertama, dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat (Widayanti, 2012). Pertama, *Chlorella vulgaris* kering (serbuk) dilarutkan menggunakan pelarut *n*-hexan dengan perbandingan 1:5 (b/v), setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27°C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B1), 48 jam (B2), dan 72 jam (B3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm (1537 G) pada suhu 10°C

selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan residu. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35°C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak *n*-hexan.

Hasil residu dari ekstraksi dengan pelarut non polar diekstrak kembali menggunakan pelarut etil asetat yang bersifat semi polar dengan perbandingan 1:5 (b/v), setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27°C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B1), 48 jam (B2), dan 72 jam (B3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm (1537 G) pada suhu 10°C selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan residu dan filtrat. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35°C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak etil asetat.

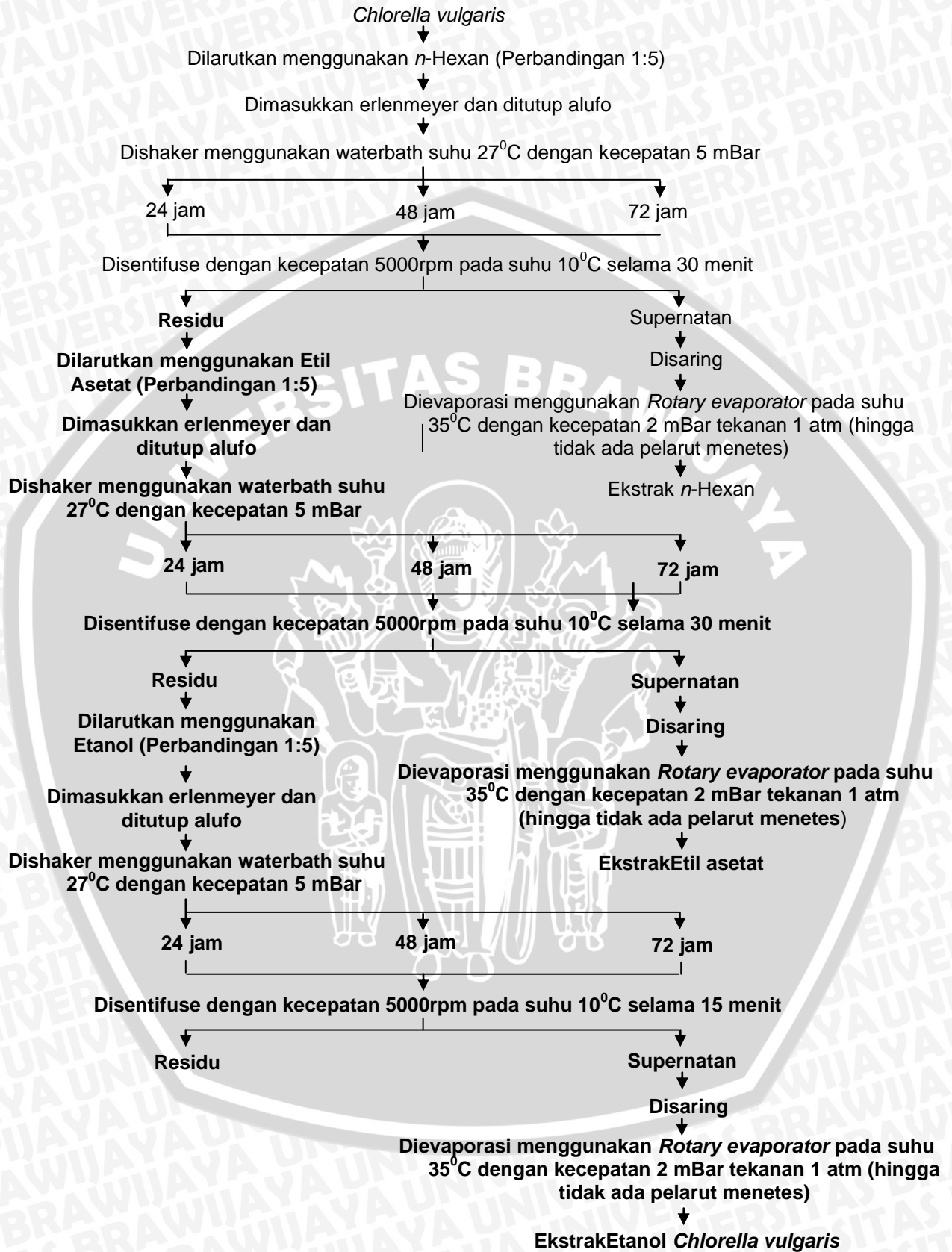
Hasil residu dari ekstraksi dengan pelarut semi polar diekstrak kembali menggunakan pelarut etanol yang bersifat polar dengan perbandingan yang sama yaitu 1:5 (b/v). setelah itu dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup dengan alufo, kemudian dishaker dalam waterbath dengan suhu 27°C dengan kecepatan 5 mBar. Perendaman dalam waterbath ini dilakukan dengan waktu yang telah ditentukan yaitu, 24 jam (B1), 48 jam (B2), dan 72 jam (B3). Setelah direndam kemudian disentrifuse dengan kecepatan 5000 rpm (1537 G) pada suhu 10°C selama 30 menit. Kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat dan residu. Adapun filtrat kemudian dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* suhu 35°C kecepatan 2 mBar tekanan 1 atm untuk mendapatkan ekstrak etanol.

Hasil sentrifuse kemudian dipisahkan, dimana endapan yang ada dibuang dan sisanya dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 35°C, kecepatan 2 Mbar dan tekanan 1 atm (hingga tidak ada lagi pelarut yang menetes). Setelah itu dilakukan penguapan menggunakan gas nitrogen dan

ditimbang sebagai berat akhir rendemen. Tahapan ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat dapat dilihat pada Gambar 4.

Tahap selanjutnya yakni uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui senyawa terkandung dalam ekstrak *Chlorella vulgaris*. Uji fitokimia meliputi flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, fenol dan steroid.

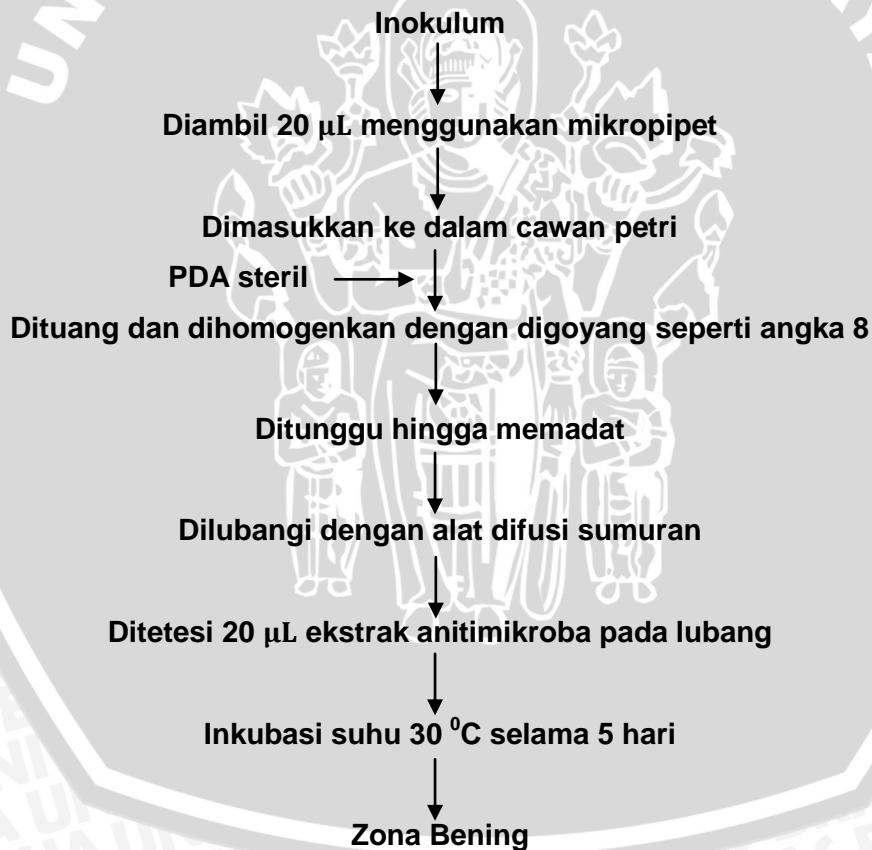




Gambar 3. Diagram Alir Tahap Pertama Ekstraksi *Chlorella vulgaris* dengan Metode Maserasi Bertingkat (Modifikasi Widayanti, 2012).



Gambar 4. Diagram Alir Pembuatan Suspensi Jamur.
(Widayanti, 2012).



Gambar 5. Diagram Alir Uji Aktivitas Antimikroba pada Jamur.
(Widayanti, 2012).

3.2.3 Parameter yang Diamati

Parameter pengamatan pada penelitian tahap pertama ini adalah mengetahui konsentrasi dan jenis pelarut terbaik berdasarkan diameter hambatan, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) (Bloomfield,1991). rendemen (Sudarmadji,1997), Uji Kualitatif fitokimia (Sulastris, 2011). Setelah itu di uji dengan metode LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) untuk menganalisa senyawa bioaktif ekstrak *Chlorella vulgaris*.

3.3 Penelitian Tahap kedua

Penelitian tahap kedua ini merupakan tahap penelitian utama yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama, pada penelitian tahap pertama bertujuan untuk konsentrasi dan jenis pelarut terbaik ekstrak *Chlorella vulgaris*. Kemudian pada penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap stabilitas anti jamur ekstrak *Chlorella vulgaris*.

3.3.1 Perlakuan dan Rancangan Percobaan Tahap kedua

Penelitian ini menggunakan sampel ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* (C) dari serbuk *Chlorella vulgaris* selanjutnya karakterisasi menjadi 4 taraf perlakuan derajat keasaman (pH) yaitu (C₁) pH 4, (C₂) pH 5, (C₃) pH 6, (C₄) pH 7, dan (C₅) pH 8.

Berdasarkan perlakuan yang diterapkan, maka penelitian ini dirancang menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) sederhana yang dilanjutkan dengan uji BNT (beda nyata terkecil) 3 kali ulangan.

Metode analisis yang digunakan adalah sidik ragam yang mengikuti model sebagai berikut :

$$Y_{ij}(t) = \mu + P(t) + \varepsilon(t)$$

Dimana :

$Y_{ij}(t)$ = nilai pengamatan pada baris ke- i dan kolom ke- j dengan perlakuan ke- t

μ = nilai rata-rata umum

$P(t)$ = pengaruh perlakuan ke- t (ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* pH 4, 5, 6, 7, 8)

$\epsilon(t)$ = pengaruh dari galat yang mendapat perlakuan ke- t

Model rancangan percobaan dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Model rancangan percobaan tahap kedua

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
C_1	$(C_1).1$	$(C_1).2$	$(C_1).3$
C_2	$(C_2).1$	$(C_2).2$	$(C_2).3$
C_3	$(C_3).1$	$(C_3).2$	$(C_3).3$
C_4	$(C_4).1$	$(C_4).2$	$(C_4).3$
C_5	$(C_5).1$	$(C_5).2$	$(C_5).3$

3.3.2 Prosedur Penelitian

➤ Karakterisasi pH pada Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris* (Naufalin *et al.*, 2007)

Penggunaan pH yang berbeda digunakan untuk mengetahui pH ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* yang terbaik untuk uji stabilitas antijamur. pH yang digunakan adalah pH 4, 5, 6, 7, dan 8. Dalam karakterisasi pH pada ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*, pertama-tama diukur pH awal ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*. Kemudian untuk meningkatkan nilai pH ditambahkan larutan basa yakni NaOH 0,1 N sedangkan untuk menurunkan pH ditambahkan larutan asam yakni HCl 0,1 N. Penambahan larutan buffer dilakukan sedikit demi sedikit hingga mendapatkan pH yang diinginkan. Dalam proses ini perlu dilakukan pengecekan pH secara berkala hingga mendapatkan pH yang sesuai.

Penentuan pH menurut Azizah *et al.* (2012), dilakukan dengan menggunakan pH meter, dengan cara sebagai berikut :

1. Menyalakan pH meter sampai diperoleh keadaan stabil selama 15 sampai 30 menit. Sampel sebanyak 10 g ditambah dengan 50 ml akuades dan kemudian diblender.
2. Elektroda pH meter dibilas dengan akuades dan dikeringkan. Kemudian pH meter dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan buffer pH7 lalu dikeringkan dengan tissue.
3. Elektroda dicelupkan kedalam larutan sampel dan nilai pH dapat diketahui setelah diperoleh pembacaan yang stabil dari pH meter.
4. Catat pH sampel.

3.3.3 Parameter yang diamati

Parameter pengamatan pada penelitian tahap kedua adalah mengetahui diameter hambat, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) (Modifikasi Kirby-Bauer, 1996).

3.4 Prosedur Analisis parameter

3.4.1 Rendemen (Sudarmadji, 1997)

Rendemen merupakan persentase akhir ekstrak kasar yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah bahan baku yang digunakan. Perhitungan rendemen dapat menggunakan rumus:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat akhir (g)}}{\text{Berat awal (g)}} \times 100\%$$

3.4.2 Uji Diameter Zona Hambat, *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), *Minimum Fungicidal Concentration* (MFC) (Bloomfield, 1991)

Langkah awal yang dilakukan pada uji difusi sumuran yaitu menyiapkan media pertumbuhan jamur uji. Media yang digunakan yaitu media PDA untuk menumbuhkan jamur *Aspiggillus niger*. Biakan murni jamur *Aspiggillus niger* dengan kepadatan 10^8 koloni/mL koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas

Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Peremajaan jamur *Aspurgillus niger* dilakukan dengan cara menanam pada media PDA miring. Kemudian hasil penanaman pada PDA miring dipanen dan diambil menggunakan kawat ose lalu dimasukkan ke dalam media PDB. Kemudian campuran jamur tadi dihomogenkan dan di inkubasi selama 5 hari dengan suhu 30°C.. Kemudian inokulum jamur ditanam dengan metode tuang.

Media padat yang bercampur jamur uji, dibuat sumuran menggunakan besi pelubang berdiameter 5,5 mm. Pada sumuran tersebut dilakukan berbagai uji untuk mengetahui aktivitas penghambatan larutan uji terhadap jamur uji. Larutan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol *Chlorella vulgaris* dengan berbagai pH yaitu pH 4, 5, 6, 7 dan 8. Kemudian ekstrak etanol *Chlorella vulgaris* dengan berbagai pH dibuat konsentrasi 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm, 4000ppm dan 5000ppm dimasukkan dalam lubang sumuran menggunakan *micro pipet* pada PDA yang berisi jamur dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam. Diamati dan diukur zona penghambatan yang terdapat pada masing-masin daerah lubang sumuran. Pengukuran zona penghambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar lubang sumuran dengan jangka sorong. Penghambatan pertumbuhan jamur uji oleh ekstrak sampel yang memiliki kandungan anti jamur terlihat zona bening yang tidak ditumbuhi oleh jamur uji. Diameter hambat = Diameter zona bening – lubang difusi sumuran (mm)

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Baktericidal Concentration*), istilah bakterisida digunakan untuk bakteri atau MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) istilah fungisida digunakan untuk jamur ditentukan menurut Bloomfield (1991). MIC dan MFC didapatkan dengan menggambar kerva dengan In Mo (Konsentrasi ekstrak *Chlorella vulgaris*) pada sumbu X terhadap Z² (diameter penghambatan dikuadratkan) pada sumbu Y. Perpotongan

disebut Mt. MIC dihitung dengan cara $0,25 \times Mt$. Dan MFC dihitung dengan cara $4 \times MIC$.

3.4.3 Uji Kualitatif Fitokimia (Sulastris, 2011).

Uji fitokimia ini digunakan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang ada pada ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan metode ekstraksi bertingkat. Uji fitokimia ini meliputi uji tanin, alkaloid, plavonoid, saponin, steroid, dan fenol.

3.4.3.1 Uji Tanin

Sampel sebanyak 1 g dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 5 tetes NaCl 10% kemudian disaring. Filtrat dibagi dalam 3 bagian yaitu, A, B dan C. Filtrat A sebagai blanko, B ditambahkan 3 tetes pereaksi $FeCl_3$ dan filtrat C ditambahkan garam gelatin. Jika terjadi perubahan maka senyawa tanin terdeteksi positif namun jika tidak ada perubahan maka sampel tidak mengandung senyawa tanin.

3.4.3.2 Uji Alkaloid

Sebelum dilakukan uji alkaloid, ekstrak sebanyak 1 g dilarutkan dalam 5 tetes sulfat 2 N dan dihomogenkan. Kemudian dilakukan pengujian dengan 3 pereaksi alkaloid yaitu, pereaksi Meyer, Dragendorff, dan Wagner. Hasil uji dianggap positif mengandung alkaloid apabila endapan berwarna putih kekuningan dengan pereaksi Meyer, endapan berwarna merah jingga apabila ditambahkan pereaksi Dragendorff, dan endapan berwarna coklat jika ditambahkan pereaksi Wagner.

3.4.3.3 Uji Flavonoid

Sampel ekstrak sebanyak 1 gram dimasukkan kedalam tabung reaksi dan ditambahkan 4 mL alkohol, 0,4 mL asam klorida (campuran etanol 95% dan asam klorida 37%) dan 0,1 mg serbuk magnesium. semua bahan dicampurkan dan dihomogenkan. Adanya kandungan flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol.

3.4.3.4 Uji Saponin

Uji saponin dideteksi dengan terbentuknya busa pada sampel yang dicelupkan dalam air panas. Pengujian senyawa saponin ini dilakukan dengan menambahkan 1 tetes HCl 2 N kedalam 1 g ekstrak *Tetraselmis chunii*. Busa yang stabil selama 30 menit dan tidak hilang menunjukkan adanya saponin dalam sampel.

3.4.3.5 Uji Steroid

Pengujian steroid diidentifikasi terhadap warna yang terbentuk. Sampel sebanyak 1 g dimasukkan kedalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 2 mL kloroform. Ditambahkan 3 tetes asam sulfat dan 10 tetes anhidra asetat, kemudian dihomogenkan. Pengujian dinyatakan positif jika terbentuk warna merah terlebih dahulu kemudian berubah menjadi warna biru dan hijau.

3.4.3.6 Uji Fenol

Uji fenol dilakukan dengan menyiapkan 1 g ekstrak sampel yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 2 tetes larutan FeCl_3 5%. Diamati perubahan yang terjadi, jika muncul warna hijau atau hijau biru menunjukkan adanya senyawa fenol dalam sampel.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama

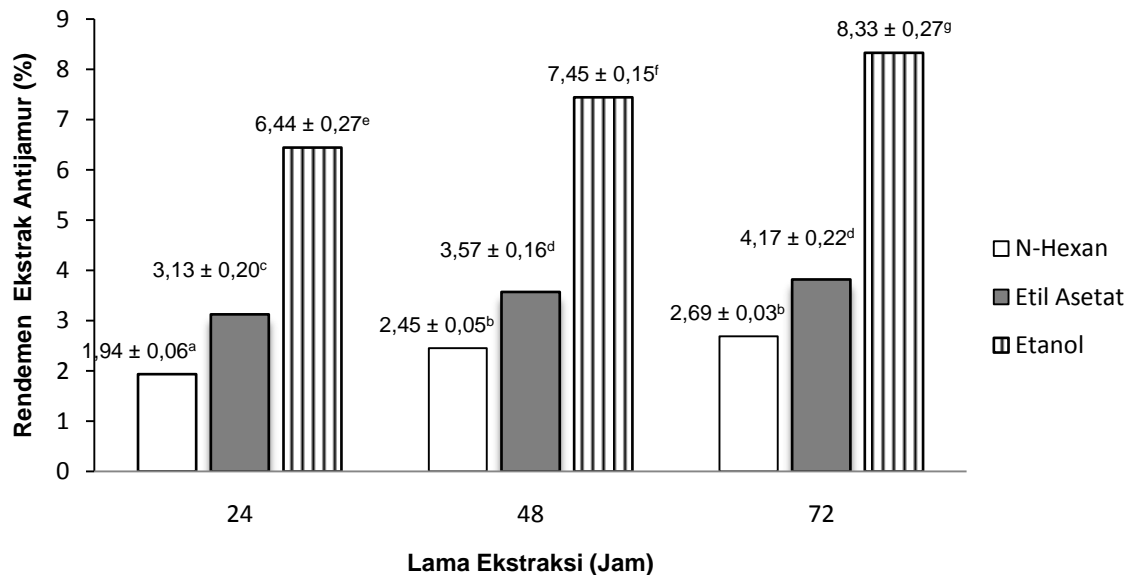
Penelitian tahap pertama, dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi bertingkat yang bertujuan untuk mengetahui rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* yang kemudian dilanjutkan dengan menentukan konsentrasi dan jenis pelarut terbaik berdasarkan diamter hambat, dilakukan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur uji dan untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh jamur uji, setelah itu diuji dengan metode LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) yang bertujuan untuk menganalisa senyawa bioaktif ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*, dan uji kualitatif fitokimia.

4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris*

Ekstraksi senyawa aktif dari mikroalga *Chlorella* sp. dengan menggunakan pelarut bertujuan untuk memperoleh hasil yang optimal baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang dikandung ekstrak. Dalam ekstraksi senyawa antibakteri *Chlorella* sp. diperlukan waktu ekstraksi yang tepat agar diperoleh zat aktif dengan rendemen yang besar dan mempunyai aktivitas yang baik untuk menghentikan pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri penyebab kerusakan pangan (Wenno *et al.*, 2010). Penelitian ini menggunakan dua faktor yang mempengaruhi hasil ekstrak *Chlorella vulgaris*, yakni jenis pelarut dan waktu ekstraksi.

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rata-rata rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* didapatkan hasil sebesar 1,94% – 8,33%. Hasil analisa keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh

nyata terhadap rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut rendemen dengan Duncan's (lampiran 1), dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*

Keterangan:

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan Gambar 6. Hasil uji lanjut didapatkan pada jenis pelarut n-hexan dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam tidak berbeda nyata dengan jenis pelarut etil asetat dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam. Pada jenis pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam berbeda nyata dengan jenis pelarut n-hexan dan etil asetat dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam. Rendemen menggambarkan efektifitas suatu pelarut terhadap bahan dalam suatu sistem, tetapi tidak menunjukkan tingkat aktivitas ekstrak. Berdasarkan data di atas, ekstraksi menggunakan etanol memiliki nilai rendemen ekstrak yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat maupun ekstrak n-hexan. Pelarut etanol merupakan salah satu pelarut terbaik dalam ekstraksi yang dapat mengekstrak sebagian besar komponen sel mikroalga termasuk komponen gula, asam amino, garam, protein hidrofobik, dan pigmen (Grima *et al.*, 2004). Selain itu etanol memiliki nilai

polaritas yang sesuai untuk mengekstrak sebagian besar komponen dalam sel mikroalga *Chlorella vulgaris*.

Selain polaritas komponen dalam sel *Chlorella vulgaris*, dinding sel mikroalga tersebut juga mempengaruhi rendemen hasil ekstrak antimikroba yang didapatkan. Etanol memiliki rendemen paling tinggi dimungkinkan karena memiliki nilai polaritas yang sesuai untuk mempengaruhi permeabilitas dinding sel *Chlorella vulgaris*, sehingga mampu mengekstrak komponen senyawa didalam sel. Ekstrak yang dihasilkan merupakan hasil ekstrak kasar yang belum mengalami tahap pemurnian. Pada umumnya, ekstraksi menggunakan pelarut tidak dapat menghasilkan komponen yang diinginkan secara sempurna, kecuali dilanjutkan dengan tahap pemurnian. Hal ini terjadi karena komponen lain yang tidak dikehendaki juga ikut terekstraksi dan sulit untuk dipisahkan. Akibatnya ekstrak yang diperoleh merupakan suatu campuran dengan komponen lain, seperti asam-asam lemak, pigmen, dan vitamin (Sa'id, 1993).

Waktu mempengaruhi rendemen sebab semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka bahan yang terekstrak semakin meningkat pula, namun dengan rasio tertentu antara bahan dan pelarut yang digunakan dapat menciptakan kondisi larutan yang jenuh sehingga penambahan waktu ekstraksi juga tidak memberikan efek peningkatan rendemen (Spigno dan De Faveri, 2007). Menurut Komara (1991), penambahan waktu ekstraksi pada larutan yang telah mencapai titik jenuh tidak memberikan hasil ekstrak yang lebih baik, bahkan merupakan suatu pemborosan.

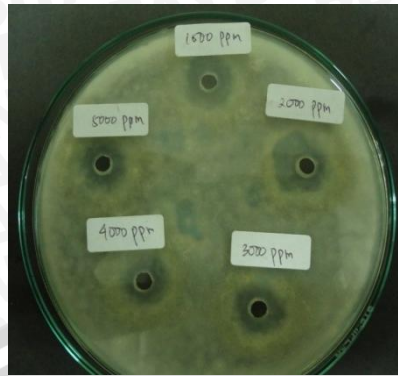
Pelarut-pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi menghancurkan membran sel dan melarutkan pigmen yang terkandung dalam bahan sehingga menghasilkan warna tersebut (Shahidi dan Naczki 1995). Pelarut non polar misalnya heksana mampu mengekstrak hidrokarbon, asam lemak, asetogenin, dan terpen. Pelarut semi polar misalnya etil asetat mampu mengekstrak senyawa

fenol dan terpenoid. Pelarut polar misalnya metanol mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, dan tanin (Harborne 1987). Ekstrak-heksana yang berwarna kuning kecoklatan diduga karena kandungan karotenoid. Karotenoid adalah pigmen berwarna kuning, jingga, atau merah yang terdapat di berbagai macam plastid berwarna (kromoplas) (Salisbury dan Ross 1995). Pigmen warna ini mudah diekstraksi dalam pelarut lipid seperti heksana, kloroform. Demikian juga ekstrak-etil asetat yang berwarna kecoklatan diduga karena kandungan karotenoid.

4.1.2 Aktivitas Antijamur Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris* Terhadap *Aspergillus niger*.

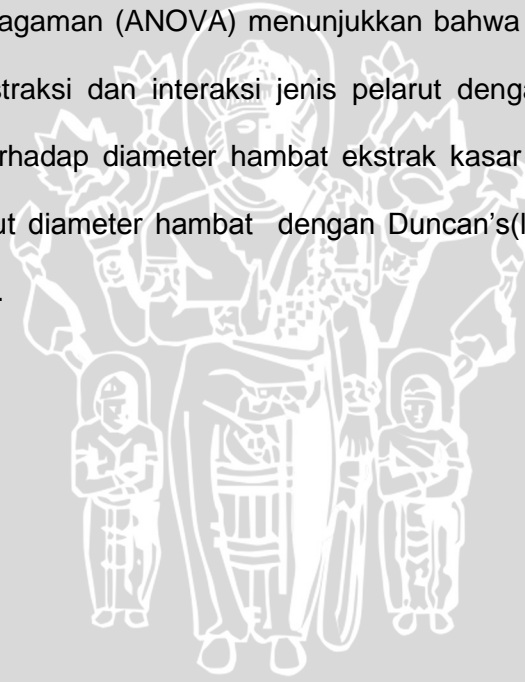
Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada cawan berisi *A. Niger*. Mikroorganisme tersebut dipilih karena bersifat patogen pada manusia. Setiap ekstrak dari masing-masing perlakuan menunjukkan diameter zona bening yang berbeda. Ekstrak yang ditambahkan pada lubang sumuran adalah 20 μ L untuk jamur. Selain itu, mikroorganisme yang berbeda akan menunjukkan tingkat sensitifitas yang berbeda terhadap ekstrak yang diberikan.

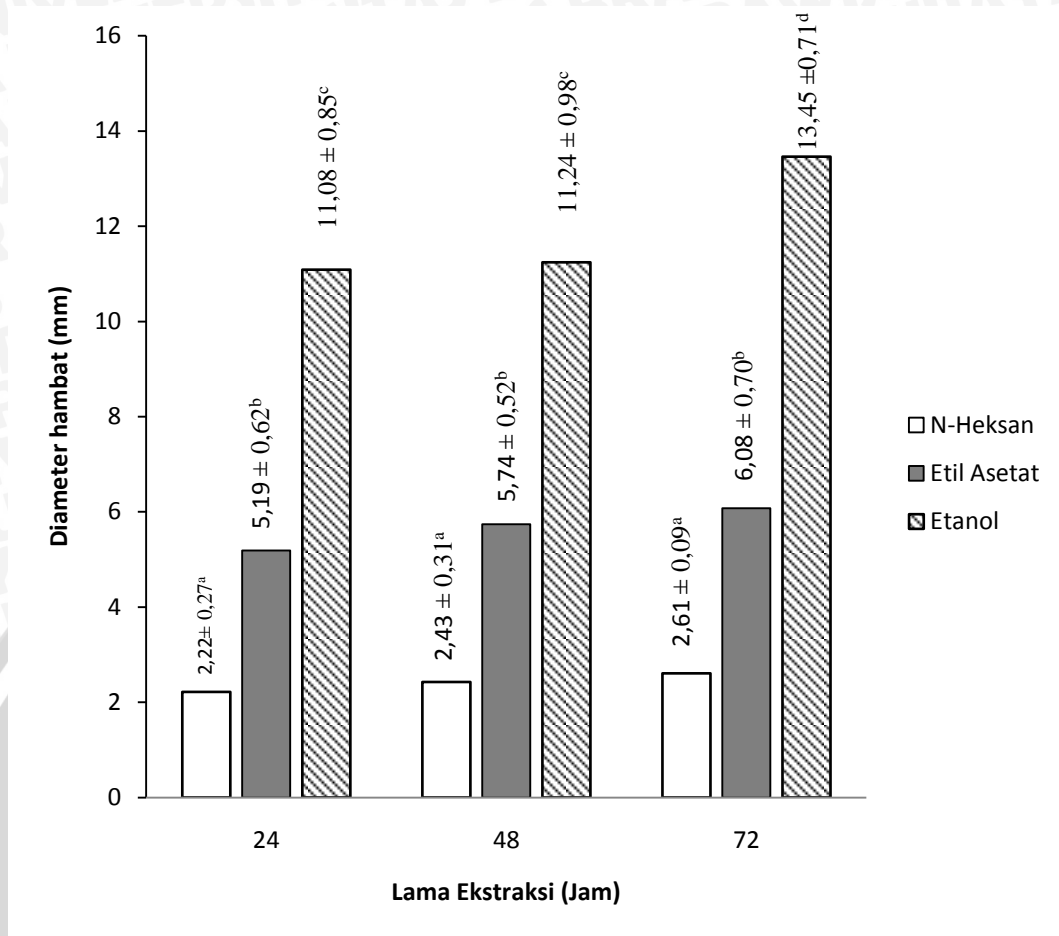
Hasil diamer zona bening dari ekstrak dengan dengan pelarut yang sama menunjukkan peningkatan seiring dengan peningkatan waktu ekstraksi. Semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka senyawa bioaktif yang berperan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme pun juga akan meningkat. Selain itu, tiap mikroorganisme juga menunjukkan respon antimikroba yang berbeda untuk tiap ekstrak dengan perlakuan yang sama. Hasil diameter hambat, dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Hasil diameter hambatan ekstrak kasar etanol 72 jam pada konsentrasi 1000ppm, 2000ppm, 3000ppm, 4000ppm, 5000ppm

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rata-rata diameter hambatan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* didapatkan hasil sebesar 2,22mm – 13,45 mm. Hasil analisa keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata terhadap diameter hambatan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut diameter hambatan dengan Duncan's (lampiran 3), dapat dilihat pada Gambar 8.





Gambar 8. Diameter hambatan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* konsentrasi 5000 ppm

Keterangan:

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan Gambar 8. Hasil uji lanjut didapatkan pada jenis pelarut n-hexan dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam berbeda nyata dengan jenis pelarut etil asetat dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam. Pada jenis pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam berbeda nyata dengan jenis pelarut n-hexan dan etil asetat dengan lama waktu ekstraksi 24 jam, 48 jam, 72 jam. Perbedaan diameter daya hambatan yang dihasilkan dipengaruhi oleh kemampuan mikroorganisme dalam merespon senyawa antimikroba yang diberikan. Ketahanan tiap mikroorganisme yang berbeda ini disebabkan oleh morfologi atau sifat fisiologis dari masing-masing

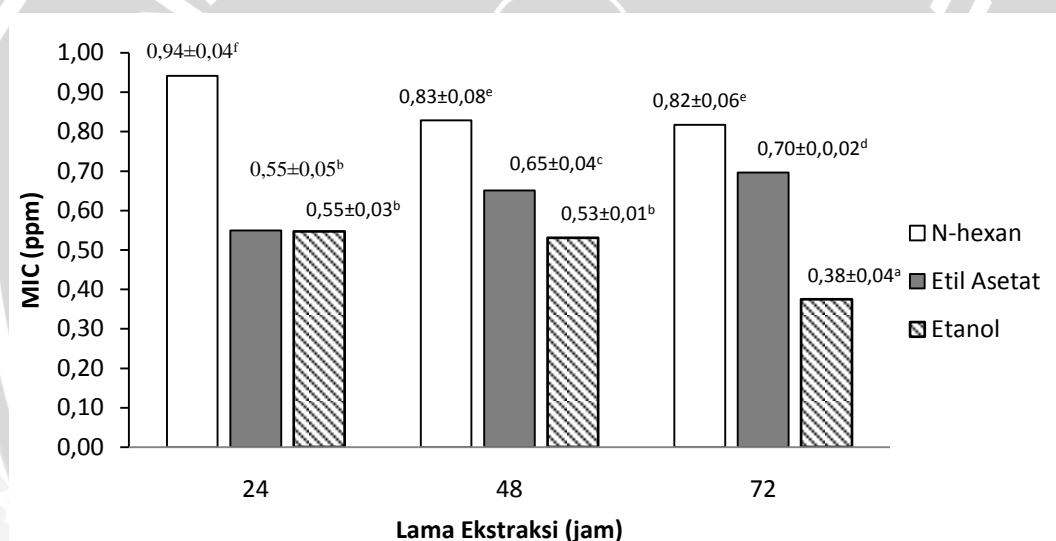
mikroorganisme tersebut berbeda (Widayanti,2012). Ekstraksi senyawa aktif dari mikroalga *Clorella* sp. dengan menggunakan pelarut bertujuan untuk memperoleh hasil yang optimal baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang dikandung ekstrak. Dalam ekstraksi senyawa antibakteri *Clorella* sp. diperlukan waktu ekstraksi yang tepat agar diperoleh zat aktif dengan rendemen yang besar dan mempunyai aktivitas yang baik untuk menghentikan pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri penyebab kerusakan pangan (Wenno *et al.*, 2010). Menurut Khamidah (2013) hasil uji fitokimia ekstrak metanol mikroalga *Chlorella* sp. adalah golongan senyawa steroid dan tanin. Menurut Morin dan Gorman (1995) senyawa steroid memiliki struktur lipofilik yaitu senyawa yang larut dalam lemak. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel mikroba yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel mikroba rapuh dan lisis. Akibat lisis dari membran sel, senyawa yang terdapat dalam sitoplasma (seperti: inti sel, mesosom, protein dan lain-lain) akan keluar sehingga mengakibatkan kematian bakteri.

4.1.3 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) Tahap Pertama.

Pada tahap pertama nilai MIC dan MFC dilakukan dengan menggunakan berbagai macam konsentrasi ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dari perlakuan jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat atau membunuh jamur *Aspergillus niger*. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan nilai MFC adalah konsentrasi minimum pertumbuhan dalam arti konsentrasi minimum ekstrak yang dapat

membunuh jamur uji (Fitrial *et al.*, 2008). Berikut adalah Konsentrasi Hambatan Minimum (KHM/MIC) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM/MFC) ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger* dapat dilihat pada Gambar 9 dan Gambar 10.

Hasil analisa keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi dan lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata terhadap MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dengan jenis pelarut dan lama waktu berkisar antara 0,38ppm hingga 0,94ppm. Hasil uji lanjut MIC dengan Duncan's (lampiran 7), dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger*

Keterangan:

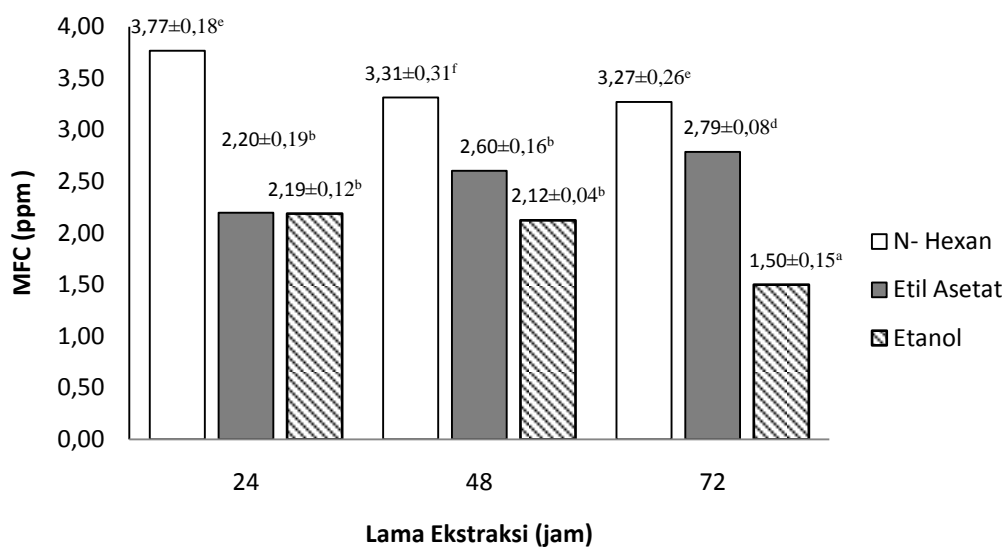
Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji Duncan's diketahui bahwa perlakuan pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata terhadap pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata pada perlakuan pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat 24 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam,

namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam tidak berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam, dan 72 jam.

Berdasarkan Gambar 8. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terendah didapat pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 0,38 ppm dan MIC tertinggi terdapat pada perlakuan menggunakan pelarut n-Hexa dengan lama ekstraksi 24 Jam yaitu sebesar 0,94 ppm. Adapun yang dimaksud dari MIC itu sendiri adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Jadi, semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan mikroba semakin baik, namun jika nilai MIC semakin tinggi maka konsentrasi untuk menghambat pertumbuhan mikroba semakin rendah (Andrews, 2001).

Hasil analisa keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi dan lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata terhadap MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dengan jenis pelarut dan lama waktu berbeda berkisar antara 1,50 ppm hingga 3,77 ppm. Hasil uji lanjut MFC dengan Duncan's (lampiran 8), dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger*

Keterangan:

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji Duncan's diketahui bahwa perlakuan pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 24 jam tidak berbeda nyata terhadap pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 48 jam, namun berbeda nyata pada perlakuan pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat 24 jam berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata pada perlakuan lama ekstraksi 72 jam. Berdasarkan Gambar 9. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* tertinggi didapat pada perlakuan pelarut n-Hexan dengan lama ekstraksi 24 Jam yaitu sebesar 3,77ppm dan MFC terendah terdapat pada perlakuan menggunakan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 1,50ppm. Dari hasil nilai MIC dan MFC tersebut

memungkinkan karena mekanisme kerja dari kandungan ekstrak *Chlorella vulgaris* dalam penghambatan pertumbuhan jamur mungkin melalui perusakan permeabilitas membran sel. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kebocoran sehingga komponen-komponen penting di dalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain dapat mengalir keluar. Hal ini menyebabkan permeabilitas sel terganggu sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup dan pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Pertumbuhan miselium *Aspergillus niger* terhambat pada 2,5 dan 3,0 mg/ml pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terendah untuk membunuh jamur. Perubahan utama diamati di bawah cahaya dan elektron scanning mikroskop menunjukkan kehilangan sitoplasma di hifa jamur, dan tunas dari ujung hifa. Dinding hifa dan diameter menjadi nyata tipis, menyimpang dan mengakibatkan gangguan dinding sel (Sharma dan Tripathi, 2006).

4.1.4 Uji Kualitatif Fitokimia

Pengujian komponen bioaktif pada *Chlorella vulgaris* menggunakan metode fitokimia dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya komponen bioaktif dalam sampel *Chlorella vulgaris* yang berpotensi sebagai antimikroba. Uji kualitatif fitokimia ini hanya diperoleh berdasarkan golongan senyawa yang diujikan. Golongan senyawa yang diuji meliputi uji alkaloid, fenolik, steroid dan triterpenoid, flavonoid, tanin, dan saponin. Menurut Widyawati (2011), kandungan dan kadar senyawa fitokimia yang berbeda akan mempengaruhi aktivitas bioaktifnya. Senyawa fitokimia dapat diekstrak dengan pelarut yang sesuai. Tingkat kepolaran pelarut menentukan komponen senyawa fitokimia yang terekstrak. Hasil uji kualitatif fitokimia dapat dilihat pada tabel 6.

Tabel 4. Uji kualitatif fitokimia ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*

Golongan Senyawa	Hasil Pengujian
Alkaloid	+
Flavonoid	-
Tanin	+
Steroid	+
Saponin	-
Fenol	+

Keterangan :

Tanda (+) = terdapat senyawa bioaktif

Tanda (-) = tidak terdapat senyawa bioaktif

Berdasarkan hasil uji fitokimia pada tabel 10. Menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella vulgaris*, menunjukkan hasil positif pada uji senyawa alkaloid ditunjukkan dengan pereaksi Mayer terbentuk warna putih, peraksi Wagner terbentuk warna coklat dan pereaksi Dragendorf terbentuk warna jingga. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antimikroba diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroba, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Bowo et al., 2009).

Pada sampel *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa tanin dengan terbentuknya warna jingga. Tanin adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang memiliki kemampuan untuk mengendapkan protein dengan membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (harborne, 1987). Menurut Khamidah (2013) hasil uji fitokimia ekstrak metanol mikroalga *Chlorella sp.* adalah golongan senyawa steroid dan tanin.

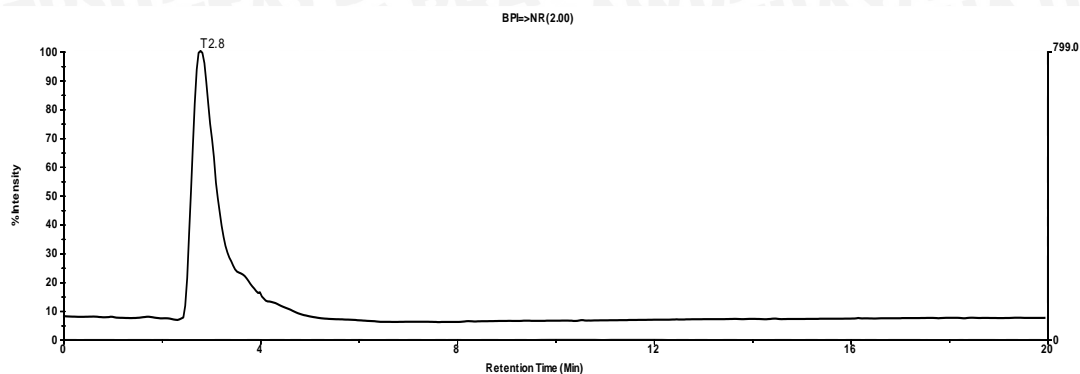
Pada sampel *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa steroid dengan terbentuknya warna hijau bening. Menurut Morin dan Gorman (1995) senyawa steroid memiliki struktur lipofilik yaitu senyawa yang larut dalam lemak. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel mikroba yang bersifat

permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel mikroba rapuh dan lisis. Akibat lisis dari membran sel, senyawa yang terdapat dalam sitoplasma (seperti: inti sel, mesosom, protein dan lain-lain) akan keluar sehingga mengakibatkan kematian bakteri.

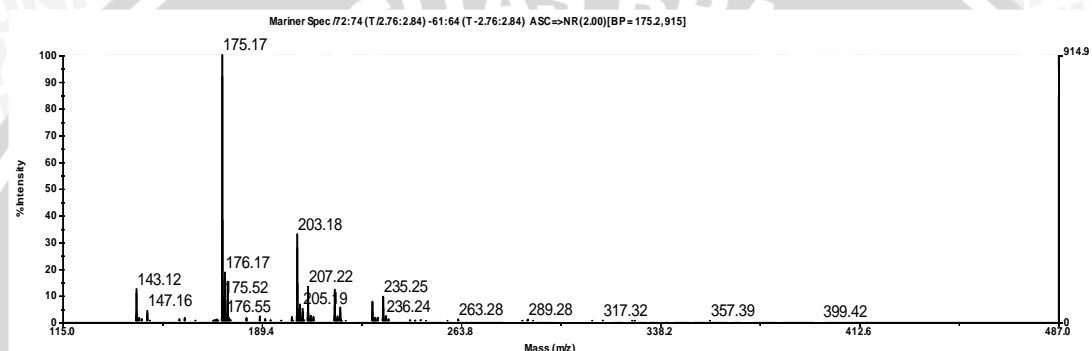
Pada sampel *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa fenol dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau 2 gugus hidroksil. Feneol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida atau terdapat dalam vakuola sel. Senyawa fenol diduga mempunyai aktifitas antioksidan, antitumor, antirival, dan antibiotik (Harborne, 2006). Flavonoid berupa senyawa fenol, oleh karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau amoniak. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel mikroba dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria *et al.*,2009).

4.1.5 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LC-MS

Uji LCMS – ESI (*Electrospray Ionisation*) ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang Selatan. Pengujian LCMS – ESI bertujuan untuk mengidentifikasi berat molekul dari bioaktif pada *Chlorella vulgaris*. Hasil pengujian LCMS menunjukkan satu retensi waktu yang diperoleh yaitu 2,8. Senyawa yang diidentifikasi dari retensi waktu tersebut menghasilkan satu puncak tertinggi yaitu pada *centroid mass* 175.165 dengan *relative intensity* 100. Analisis senyawa-senyawa antibakteri dengan metode uji LC-MS (Lampiran 10) ditampilkan pada Gambar 11 dan Gambar 12.



Gambar 11. Hasil Kromatogram uji LC (*Liquid Chromatography*) ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*



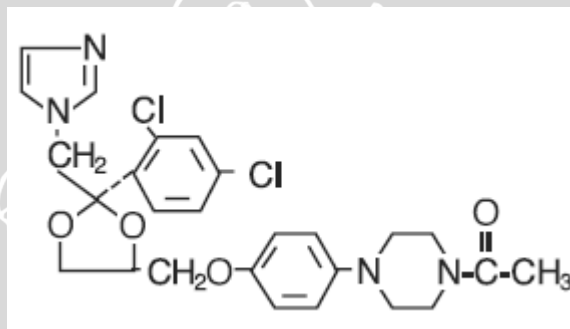
Gambar 12. Hasil kromatogram uji MS (*Mass Spectrometry*) ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*

Uji LC-MS ini menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (MeOH). Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$. Dugaan senyawa didapatkan dari massa ion ditambahkan muatan pelarut yang digunakan dan di lihat pada *mass bank* (www.massbank.jp) kemudian akan muncul senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*. Berikut adalah dugaan senyawa terekstrak yang berfungsi sebagai antimikroba dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Dugaan pecahan ion molekul Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris*

Parameter uji	Hasil pengujian
<i>Retensi Time</i>	2,8
<i>Massa ion(m/z)</i>	177,17
Dugaan Senyawa	Ketoconazole
Rumus Molekul	$\text{CH}_{26}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_4$
Golongan	Azole

Senyawa yang terdeteksi menggunakan LC-MS dari ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* pada waktu retensi 2,8 yang terdapat pecahan senyawa yang berfungsi sebagai antijamur yaitu Ketoconazole. Struktur molekul dari ketoconazole dapat dilihat pada Gambar 12.

**Gambar 13. Struktur molekul Ketoconazole**

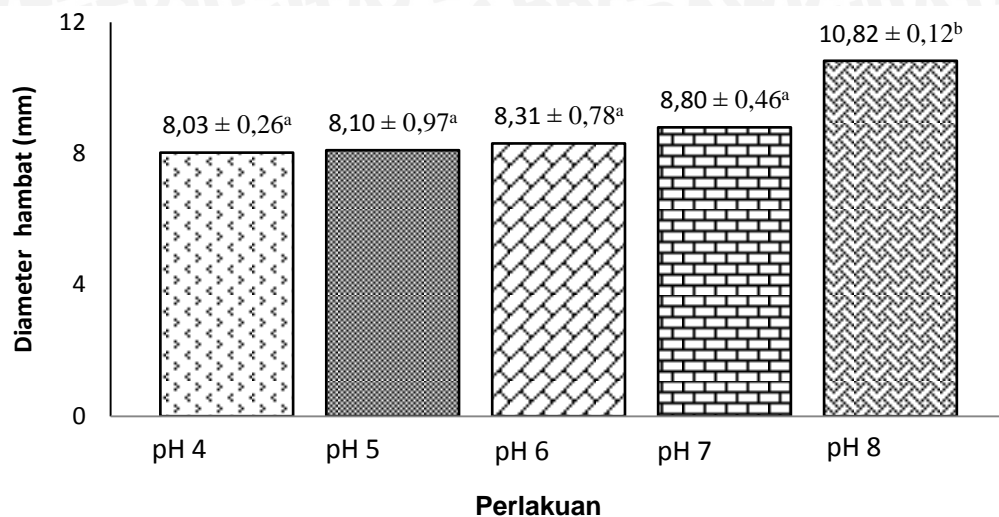
Ketoconazole merupakan obat anti jamur yang termasuk golongan azole. Obat jenis ini menghambat pertumbuhan jamur dengan menghambat enzim pertumbuhan pada jamur. Obat golongan azole ini umumnya dipakai untuk mengatasi infeksi jamur *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.parapsilosis*, *C.glabrata*, *C.neoformans*, golongan *blastomyces*, golongan *histoplasma*, *Coccidioides*, dan jamur lainnya (Priyono,2014). Ketoconazole digunakan untuk pengobatan dermatofitosis, pitiriasis versikolor, kutanieus kandidiasis dan dapat juga untuk pengobatan seborrheic dermatis. Untuk pengobatan infeksi jamur pada kulit digunakan ketoconazole konsentrasi 1% (Lubis, 2008).

4.2 Penelitian Tahap Kedua

4.2.1 Pengaruh pH terhadap Stabilitas antijamur

Penelitian tahap kedua ini merupakan tahap penelitian utama yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama yaitu konsentrasi dan jenis pelarut terbaik dari ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*. Kemudian pada penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap stabilitas anti jamur ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*. pH awal dari ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* adalah 8,87. Kemudian untuk meningkatkan nilai pH ditambahkan larutan basa yakni NaOH 0,1 N sedangkan untuk menurunkan pH ditambahkan larutan asam yakni HCl 0,1 N. Penambahan larutan buffer dilakukan sedikit demi sedikit hingga mendapatkan pH yang diinginkan. Dalam proses ini perlu dilakukan pengecekan pH secara berkala hingga mendapatkan pH yang sesuai (Naufalin *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rata-rata diameter hambatekstrak kasar *Chlorella vulgaris* dengan perlakuan pH didapatkan hasil sebesar 8,03 mm sampai 10,82 mm. Hasil analisa keragaman (ANOVA) menunjukkan bahwa perlakuan pH berpengaruh nyata terhadap diameter hambat ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut rendemen dengan BNT pada (lampiran 10), dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Daya hambatan ekstrak kasar etanol 72 jam *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus Niger* dengan perlakuan pH konsentrasi 5000 ppm

Keterangan:

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil uji lanjut didapatkan pada perlakuan pH 4 tidak berbeda nyata dengan pH 5, pH 6 dan pH 7. Namun pH 8 terlihat berbeda nyata dengan pH 4, pH 5, pH 6 dan pH 7. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan daya hambatan tertinggi ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger* adalah pada pH 8. pH memiliki peran penting dalam kelangsungan hidup *Aspergillus niger*. Menurut Ananda (2009), keberhasilan cendawan entomopatogen dalam mengkolonisasi inang di alam bergantung pada jumlah propagul cendawan. Terdapat beberapa faktor abiotik (lingkungan) yang menentukan pertumbuhan dan kelangsungan hidup cendawan di alam diantaranya suhu, pH, dan kandungan bahan kimia air dalam hal ini ialah kaporit.

Berdasarkan gambar di atas, daya hambatan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger* dengan perlakuan pH 8 memiliki daya hambatan yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan pH yang lain dengan nilai rerata 10,94 mm. Hal ini menandakan bahwa pH 8 adalah pH yang efektif dan

stabil untuk menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* sesuai dengan hasil penelitian dari Andersen *et al*, (2009) yang menerangkan bahwa *Aspergillus niger* dapat tumbuh dengan baik pada pH 3 – 6. Sehingga untuk dapat menghambat pertumbuhan *Aspergillus niger* diperlukan pH di luar batasan tersebut. Sedangkan menurut Trismilah dan Sumaryanto (2012), kisaran pH kapang *Aspergillus niger* adalah sebagaiberikut.

Tabel 5. Kisaran pH kapang *Aspergillus niger*

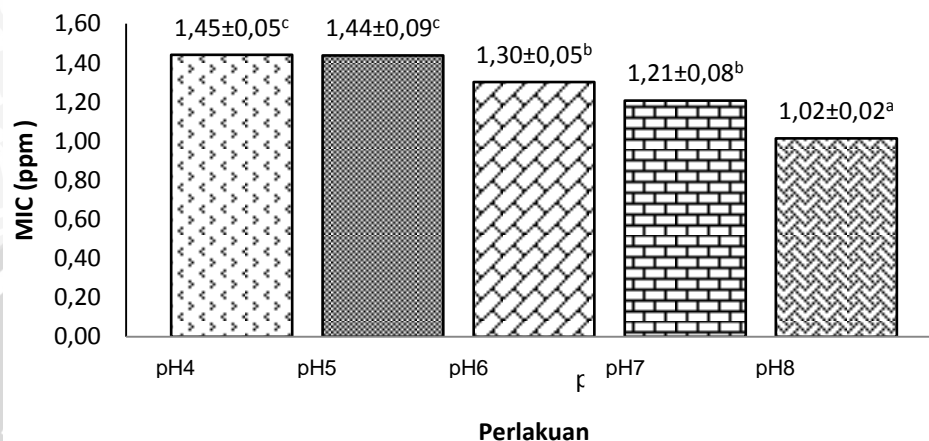
Jenis Mikroba	pH optimum	T (0C) optimum	BM x103
<i>B. subtilis</i>	5,3 – 6,4	50	47
<i>B. licheniformis</i>	5 – 8	76	22
<i>B.stearothermo phillus</i>	4,6 – 5,1	55 - 70	48
<i>B.coagulans</i>	7,5 – 8,5	85	-
<i>Mucor pusillus</i>	3,5 - 4	65-70	48
<i>Aspergillus oryzae</i>	5,5 – 5,9	40	52,6
<i>Aspergillus niger</i>			
1. Tahan asam	3,5 – 6,5	50	58
2. Tidak tahan asam	5 - 6	35	61

4.5.2 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) Tahap kedua.

Uji MIC dan MFC tahap keduadilakukan dengan menggunakan berbagai macam konsentrasi ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*terbaik pada tahap pertama yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat atau membunuh jamur *Aspergillus niger*. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan jamur uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan nilai MFC adalah konsentrasi minimum pertumbuhan dalam arti konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh jamur uji (Fitrial *et al.*, 2008).

Hasil MIC ekstrakkasar *Chlorella vulgaris*terhadap kapang *Aspergillus niger* dengan perlakuan pH pada tahap kedua berkisar antara 1.02ppm hingga

1,45ppm. Hasil uji lanjut MIC dengan BNT pada (lampiran 16), dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger* dengan perlakuan pH

Keterangan:

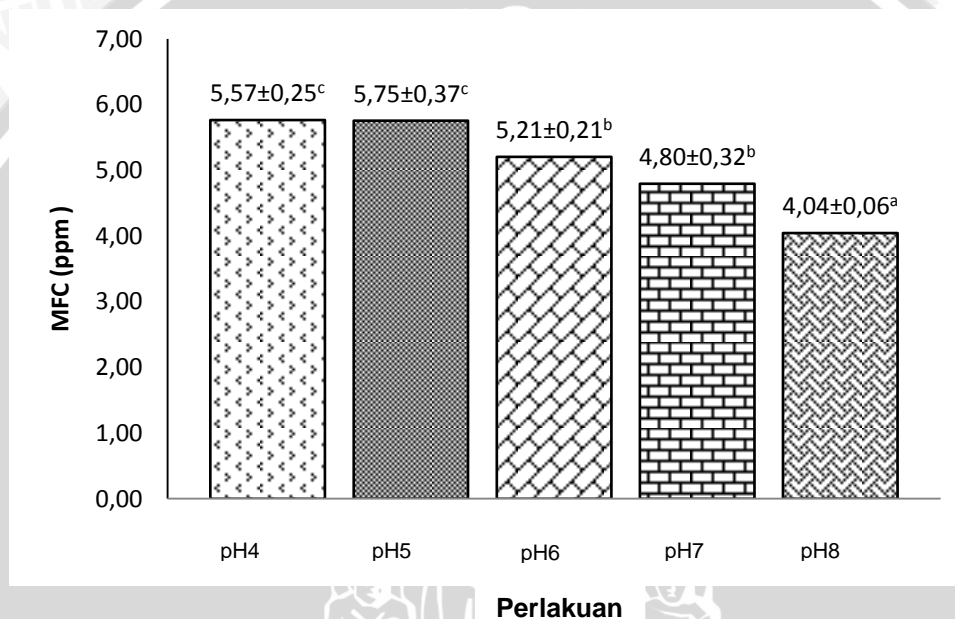
Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) diketahui bahwa perlakuan pH 4, 5, 6, dan 7 tidak berbeda nyata. Namun, pada pH 8 berbeda nyata terhadap pH 4, 5, 6, dan 7. Penentuan nilai MIC didasarkan pada nilai konsentrasi terendah yang didapat pada perlakuan pH terhadap kapang *Aspergillus niger*. Dengan kata lain, pada pH 8 mampu menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* karena pada pH ini didapat nilai MIC terkecil yaitu sebesar 1,02ppm.

Berdasarkan Gambar 15. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* tertinggi didapat pada perlakuan pH 4 yaitu sebesar 1,45ppm dan MIC terendah terdapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 1,02ppm. Adapun yang dimaksud dari MIC itu sendiri adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Jadi,

semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan mikroba semakin baik (Andrews, 2001).

Selanjutnya, hasil MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger* dengan perlakuan pH pada tahap kedua ini berkisar antara 4,04ppm hingga 5,57ppm. Hasil uji lanjut MFC dengan BNT (lampiran 17), dapat dilihat pada Gambar 16.



Gambar 16. MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger* dengan perlakuan pH

Keterangan:

Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Berdasarkan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) diketahui bahwa perlakuan pH 4, 5, 6 dan 7 tidak berbeda nyata. Tetapi berbeda nyata terhadap perlakuan pH 8.. Pada perlakuan pH 8 berbeda nyata terhadap semua perlakuan pH yang diberikan yaitu pH 4, 5, 6, dan 7. Berdasarkan Gambar 16. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. MFC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* tertinggi didapat pada perlakuan pH 4 yaitu sebesar 5,57ppm dan

MFC terendah terdapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 4,04 ppm. Dari hasil nilai MIC dan MFC tersebut memungkinkan karena mekanisme kerja dari kandungan ekstrak *Chlorella vulgaris* dalam penghambatan pertumbuhan mikroba mungkin melalui perusakan permeabilitas membran sel. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kebocoran sehingga komponen-komponen penting di dalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain dapat mengalir keluar. Hal ini menyebabkan permeabilitas sel terganggu sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup dan pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Pertumbuhan miselium *Aspergillus niger* terhambat pada 2,5 dan 3,0 mg/ml pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terendah untuk membunuh jamur. Perubahan utama diamati di bawah cahaya dan elektron scanning mikroskop menunjukkan kehilangan sitoplasma di hifa jamur, dan tunas dari ujung hifa. Dinding hifa dan diameter menjadi nyata tipis, menyimpang dan mengakibatkan gangguan dinding sel (Sharma dan Tripathi, 2006)

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan.

- Jenis pelarut dan lama ekstraksi terbaik untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* adalah pelarut etanol dan lama ekstraksi 72 jam dengan diameter hambat sebesar $13,45 \pm 0,71$ mm, nilai MIC sebesar $0,38 \pm 0,04$ ppm dan MFC sebesar $1,50 \pm 0,15$ ppm.
- pH terbaik yang berpengaruh terhadap stabilitas ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* untuk menghambat pertumbuhan jamur *Aspergillus niger* adalah pH 8 dengan diameter hambat sebesar $10,82 \pm 0,12$ mm, nilai MIC sebesar $1,02 \pm 0,02$ ppm dan MFC sebesar $4,04 \pm 0,06$ ppm.

5.2 Saran

Hasil dari ekstraksi tahap awal ini masih berupa ekstrak kasar dan umumnya ekstraksi dengan pelarut tidak dapat menghasilkan komponen yang diinginkan secara sempurna kecuali dilanjutkan dengan pemurnian sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk menggunakan pemurnian ekstrak sehingga komponen atau senyawa bioaktif sesuai yang diinginkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adnan, M. 1997. Teknik Kromatografi Untuk Analisis Bahan Makanan. Penerbit Andi. Yogyakarta.
- Amini, S dan Syamdidi. 2005. Konsentrasi Unsur Hara Pada Media Dan Pertumbuhan *Chlorella vulgaris* Dengan Pupuk Anorganik Teknis Dan Analis. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi Kelautan dan Perikanan, Badan Riset Kelautan dan Perikanan Jakarta. Jurnal Perikanan, Vol 8 (2) : 201-206.
- Ananda, S. 2009. Pengaruh Suhu, Kaporit, dan pH terhadap Pertumbuhan Cendawan Entomopatogen Transgenik *Aspergillus niger-GFP* dan Patogenitasnya pada Larva Nyamuk *Aedes aegypti*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengathuan Alam. Institut Pertanian Bogor.
- Andersen, M. R., Linda L. dan Jens N. 2009. Systemic Analysis of the Response of *Aspergillus niger* to Ambient pH. New York.
- Andrea, R. T.N.E. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri *Aspergillus niger* Isolat dari Akar Mangrove (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap *S. Aureus* dan *E. Coli*. FPIK UB. Malang Autopsy findings in severe malaria – a case report. Med J Indones vol. 1 (7) : 210-215
- Andriani, R. dan Lily R. 2010. Nistatin Oral Sebagai Terapi Profilaksisi Infeksi Jamur Sistemik Pada Neonatus Kurang Bulan. Sari Pediatri, Vol. 11 (6): 123-129
- Ardananuridin A., S. Winarsih., dan M. Widayat. 2004. Uji Efektifitas Dekok Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Salmonella typhi* Secara *In Vitro*. Program Studi Kedokteran FK Unibraw. Vol. 20 (1) : 29-34.
- Azizah, N., A. N. Al-Baarri dan S. Mulyani. 2012. Pengaruh Lama Fermentasi terhadap Kadar Alkohol, pH, dan Produksi Gas Pada Proses Fermentasi Bioetanol Dari Whey Dengan Substitusi Kulit Nanas. Jurnal Aplikasi Teknologi Pangan, Vol. 1 (2): 11-22
- Bains W. 1995. Biotechnology from A to Z. Oxford University Press. Oxford-Journal of Enzyme Microb. Tech. Butterworth and Co Publish. Vol. 8 (1) : 92-112
- Bauer A. W dan Kirby W. M. M. 1996. Antibiotic susceptibility testing by a standarized single disk method. The University of Wisconsin.
- Bloomfield SF. 1991. Methods for assessing antimicrobial activity. In:Denyer SP, Hugo WB, editors. Mechanisms of action of chemical biocides their study and exploitation. Blackwell Scientific Publication: London
- Bowo A. Hariyono A. dan Wibowo, 2009. Kinetika Bioakumulasi Logam Berat Kadmium Oleh Fitoplankton *Chlorella sp* Lingkungan Perairan

- Laut.Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi, Vol. 5 (2) : 89–103.
- Dwiatmaka, Y. 2000. Skrining Tanaman Berkhasiat Antikanker dengan Metode BST. Santa Darma. Yogyakarta.
- Fardiaz. 1992. Mikrobiologi Pangan 1. Penerbit. PT. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta
- Fatisa Y. 2013. Daya Antibakteri Estrak Kulit dan Biji Buah Pulasan (*Nephelium mutabile*) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. Program Studi Pendidikan Kimia, Fakultas Tarbiyah dan Keguruan, Universitas Islam Negeri Sultan Syarif Kasim Riau. Vol. 10 (1) : 31-38.
- Harborne J. B. 1987. Metode Kimia. Kosasih P, Iwang S, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: Phytochemical Methods.
- Harborne, J. B. 1984. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerjemah: K. Padmawinata dan I. Soediro. Penerbit. Bandung.
- Harborne, J.B. 1987. Fitokimia. Penuntun Cara modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua. Penerbit ITB, Bandung.
- Harborne, J.B. 2006. Fitokimia. Penuntun Cara modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua. Penerbit ITB, Bandung.
- Haryoto dan A. Wibowo, 2004. Kinetika Bioakumulasi Logam Berat Kadmium Oleh Fitoplankton *Chlorella sp* Lingkungan Perairan Laut.Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Jurnal Penelitian Sains & Teknologi, Vol. 5 (2) : 89–103.
- Hayati. 2011. Uji Bioaktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Lamun dari Kepulauan Spermonde. Kota Makassar. Univ. Hasanuddin. Makassar
- Irkin R. Dan Mihriban K, 2007. Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. African Journal of Biotechnology. Academic Journals. Vol. 6 (4): 384-387.
- Jawetz, E., J.L, Melnick, and E. Adelberg. 1995. Medical Microbiology. Apleton and Lange. New York.
- Khamidah, U. 2013. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella sp.* Hasil Kultivasi dalam Medium Ekstrak Tauge Terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Lay, B.H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.

- Lennette, T. H., Barilows, A., Hausler, W. J., dan Shadoni, H. J. 1991. Manual Clinical Microbiology (5th ed). Washington, DC: American Society for Microbiology
- Lewis W. H. dan Melnick P. F. 1997. Medical Botany Plant Afecting Man's Health. John Willy and John. New York
- Lubis, R. D. 2008. Pengobatan Dermakomitosis. Departemen Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin. Fakultas Kedokteran. Universitas Sumatera Utara.
- Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. Jurnal Mikotoksin Indonesia Vol. 7 (1): 12-24
- Massbank, 2015. Hight Quality Mass Spectral Database. www.massbank.jp. Diakses pada tanggal 9 Desember 2015.
- Mercola, 2006. *Chlorella-Anatural Wonder Food*.<http://www.mercola.com/chlorella/> health benefits. html.
- Metting B dan Pyne JW 1986. Biologically active compounds from microalgal. New York.
- Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putman J. E., Jacobsen, L. B., Nicols, D. E., dan McLaughin, J. L. 1982. Brine Shrimp : A Comvenient General Bioassay For Active Plant Constituents. Plant Medica.
- Minarni,E., Teuku A., dan Muhammad H. 2013. Daya Larvasida Ekstrak Etil Asetat Daun Kemuning (*Murraya Paniculata* (L) Jack) Terhadap Larva Nyamuk *Aedes Aegypti*. Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh. ISSN : 0853-1943
- Morin, R.B. dan Gorman, M. 1995. Kimia dan Biologi Antibiotik β -lactam (Chemistry and Biologi β -lactam Antibiotics) Edisi III. Semarang: IKIP Semarang Press.
- Nagarajana, arun, arivalaganb, udhaya, rajaguru, P. In vitro root induction and studies on antibacterial activity of root ekstrak of costus igneus on clinically important human pathogen. J. Microbiol. Biotech. Res., 2011, 1 (4): 67-76.
- Naufalin, Rifda., Betty, S.R.L.J., K, Ferry., S, Mirnawati dan Herastuti, R. 2005. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bunga Kecombrang Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. IPB. Bogor. Vol. 16 (1) : 14-26.
- Naviner M, Berge JP., Durand P dan Lee Bris H. 1999. Antibacterial activity ofthe marine diatom *Skeletonema costatum* against Aquacultural pathogens. Aquaculture 17 (1): 15-24
- Otari, A. 2013. Uji Efek Anthiperqlikemia Ekstrak n-Heksan dari Lumut Hati (*Mastigophora diclados*) dengan Metode Induksi Alokasan. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Program Studi Farmasi. Jakarta. 70 halaman.

- Pelczar dan Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi, Alih Bahasa: Hadioetomo, R.S. Jakarta: UI Press.
- Pradhika, E. I. 2008. Daya Kerja Antimikroba dan .yanpusmeongblog.com. Diakses pada tanggal 27 Januari 2015.
- Priyono, A. 2014. Ketonazole. <http://www.kerjanya.net/faq/11677-ketoconazole.html>. Di akses pada hari minggu 29 November 2015.
- Roihanah S., Sukoso, Andayani S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang. Vol 2 (1) : 1-5.
- Sa'id,GG. 1993. Bioindustri, Penerapan Teknologi Fermentasi. PT. Mediyatama Sarana Perkasa. Jakarta.
- Saksony, A.K. 2012. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kasar Mikroalga *Tetraselmis chuii* dengan Metode Ekstraksi dan Jenis Pelarut yang Berbeda. Skripsi. Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Brawijaya. Malang.
- Salisbury FB, Ross CW. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Terjemahan dari Plant Physiology. ITB. Bandung.
- Satria, M. D. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak N-Heksan Buah Lakum (*Cayratia Trifolia*) Dengan Metode Dpph (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil). Progam Studi Farmasi. Fakultas Kedokteran Tanjungpura.
- Setyaningsih, I.; Desniar dan Sriwardani, T. 2005. Konsentrasi hambatan Minimum Ekstrak *Chlorella* sp. Terhadap Bakteri dan Kapang. Buletin Teknologi Hasil Perikanan. Vol. 8 (1): 25-34.
- Shahidi F, Nacz M. 1995. Food Phenolic. Lancaster: Technomic Publishing Co.Inc
- Sharma N dan Tripathi A, 2006. Effects of Citrus sinensis (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Mycology and Plant Pathology Division, Department of Botany, University of Lucknow, Lucknow 226007, India
- Sudarmadji S. Bambang H. Suhardi. 1997. Analisa Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta. 172 halaman
- Sulastri, D. 2011. Skrining Fitokimia Ekstrak Rumpun Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Eucaema Denticullatum*. *Jurnal Kelautan*, 3 (1) : 1-17
- Sundari, I. 2010. Identifikasi Senyawa Dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). Skripsi. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret Surakarta. 67 Halaman.

Wenno, M.R.2010.,Ninik P., Dan Johanna L. T, Ekstraksi Senyawa Antibakteri Dari *Chlorella* Sp. Jurnal Penelitian Pertanian Terapan Vol.10 (2): 131-137

Widayanti, V T. 2012. Produksi Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dengan Metode Ekstraksi Maserasi (Kajian Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi). Skripsi. Fakultas Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya Malang. 101 halaman.

Widyawati, P.S. 2011. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Metanolik Daun Beluntas (*Pluchea indica* Less) dan Fraksinya serta Kemampuan Mencegah Warmed Over Flavor pada Daging Itik yang Telah Dipanaskan. [Tesis]. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor.

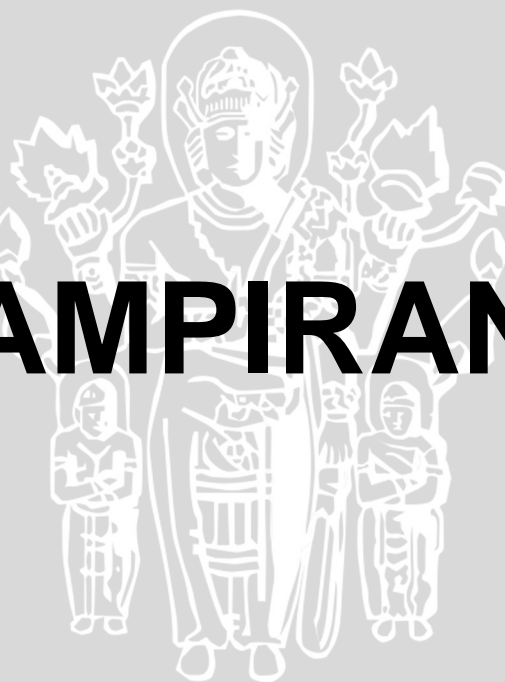
Winarno, F.G, D. Fardiaz dan S. Fardiaz. 1973. Ekstraksi, Kromatografi dan Elektroforesis. Fakultas Teknologi Pertanian IPB. Bogor.

Yadial, S. C., S. Amini., dan S. D. Lestari. 2011. Kultivasi *Chlorella sp* Pada Media Tumbuh Yang Diperkaya Dengan Pupuk Anorganik Dan Soil Extract. Program Studi Kimia, Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.Vol 3 (2) : 298-304.



UNIVERSITAS BRAWIJAYA

LAMPIRAN



Lampiran 1. Rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*

Perlakuan	A (Jenis Pelarut)			
	A1 (n-Hexa n)	A2 (Etil Asetat)	A3 (Etanol)	
B1 (24 Jam)	1,96	2,94	6,19	
	1,98	3,13	6,41	
	1,87	3,33	6,73	
B (Lama Ekstraksi)	B2 (48 Jam)	2,42	3,59	7,61
		2,43	3,41	7,31
		2,51	3,72	7,42
B3 (72 Jam)	B3 (72 Jam)	2,66	3,13	8,09
		2,72	4,01	8,27
		2,69	4,32	8,63

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jenis pelarut	lama ekstraksi	ulangan
N		27	27	27
Normal Parameters ^a	Mean	2.0000	2.0000	2.0000
	Std. Deviation	.83205	.83205	.83205
Most Extreme Differences	Absolute	.219	.219	.219
	Positive	.219	.219	.219
	Negative	-.219	-.219	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.122	1.122	1.122
Asymp. Sig. (2-tailed)		.151	.151	.151
a. Test distribution is Normal.				

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	sd
	1	2	3			
A1B1	1,96	1,98	1,87	5,81	1,94	0,06



A1B2	2,42	2,43	2,51	7,36	2,45	0,05
A1B3	2,66	2,72	2,69	8,07	2,69	0,03
Jumlah	7,04	7,13	7,07	21,24		
A2B1	2,94	3,13	3,33	9,4	3,13	0,20
A2B2	3,59	3,41	3,72	10,72	3,57	0,16
A2B3	3,13	4,01	4,32	11,46	3,82	0,62
Jumlah	9,66	10,55	11,37	31,58		
A3B1	6,19	6,41	6,73	19,33	6,44	0,27
A3B2	7,61	7,31	7,42	22,34	7,45	0,15
A3B3	8,09	8,27	8,63	24,99	8,33	0,27
Jumlah	21,89	21,99	22,78	66,66		
Jumlah Total	38,59	39,67	41,22	119,48		

Perlakuan A	Perlakuan B			Jumlah	Rata-rata
	B 1	B 2	B 3		
A 1	5,81	7,36	8,07	21,24	7,08
A 2	9,4	10,72	11,46	31,58	10,52
A 3	19,33	22,34	24,99	66,66	22,22
Jumlah	34,54	40,42	44,52		
Rata-rata	11,51	13,47	14,84		

Keterangan:

Perlakuan A = Pelarut

Perlakuan B = Lama Waktu

FK	528,72
JK Total	134,15
JK A	125,94
JK B	5,59
JK Interaksi	1,37
JK Galat	1,25

ANOVA							
SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01	Sig
Perlakuan A	2	125,94	62,97	910,44	3,55	6,01	**
Perlakuan B	2	5,59	2,80	40,42	3,55	6,01	**
Interaksi	4	1,37	0,34	4,95	2,93	4,58	**
Galat	18	1,25	0,07				
Total	26						

Uji Berganda Duncan's

Perlakuan A

Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	1,07	1,12

Perlakuan B

Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	1,07	1,12

Interaksi

Nilai	2	3	4	5	6	7	8
JND 1%	4,071	4,246	4,361	4,445	4,509	4,559	4,601
JNT	0,62	0,64	0,66	0,67	0,68	0,69	0,70

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	1,94	a
A1B2	2,45	b
A1B3	2,69	b
A2B1	3,13	c
A2B2	3,57	d
A2B3	3,82	d
A3B1	6,44	e
A3B2	7,45	f
A3B3	8,33	g



Lampiran 2. Foto proses ekstraksi *Chlorella vulgaris*



Sampel *Chlorella vulgaris* di timbang sebanyak 50 gram



Sampel dimasukan 3 erlenmeyer 250 ml (24jam,48jam,72jam)



Ditambahkan pelarut n-Hexan dengan perbandingan 1:5



Di sentrifuse dengan kecepatan 5000rpm selama



Di saring dengan kertas whatman no. 42



Di shaker waterbath dengan kecepatan 150rpm suhu 27⁰ C



Setelah disentrifuse terbentuk residu dan filtrat



Filtrat dimasukan dalam botol dan residu dibuat ekstraksi dengan pelarut etil asetat



Filtrat dirotary evaporator

Lampiran 3. Aktivitas Antijamur Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Aspergillus niger*

Perlakuan	A (Jenis Pelarut)			
	A1	A2	A3	
	(n-Hexan)	(Etil Asetat)	(Etanol)	
B (Lama Ekstraksi)	B1 (24 Jam)	1,91	4,82	10,19
		2,41	4,85	11,16
		2,33	5,91	11,88
	B2 (48 Jam)	2,74	4,81	10,31
		2,41	5,76	12,26
		2,13	5,66	11,16
	B3 (72 Jam)	2,52	5,66	12,63
		2,61	6,88	13,82
		2,69	5,69	13,91

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jenis pelarut	lama ekstraksi	ulangan
N		27	27	27
Normal Parameters ^a	Mean	2.0000	2.0000	2.0000
	Std. Deviation	.83205	.83205	.83205
Most Extreme Differences	Absolute	.219	.219	.219
	Positive	.219	.219	.219
	Negative	-.219	-.219	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.136	1.136	1.136
Asymp. Sig. (2-tailed)		.151	.151	.151

a. Test distribution is Normal.

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	sd
	1	2	3			
A1B1	1,91	2,41	2,33	6,65	2,22	0,27
A1B2	2,74	2,41	2,13	7,28	2,43	0,31
A1B3	2,52	2,61	2,69	7,82	2,61	0,09
Jumlah	7,17	7,43	7,15	21,75		
A2B1	4,82	4,85	5,91	15,58	5,19	0,62
A2B2	4,81	5,76	5,66	16,23	5,41	0,52
A2B3	5,66	6,88	5,69	18,23	6,08	0,70
Jumlah	15,29	17,49	17,26	50,04		
A3B1	10,19	11,16	11,88	33,23	11,08	0,85
A3B2	10,31	12,26	11,16	33,73	11,24	0,98
A3B3	12,63	13,82	13,91	40,36	13,45	0,71
Jumlah	33,13	37,24	36,95	107,32		
Jumlah Total	55,59	62,16	61,36	179,11		

Perlakuan A	Perlakuan B			Jumlah	Rata-rata
	B 1	B 2	B 3		
A 1	6,65	7,28	7,82	21,75	7,25
A 2	15,58	16,23	18,23	50,04	16,68
A 3	33,23	33,73	40,36	107,32	35,77
Jumlah	55,46	57,24	66,41		
Rata-rata	18,49	19,08	22,14		

Keterangan:

Perlakuan A = Pelarut

Perlakuan B = Lama Waktu

FK	1188,16
JK Total	441,41
JK A	422,35
JK B	7,67
JK Interaksi	4,39
JK Galat	7,00

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01	Sig
Perlakuan A	2	422,35	211,18	542,98	3,55	6,01	**
Perlakuan B	2	7,67	3,84	9,86	3,55	6,01	**
Interaksi	4	4,39	1,10	2,82	2,93	4,58	**
Galat	18	7,00	0,39				
Total	26						

Uji Berganda Duncan's

Perlakuan A	0,62	
Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	2,54	2,65

Perlakuan B	0,62	
Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	2,54	2,65

Interaksi	0,36							
Nilai	2	3	4	5	6	7	8	9
JND 1%	4,071	4,246	4,361	4,445	4,509	4,559	4,601	4,635
JNT	1,47	1,53	1,57	1,60	1,62	1,64	1,66	1,67

Perlakuan	Rata-rata	Notasi
A1B1	2,22	a
A1B2	2,43	a
A1B3	2,61	a
A2B1	5,19	b
A2B2	5,74	b
A2B3	6,08	b
A3B1	11,08	c
A3B2	11,24	c
A3B3	13,45	d



Lampiran 4. Foto proses pembuatan inokulum jamur



Penimbangan media PDB



Penambahan aquades



Sterilisasi suhu 121°C ,tekanan 1 atm



Media PDB dimasukan tabung reaksi



Dimasukan biakan jamur kemedi PDB dengan jarum ose



Media dan jamur di vortex mixer agar homogen

Lampiran 5. Foto Uji Diameter Hambat tahap pertama



Inokulum jamur



Divortex



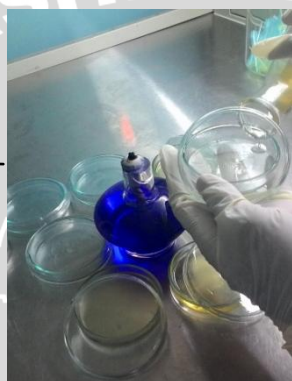
Disiapkan media



Disiapkan alat
Laminar Air Flow



Dimasukkan bakteri
pada cawan petri



Dimasukkan media
pada cawan petri



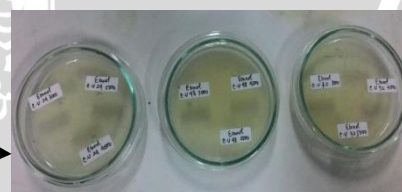
Didiamkan media
hingga memadat



Dilakukan pelubangan
pada media yang telah
membeku dengan besi
sumuran



Dimasukkan ekstrak
kasar *Chlorella
vulgaris* pada
cawan petri yang
telah dilubangi



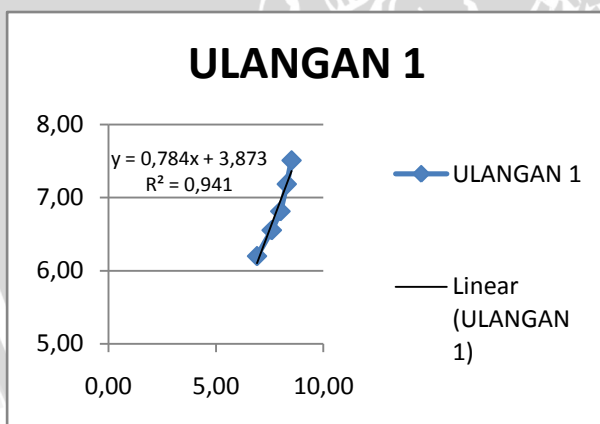
Diberi label pada
masing-masing
cawan

Lampiran 6. Perhitungan MIC dan MFC tahap pertama

- Perhitungan MIC dan MFC pelarut n-Hexan 24 jam

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	2,49	2,21	1,87
2000	2,56	2,25	1,94
3000	2,61	2,32	1,92
4000	2,68	2,37	2,03
5000	2,74	2,41	2,13

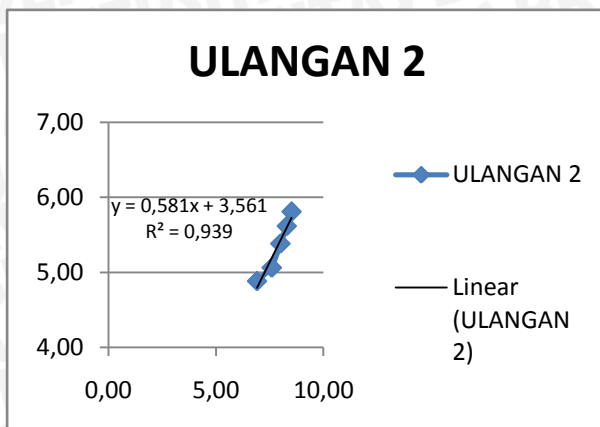
Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	6,20	4,88	3,50
7,60	6,55	5,06	3,76
8,01	6,81	5,38	3,69
8,29	7,18	5,62	4,12
8,52	7,51	5,81	4,54



$MIC = 3,873 \times 0,25 = 0,97$

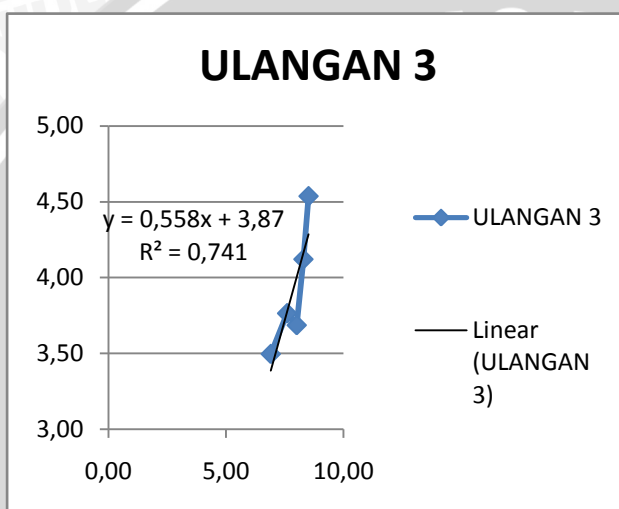
$MFC = 0,97 \times 4 = 3,87$





$MIC = 3,561 \times 0,25 = 0,89$

$MFC = 0,89 \times 4 = 3,56$



$MIC = 3,87 \times 0,25 = 0,97$

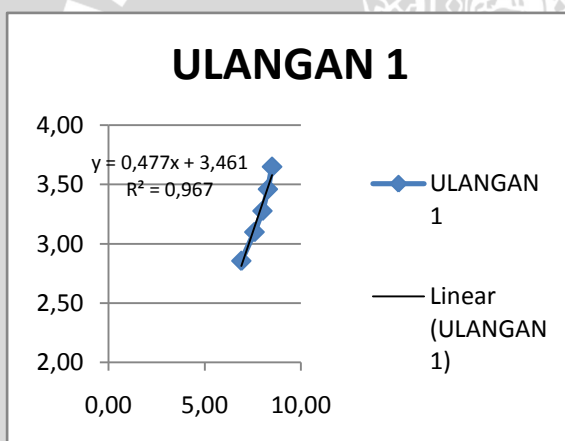
$MFC = 0,97 \times 4 = 3,87$

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,97	0,89	0,97
MFC	3,87	3,56	3,87

• Perhitungan MIC dan MFC pelarut n-Hexan 48 jam

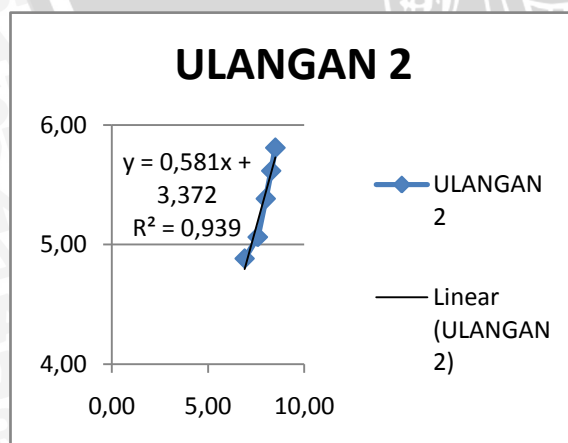
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	1,69	2,21	1,87
2000	1,76	2,25	1,94
3000	1,81	2,32	1,92
4000	1,86	2,37	2,03
5000	1,91	2,41	2,33

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	2,86	4,88	3,50
7,60	3,10	5,06	3,76
8,01	3,28	5,38	3,69
8,29	3,46	5,62	4,12
8,52	3,65	5,81	5,43



MIC = $3,461 \times 0,25 = 0,87$

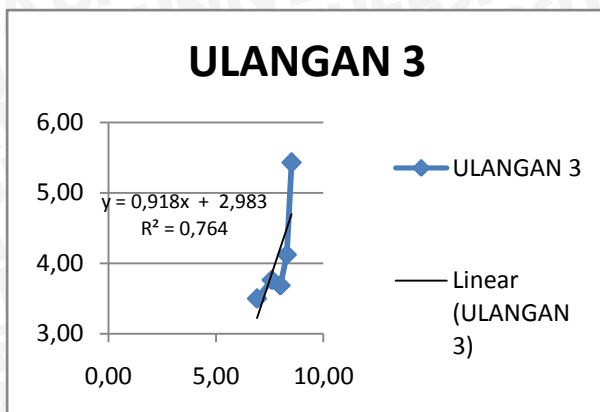
MFC = $0,86 \times 4 = 3,46$



MIC = $3,372 \times 0,25 = 0,84$



$MFC = 0,85 \times 4 = 3,37$



$MIC = 2,983 \times 0,25 = 0,74$

$MFC = 0,74 \times 4 = 2,98$

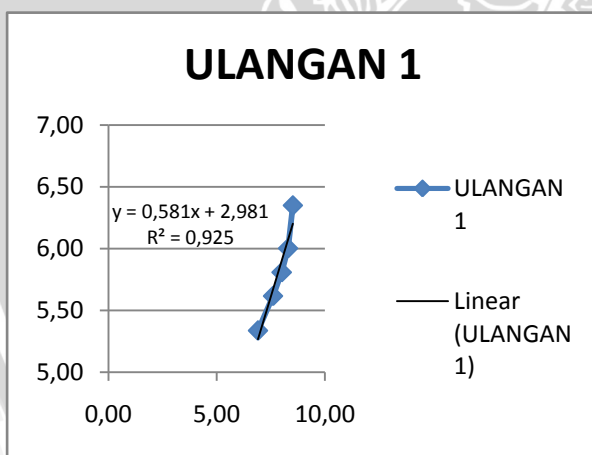
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,87	0,84	0,74
MFC	3,46	3,37	2,98



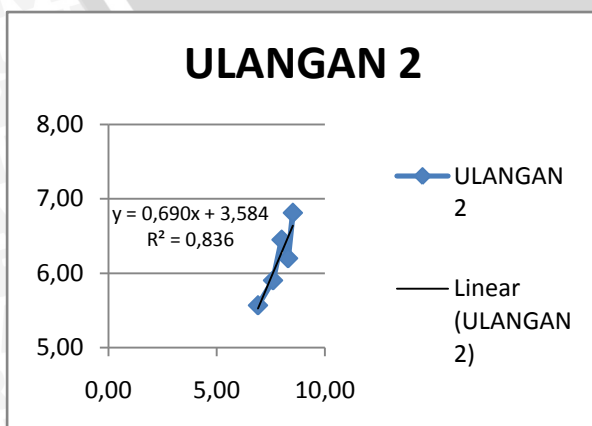
• Perhitungan MIC dan MFC pelarut n-Hexan 72 jam

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	2,31	2,36	2,41
2000	2,37	2,43	2,48
3000	2,41	2,54	2,54
4000	2,45	2,49	2,61
5000	2,52	2,61	2,69

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	5,34	5,57	5,81
7,60	5,62	5,90	6,15
8,01	5,81	6,45	6,45
8,29	6,00	6,20	6,81
8,52	6,35	6,81	7,24

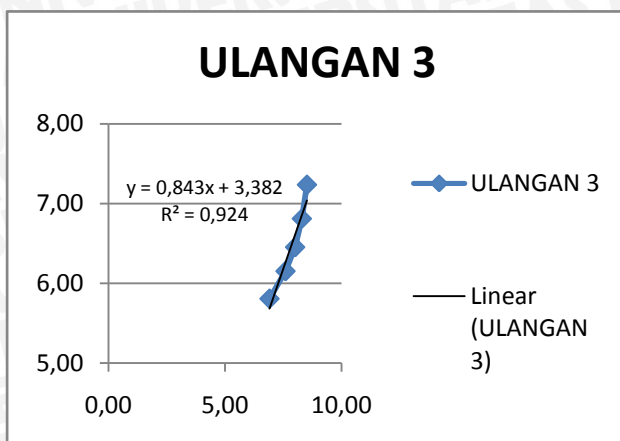


MIC = $2,981 \times 0,25 = 0,74$
MFC = $0,74 \times 4 = 2,98$



MIC = $3,584 \times 0,25 = 0,89$
MFC = $0,89 \times 4 = 3,58$

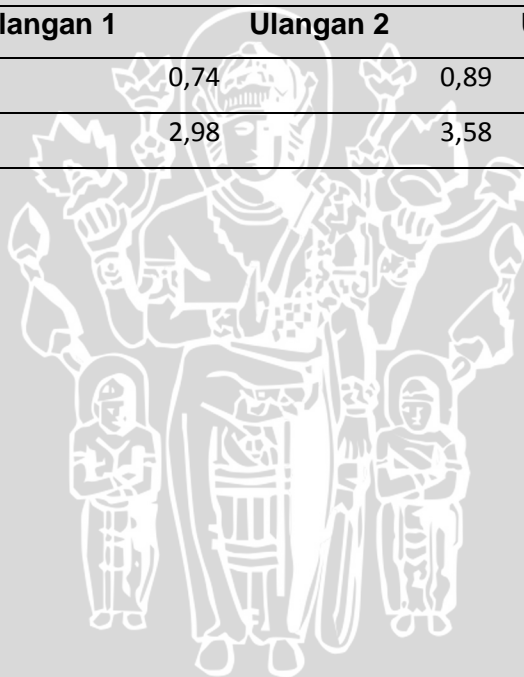




$MIC = 3,382 \times 0,25 = 0,84$

$MFC = 0,84 \times 4 = 3,38$

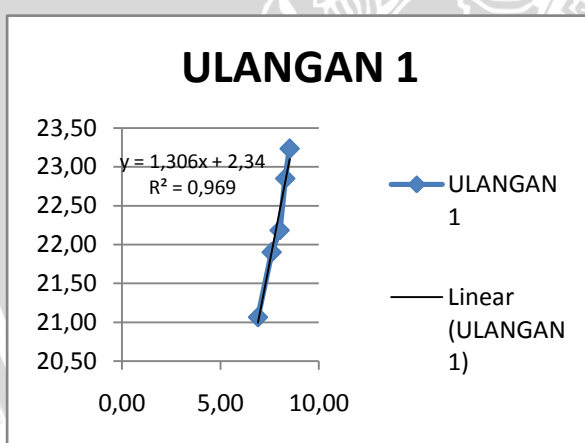
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,74	0,89	0,84
MFC	2,98	3,58	3,38



• Perhitungan MIC dan MFC pelarut etil asetat 24 jam

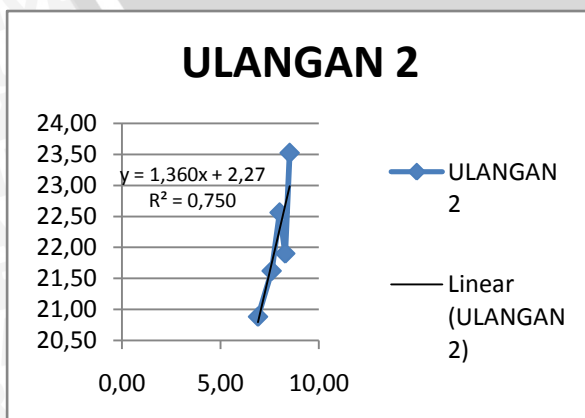
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	4,59	4,57	5,63
2000	4,68	4,65	5,71
3000	4,71	4,75	5,73
4000	4,78	4,68	5,84
5000	4,82	4,85	5,91

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	21,07	20,88	31,70
7,60	21,90	21,62	32,60
8,01	22,18	22,56	32,83
8,29	22,85	21,90	34,11
8,52	23,23	23,52	34,93



MIC= 2,34 X 0,25 = 0,59

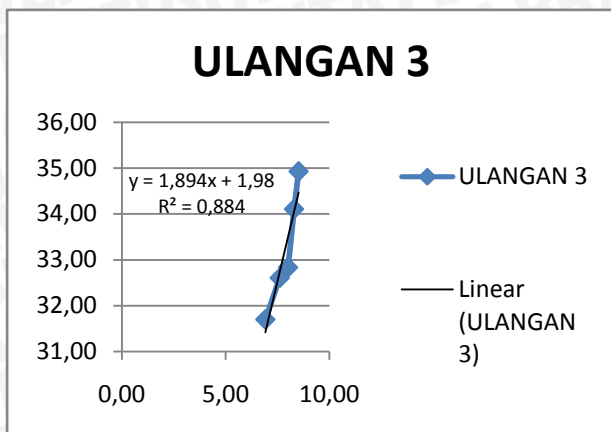
MFC= 0,58 X 4 = 2,34



MIC= 2,27 X 0,25 = 0,57

MFC= 0,56 X 4 = 2,27





$MIC = 1,98 \times 0,25 = 0,49$

$MFC = 0,49 \times 4 = 1,98$

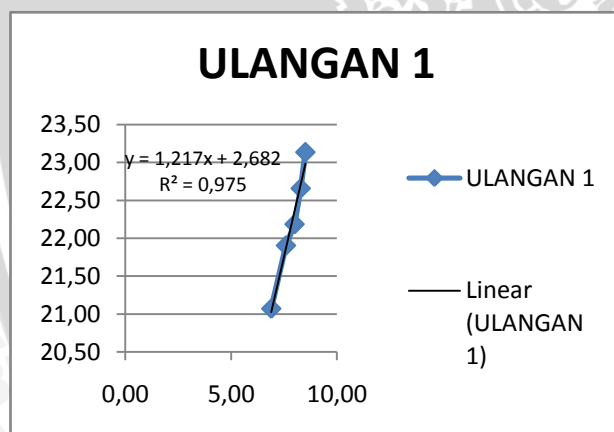
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,59	0,57	0,49
MFC	2,34	2,27	1,98



• Perhitungan MIC dan MFC pelarut etil asetat 48 jam

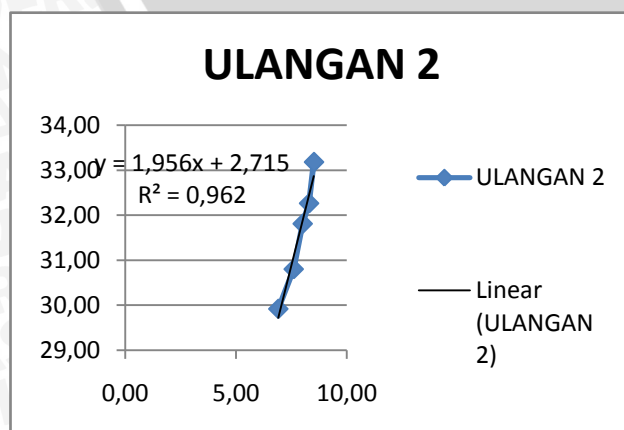
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	4,59	5,47	5,48
2000	4,68	5,55	5,53
3000	4,71	5,64	5,63
4000	4,76	5,68	5,6
5000	4,81	5,76	5,66

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	21,07	29,92	30,03
7,60	21,90	30,80	30,58
8,01	22,18	31,81	31,70
8,29	22,66	32,26	31,36
8,52	23,14	33,18	32,04



MIC = $2,682 \times 0,25 = 0,67$

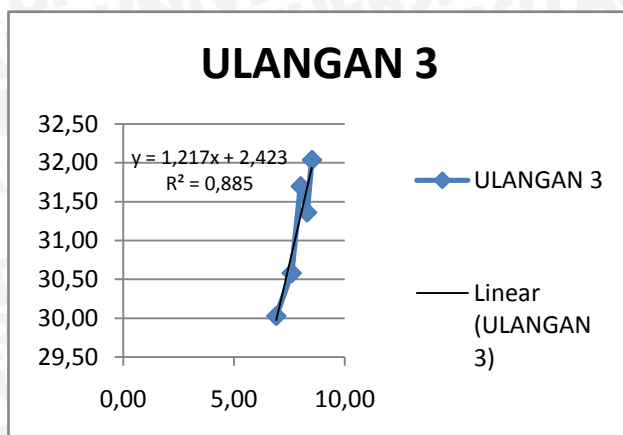
MFC = $0,67 \times 4 = 2,68$



MIC = $2,715 \times 0,25 = 0,68$

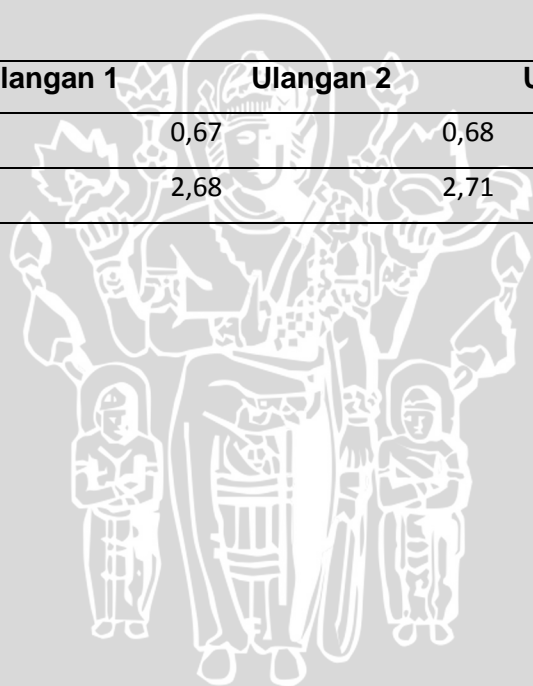
MFC = $0,68 \times 4 = 2,71$

ULANGAN 3



$MIC = 2,423 \times 0,25 = 0,61$
 $MFC = 0,61 \times 4 = 2,42$

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,67	0,68	0,61
MFC	2,68	2,71	2,42

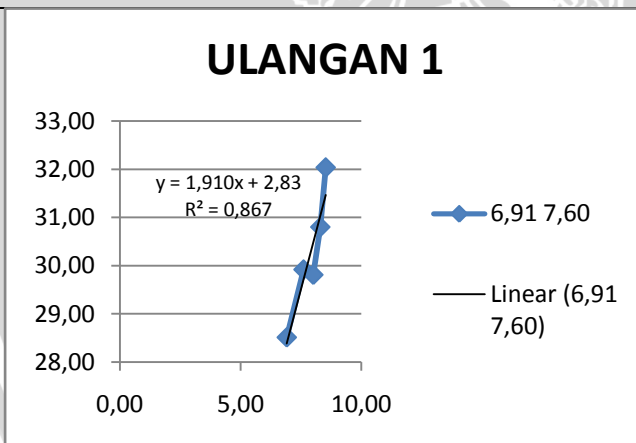


- Perhitungan MIC dan MFC pelarut etil asetat 72 jam

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	4,59	5,47	5,48
2000	4,68	5,55	5,53
3000	4,71	5,64	5,63
4000	4,76	5,68	5,6
5000	4,81	5,76	5,66

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	21,07	29,92	30,03
7,60	21,90	30,80	30,58
8,01	22,18	31,81	31,70
8,29	22,66	32,26	31,36
8,52	23,14	33,18	32,04

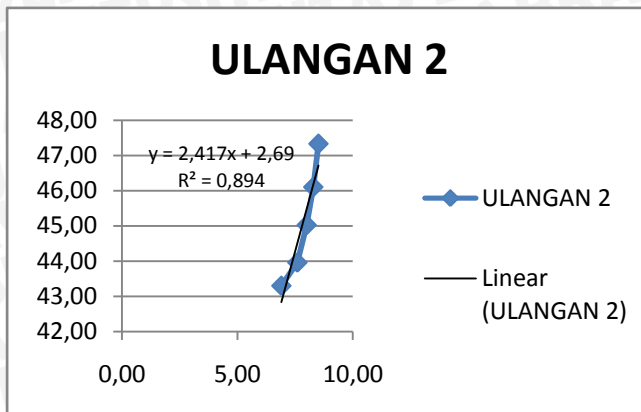
ULANGAN 1



MIC = $2,83 \times 0,25 = 0,71$

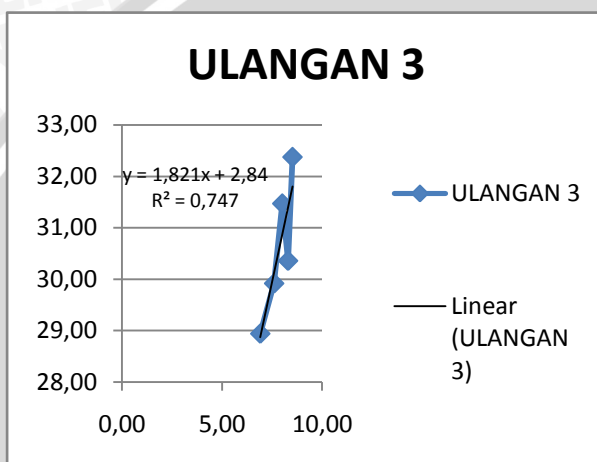
MFC = $0,71 \times 4 = 2,83$





MIC= 2,69 X 0,25 = 0,67

MFC= 0,67 X 4 = 2,69



MIC= 2,84 X 0,25 = 0,71

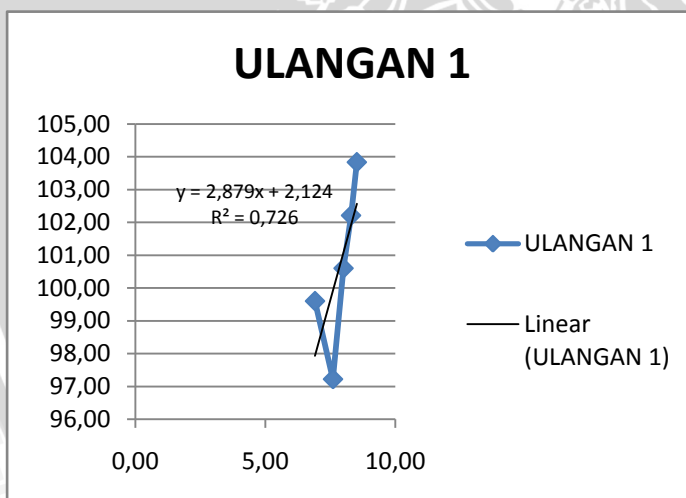
MFC= 0,71 X 4 = 2,84

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,71	0,67	0,71
MFC	2,83	2,69	2,84

• Perhitungan MIC dan MFC pelarut etanol 24 jam

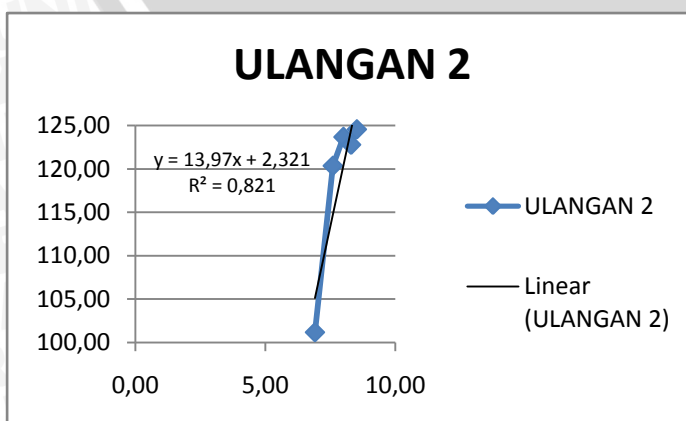
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	9,98	10,06	11,57
2000	9,86	10,97	11,57
3000	10,03	11,12	11,69
4000	10,11	11,08	11,78
5000	10,19	11,16	11,88

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	99,60	101,20	133,86
7,60	97,22	120,34	133,86
8,01	100,60	123,65	136,66
8,29	102,21	122,77	138,77
8,52	103,84	124,55	141,13



MIC = $2,124 \times 0,25 = 0,53$

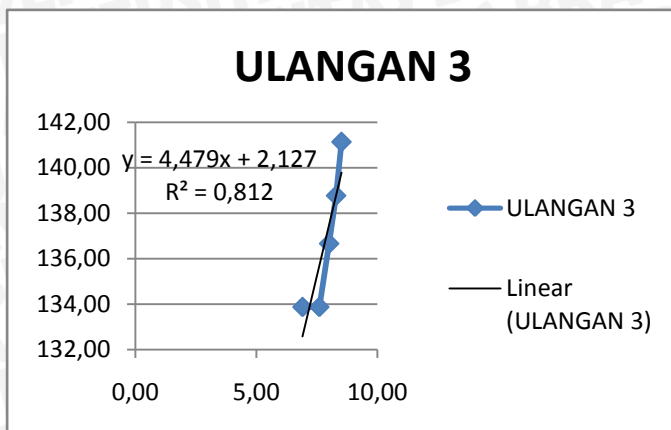
MFC = $0,53 \times 4 = 2,12$



MIC = $2,32 \times 0,25 = 0,58$

MFC = $0,58 \times 4 = 2,32$



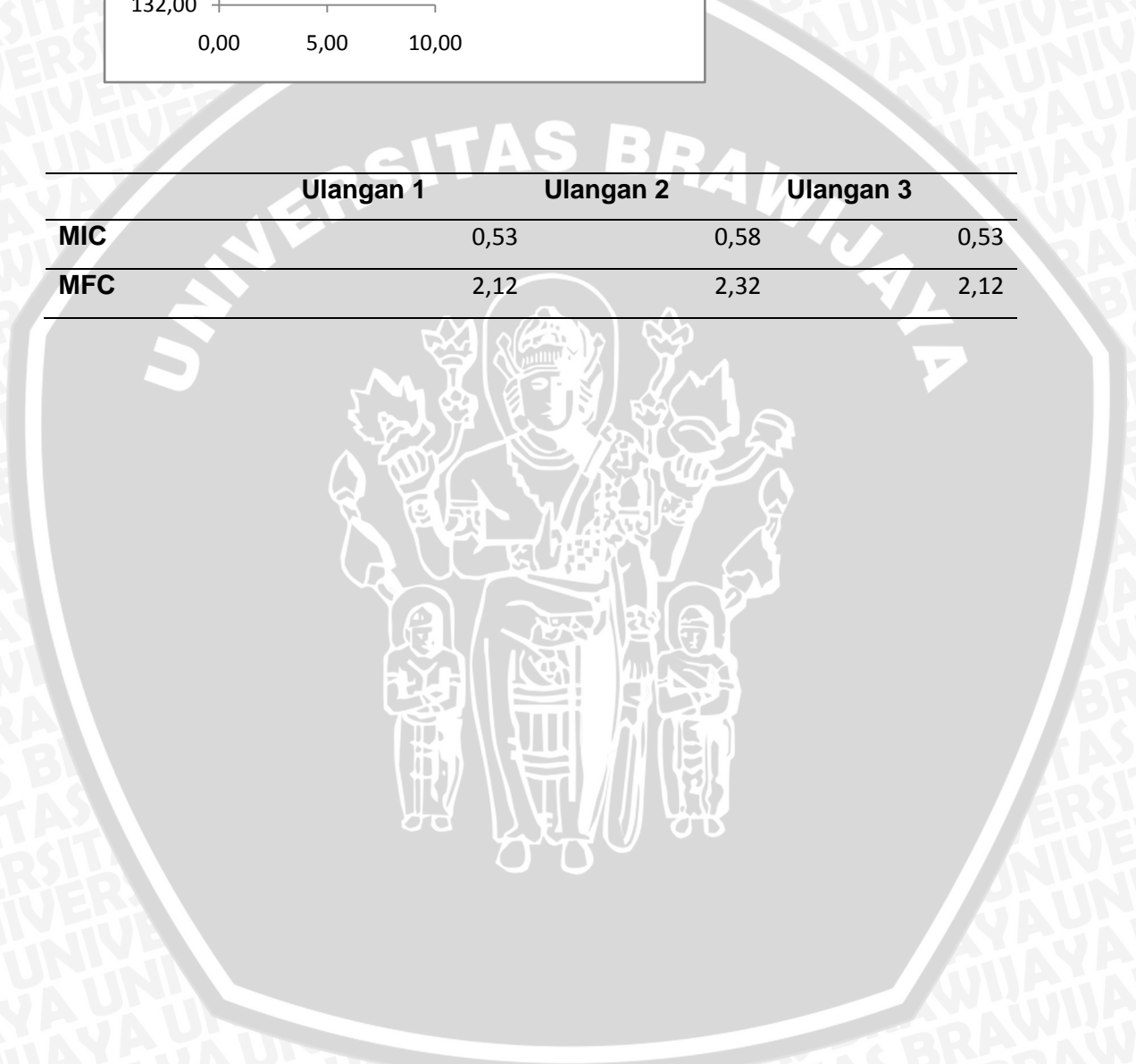


MIC = $2,127 \times 0,25 =$

0,53

MFC = $0,53 \times 4 = 2,12$

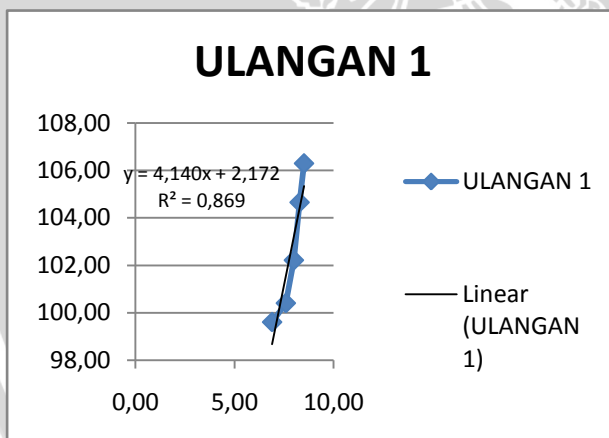
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,53	0,58	0,53
MFC	2,12	2,32	2,12



• Perhitungan MIC dan MFC pelarut etanol 48 jam

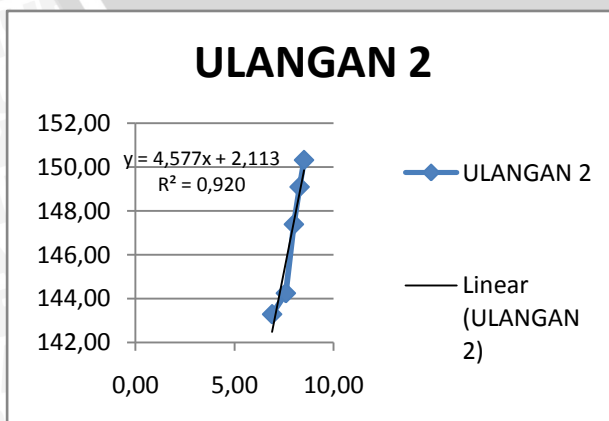
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	9,98	11,97	10,96
2000	10,02	12,01	11,05
3000	10,11	12,14	10,98
4000	10,23	12,21	11,02
5000	10,31	12,26	11,16

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	99,60	143,28	120,12
7,60	100,40	144,24	122,10
8,01	102,21	147,38	120,56
8,29	104,65	149,08	121,44
8,52	106,30	150,31	124,55



MIC = $2,17 \times 0,25 = 0,54$

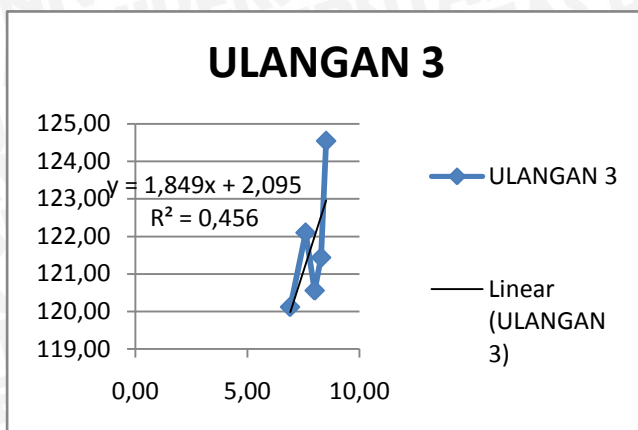
MFC = $0,54 \times 4 = 2,17$



MIC = $2,113 \times 0,25 = 0,53$

MFC = $0,53 \times 4 = 2,11$





MIC= 2,095 X 0,25 = 0,52

MFC= 0,52 X 4 = 2,09

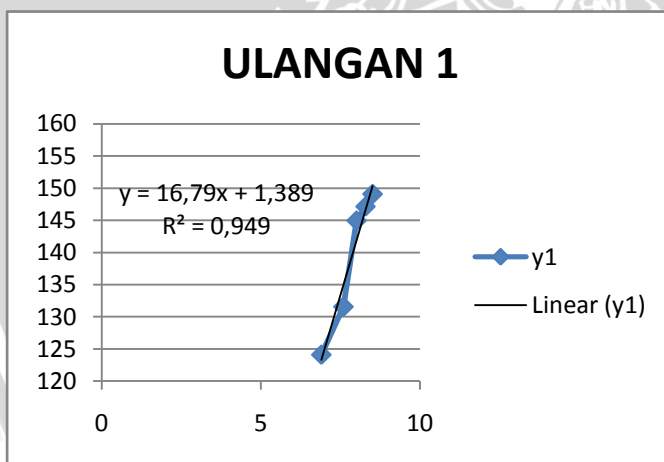
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,54	0,53	0,52
MFC	2,17	2,11	2,09



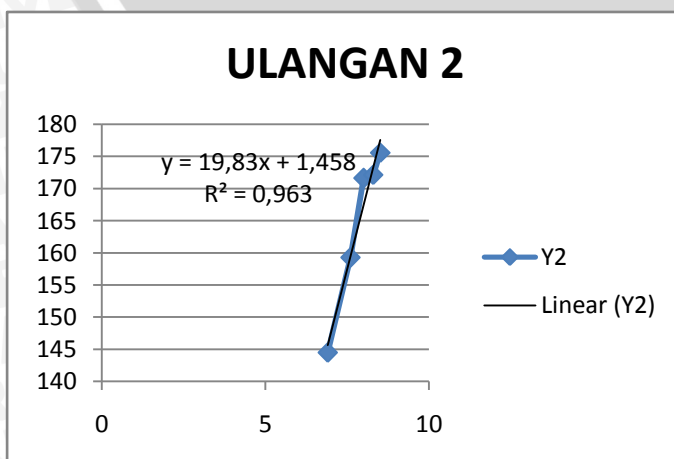
• Perhitungan MIC dan MFC pelarut etanol 72 jam

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	11,07	12,02	12,66
2000	11,91	12,62	11,16
3000	12,04	13,1	13,2
4000	12,23	13,12	13,17
5000	12,38	13,25	14,25

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	122,54	144,48	160,28
7,60	141,85	159,26	124,55
8,01	144,96	171,61	174,24
8,29	149,57	172,13	173,45
8,52	153,26	175,56	203,06

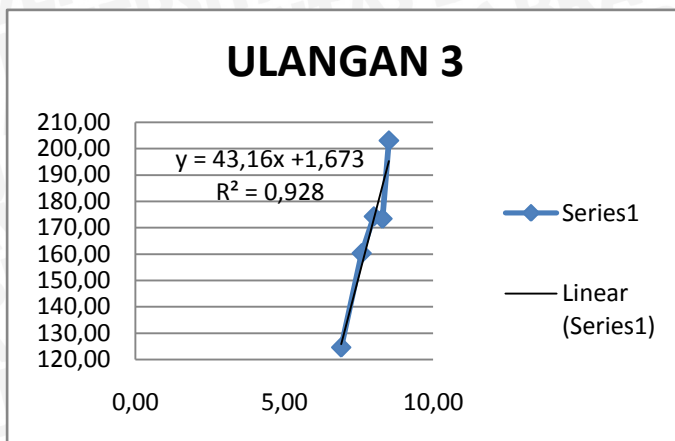


MIC = $1,389 \times 0,25 = 0,35$
MFC = $0,35 \times 4 = 1,38$



MIC = $1,458 \times 0,25 = 0,36$
MFC = $0,36 \times 4 = 1,45$



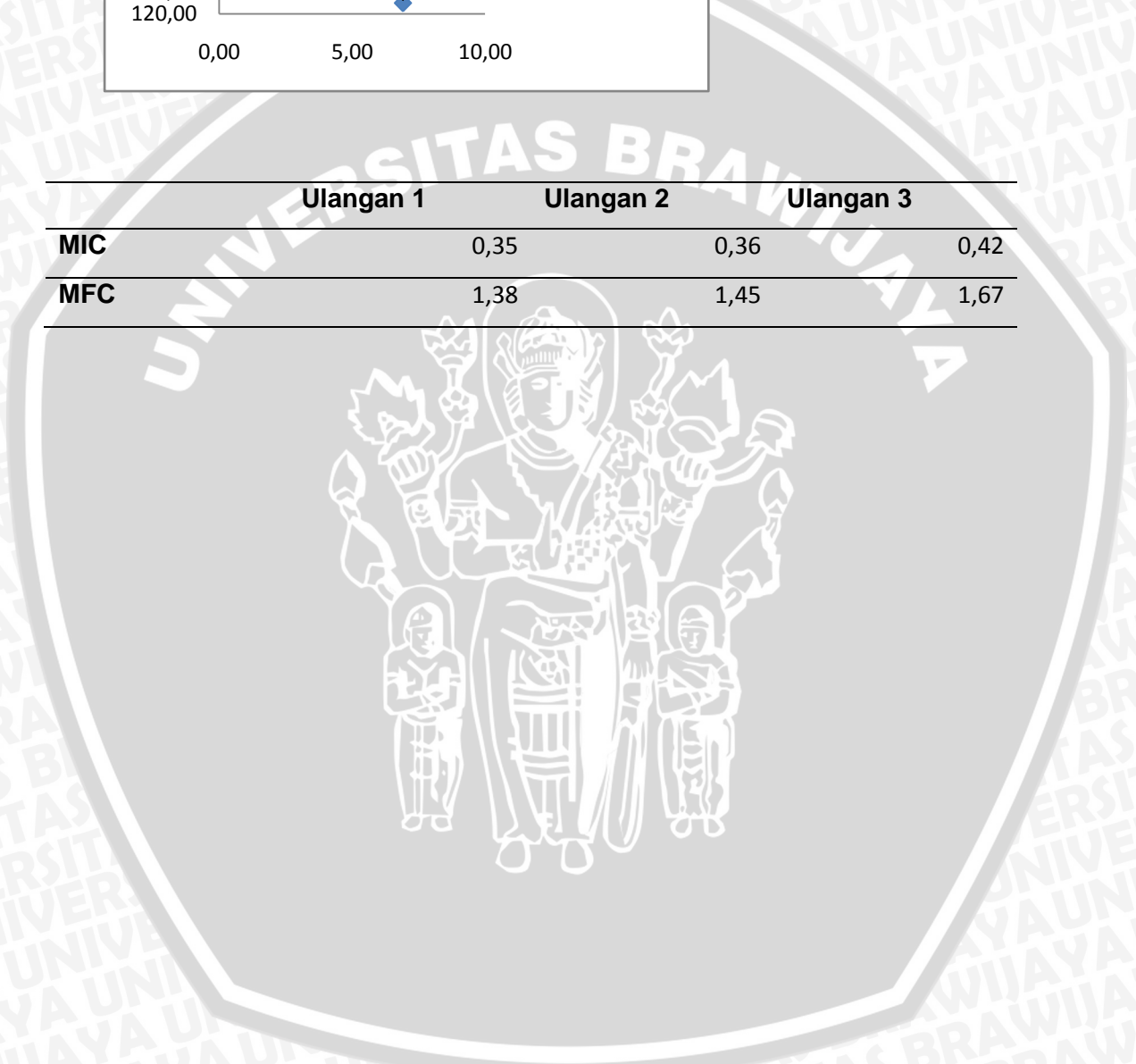


$$\text{MIC} = 1,673 \times 0,25 =$$

0,42

$$\text{MFC} = 0,42 \times 4 = 1,67$$

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	0,35	0,36	0,42
MFC	1,38	1,45	1,67



Lampiran 7. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Tahap Pertama

Perlakuan	A (Jenis Pelarut)			
	A1 (n-Hexan)	A2 (Etil Asetat)	A3 (Etanol)	
B1 (24 Jam)	0,97	0,59	0,53	
	0,89	0,57	0,53	
	0,97	0,50	0,58	
B (Lama Ekstraksi)	B2 (48 Jam)	0,75	0,67	0,54
		0,90	0,68	0,53
		0,85	0,61	0,52
B3 (72 Jam)		0,87	0,71	0,35
		0,89	0,67	0,36
		0,74	0,71	0,42

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jenis pelarut	lama ekstraksi	ulangan
N		27	27	27
Normal Parameters ^a	Mean	2.0000	2.0000	2.0000
	Std. Deviation	.83205	.83205	.83205
Most Extreme Differences	Absolute	.219	.219	.219
	Positive	.219	.219	.219
	Negative	-.219	-.219	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.008	1.008	1.008
Asymp. Sig. (2-tailed)		.151	.151	.151
a. Test distribution is Normal.				

--	--	--	--

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	sd
	1	2	3			
A1B1	0,97	0,89	0,97	2,83	0,94	0,04
A1B2	0,75	0,90	0,85	2,49	0,83	0,08
A1B3	0,87	0,84	0,75	2,45	0,82	0,06
Jumlah	2,58	2,63	2,56	7,76		
A2B1	0,59	0,57	0,50	1,65	0,55	0,05
A2B2	0,67	0,68	0,61	1,95	0,65	0,04
A2B3	0,71	0,67	0,71	2,09	0,70	0,02
Jumlah	1,96	1,92	1,81	5,69		
A3B1	0,53	0,53	0,58	1,64	0,55	0,03
A3B2	0,54	0,53	0,52	1,59	0,53	0,01
A3B3	0,35	0,36	0,42	1,13	0,38	0,04
Jumlah	1,42	1,42	1,52	4,36		
Jumlah Total	5,96	5,97	5,89	17,81		

Perlakuan A	Perlakuan B			Jumlah	Rata-rata
	B 1	B 2	B 3		
A 1	2,83	2,49	2,45	7,76	2,59
A 2	1,65	1,95	2,09	5,69	1,90
A 3	1,64	1,59	1,13	4,36	1,45
Jumlah	6,1125	6,03	5,6675		
Rata-rata	2,04	2,01	1,89		

Keterangan:

Perlakuan A = Pelarut

Perlakuan B = Lama Waktu

FK	11,75
JK Total	0,81
JK A	0,65
JK B	0,01
JK Interaksi	0,10
JK Galat	0,04

SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01	Sig
Perlakuan A	2	0,65	0,33	158,43	3,55	6,01	**
Perlakuan B	2	0,01	0,01	3,02	3,55	6,01	**
Interaksi	4	0,10	0,03	12,61	2,93	4,58	**
Galat	18	0,04	0,00				
Total	26						

Uji Berganda Duncan's

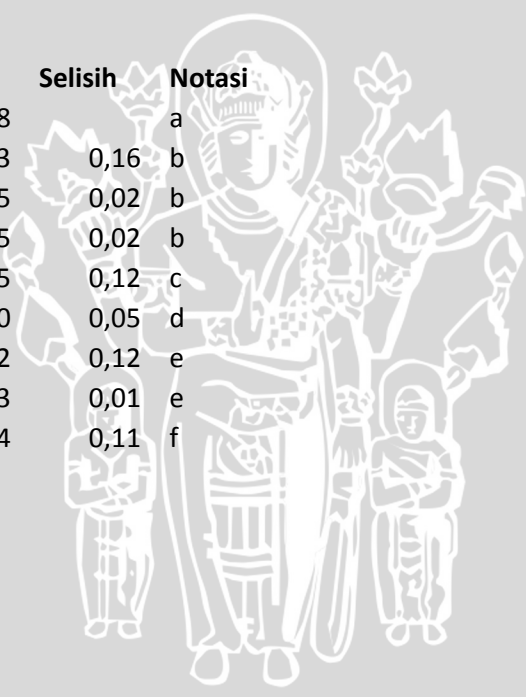
Perlakuan A 0,05

Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	0,18	0,19

Perlakuan B	0,05	
Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	0,18	0,19

Interaksi	0,03						
Nilai	2	3	4	5	6	7	8
JND 1%	4,071	4,246	4,361	4,445	4,509	4,559	4,601
JNT	0,11	0,11	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12

Perlakuan	Rata-rata	Selisih	Notasi
A3B3	0,38		a
A3B2	0,53	0,16	b
A3B1	0,55	0,02	b
A2B1	0,55	0,02	b
A2B2	0,65	0,12	c
A2B3	0,70	0,05	d
A1B1	0,82	0,12	e
A1B3	0,83	0,01	e
A1B2	0,94	0,11	f



Lampiran 8. Uji MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) Tahap Pertama

Perlakuan	A (Jenis Pelarut)			
	A1 (n-Hexan)	A2 (Etil Asetat)	A3 (Etanol)	
B (Lama Ekstraksi)	B1 (24 Jam)	3,46	2,34	2,12
		3,37	2,27	2,12
		2,98	1,98	2,32
	B2 (48 Jam)	3,87	2,68	2,17
		3,56	2,71	2,11
		3,87	2,42	2,09
	B3 (72 Jam)	2,98	2,83	1,38
		3,58	2,69	1,45
		3,38	2,84	1,67

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		jenis pelarut	lama ekstraksi	ulangan
N		27	27	27
Normal Parameters ^a	Mean	2.0000	2.0000	2.0000
	Std. Deviation	.83205	.83205	.83205
Most Extreme Differences	Absolute	.219	.219	.219
	Positive	.219	.219	.219
	Negative	-.219	-.219	-.219
Kolmogorov-Smirnov Z		1.0012	1.012	1.012
Asymp. Sig. (2-tailed)		.151	.151	.151
a. Test distribution is Normal.				

Perlakuan	Ulangan			Jumlah	Rata-rata	sd
	1	2	3			
A1B1	3,46	3,37	2,98	9,81	3,27	0,26
A1B2	3,87	3,56	3,87	11,3	3,77	0,18
A1B3	2,98	3,58	3,38	9,94	3,31	0,31
Jumlah	10,31	10,51	10,23	31,05		
A2B1	2,34	2,27	1,98	6,59	2,20	0,19
A2B2	2,68	2,71	2,42	7,81	2,60	0,16
A2B3	2,83	2,69	2,84	8,36	2,79	0,08
Jumlah	7,85	7,67	7,24	22,76		
A3B1	2,12	2,12	2,32	6,56	2,19	0,12
A3B2	2,17	2,11	2,09	6,37	2,12	0,04
A3B3	1,38	1,45	1,67	4,5	1,50	0,15
Jumlah	5,67	5,68	6,08	17,43		
Jumlah Total	23,83	23,86	23,55	71,24		

Perlakuan A	Perlakuan B			Jumlah	Rata-rata
	B 1	B 2	B 3		
A 1	9,81	11,3	9,94	31,05	10,35
A 2	6,59	7,81	8,36	22,76	7,586667
A 3	6,56	6,37	4,5	17,43	5,81
Jumlah	22,96	25,48	22,8		
Rata-rata	7,65	8,49	7,60		

Keterangan:

Perlakuan A = Pelarut

Perlakuan B = Lama Waktu

FK	187,97
JK Total	12,93
JK A	10,47
JK B	0,50
JK Interaksi	1,36
JK Galat	0,59

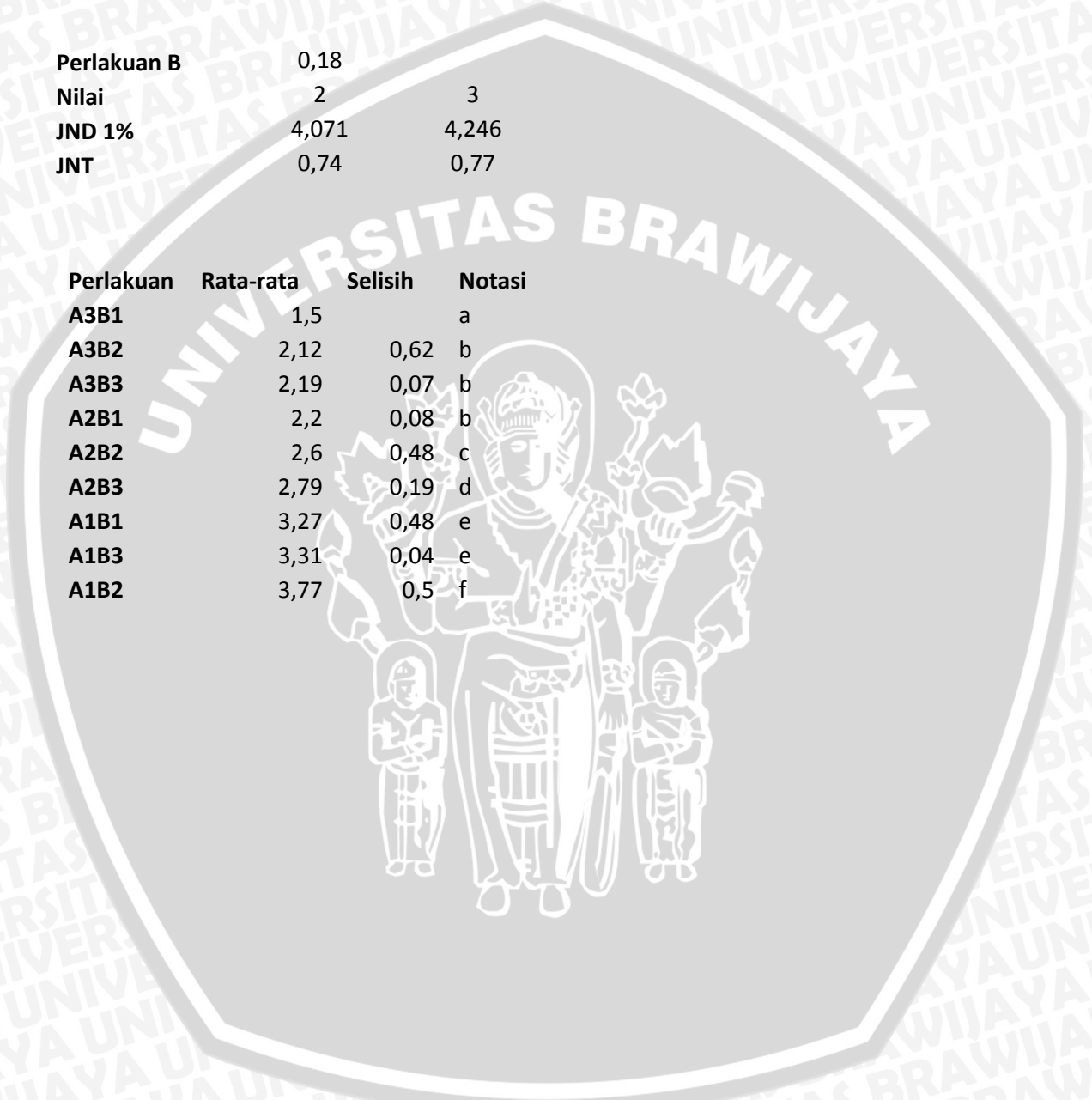
ANOVA							
SK	db	JK	KT	F hitung	F 0,05	F 0,01	Sig
Perlakuan A	2	10,47	5,23	158,43	3,55	6,01	**
Perlakuan B	2	0,50	0,25	7,60	3,55	6,01	**
Interaksi	4	1,36	0,34	10,31	2,93	4,58	**
Galat	18	0,59	0,03				
Total	26						

Uji Berganda Duncan's

Perlakuan A	0,18	
Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT (BNT)	0,74	0,77

Perlakuan B	0,18	
Nilai	2	3
JND 1%	4,071	4,246
JNT	0,74	0,77

Perlakuan	Rata-rata	Selisih	Notasi
A3B1	1,5		a
A3B2	2,12	0,62	b
A3B3	2,19	0,07	b
A2B1	2,2	0,08	b
A2B2	2,6	0,48	c
A2B3	2,79	0,19	d
A1B1	3,27	0,48	e
A1B3	3,31	0,04	e
A1B2	3,77	0,5	f



Lampiran 9. Foto proses MIC dan MFC tahap pertama



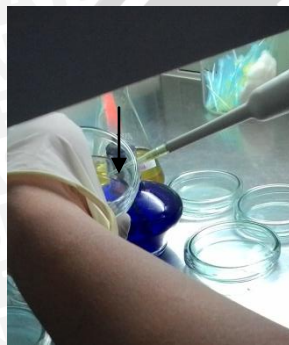
Penimbangan media PDA



Penambahan aquades



Sterilisasi suhu 121°C, tekanan 1 atm



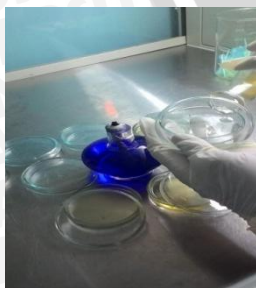
Dimasukan inokulum jamur sebanyak 50µL menggunakan *micro pipet*



Diambil inokulum jamur dari tabung rekasi sebanyak 50µL menggunakan *micro pipet*



Disiapkan cawan petri dan bunsen pada *laminary air flow*



Penuangan media PDA kemudian dihogenkan dengan membentuk angka delapan



Setelah media menjadi padat dilubangi dengan besi steril dengan diameter 5,5mm



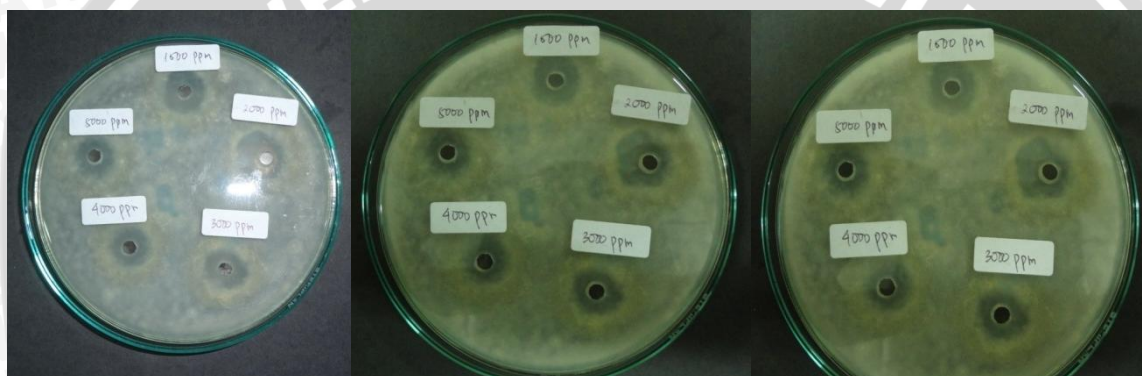
Media dan jamur uji yang sudah dubangi dan siap dimasukan ekstrak uji



Dimasukkan dalam inkubator suhu 30°C selama 48 jam



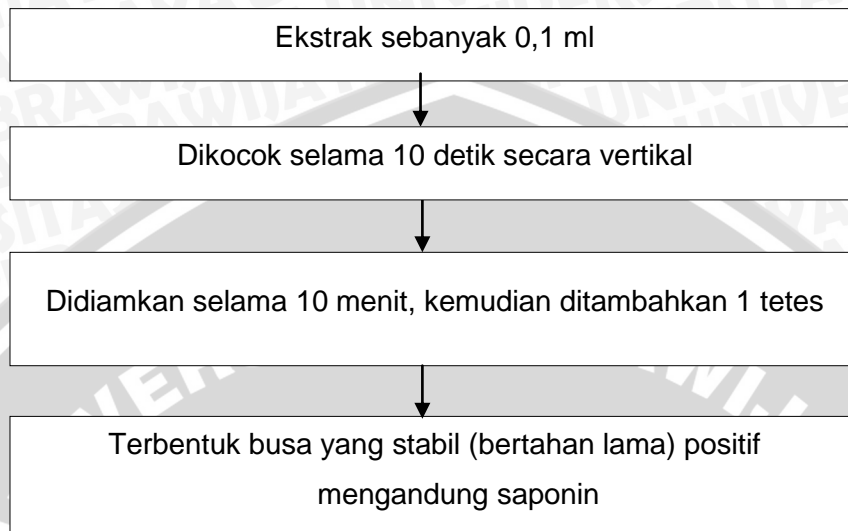
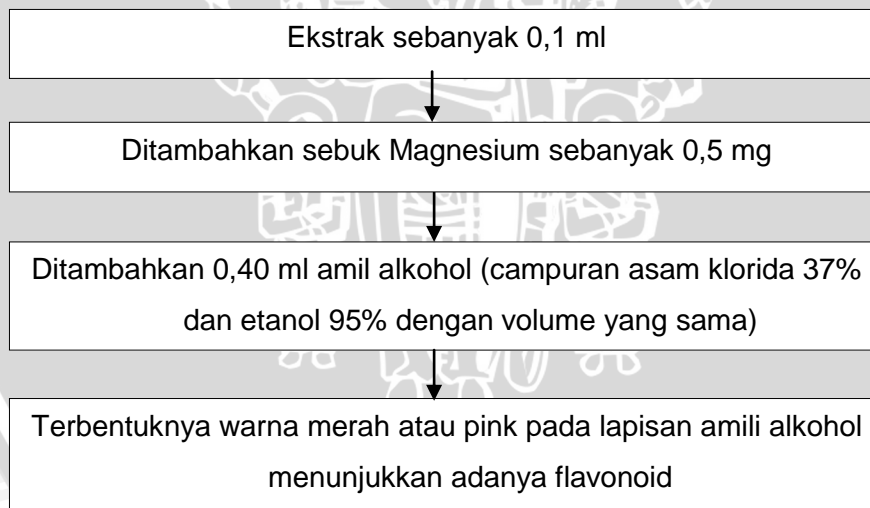
Dimasukkan ekstrak uji sebanyak 20µL pada setiap lubang

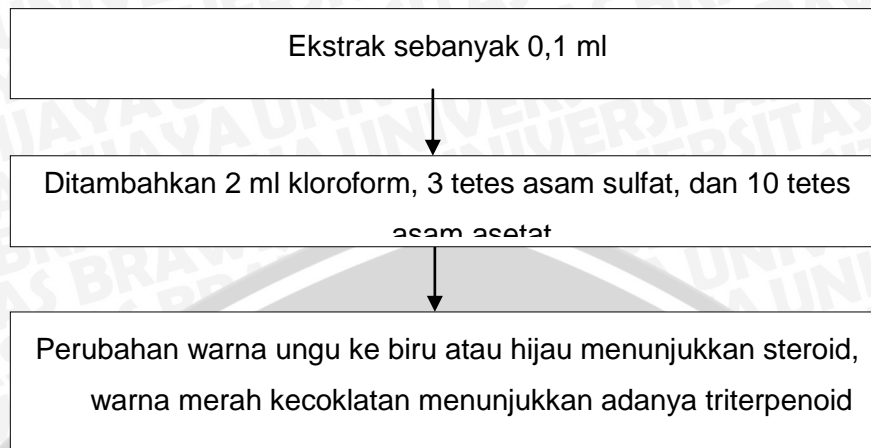
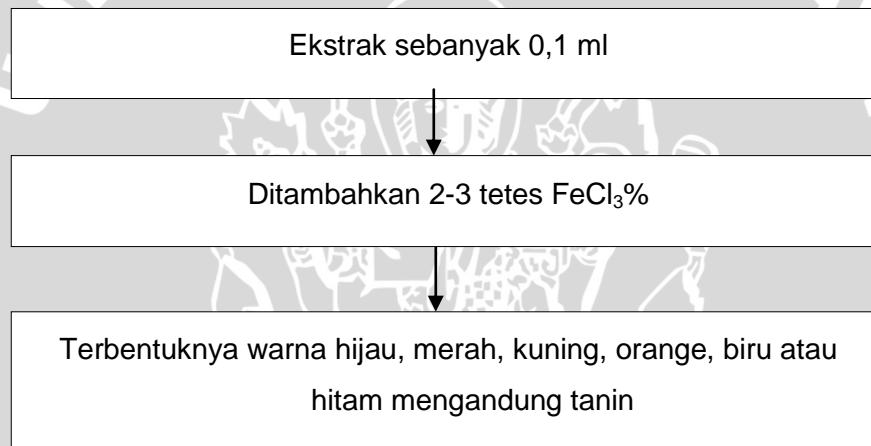


Hasil daya hambat ulangan 1

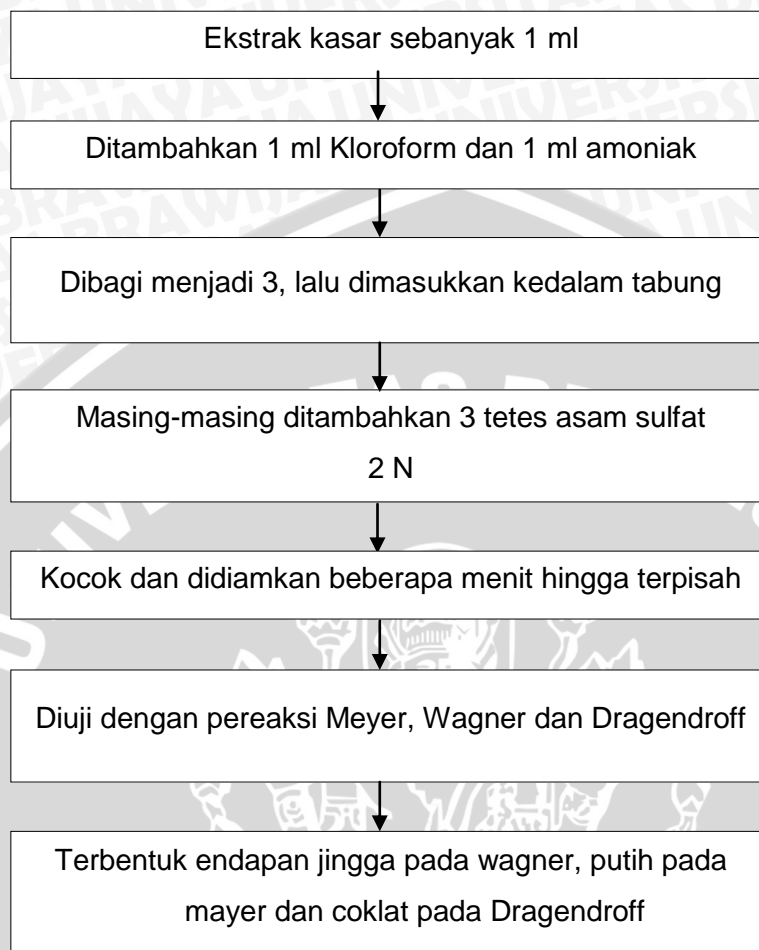
Hasil daya hambat ulangan 2

Hasil daya hambat ulangan 3

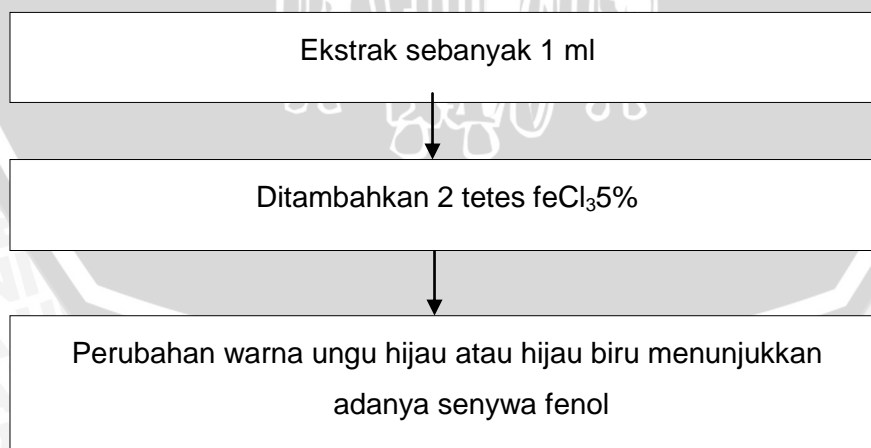
Lampiran 10. Skema Kerja Uji Fitokimia**a. Skema Proses Saponin****b. Skema Proses Flavonoid**

c. Skema Proses Triterpenoid/Steroid**d. Skema Proses Tanin**

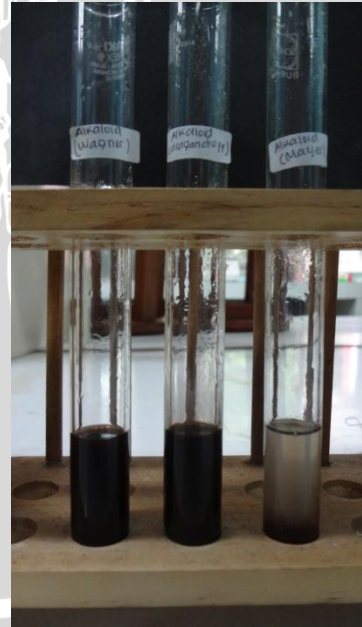
e. Skema Proses Alkaloid



f. Fenol



• Foto hasil pengujian kualitatif fitokimia



Lampiran 11. Hasil uji LCMS

Ekstrak kasar bertingkat *Chlorella vulgaris*

LC MS-ESI pos ion

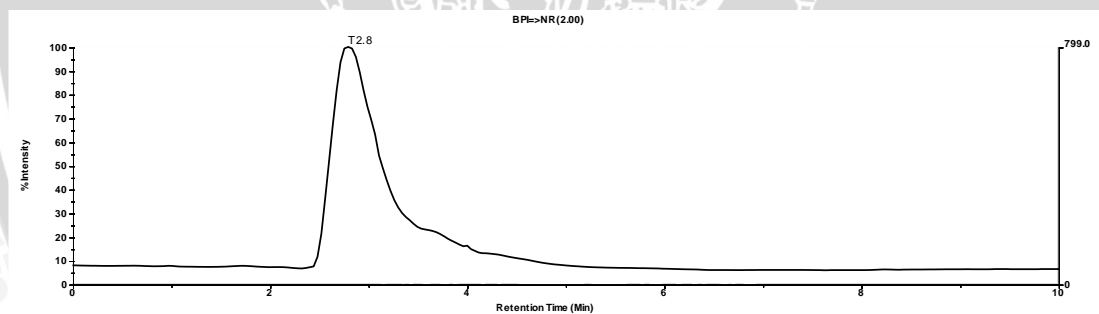
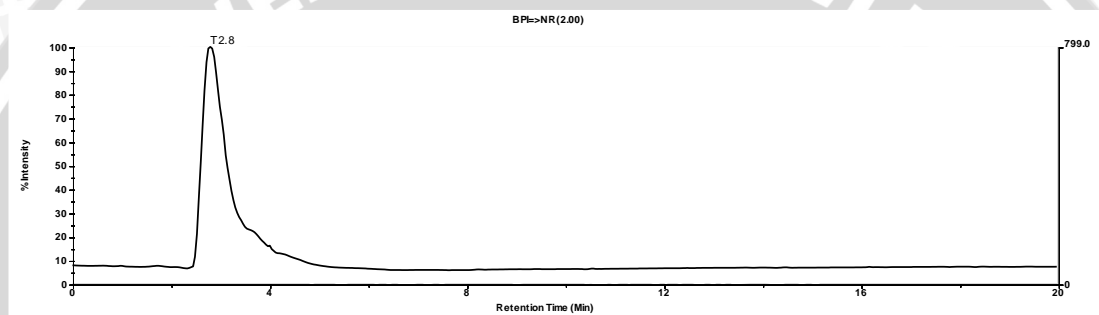
Vol injection 2 ul

Flow 0.1 ml/min

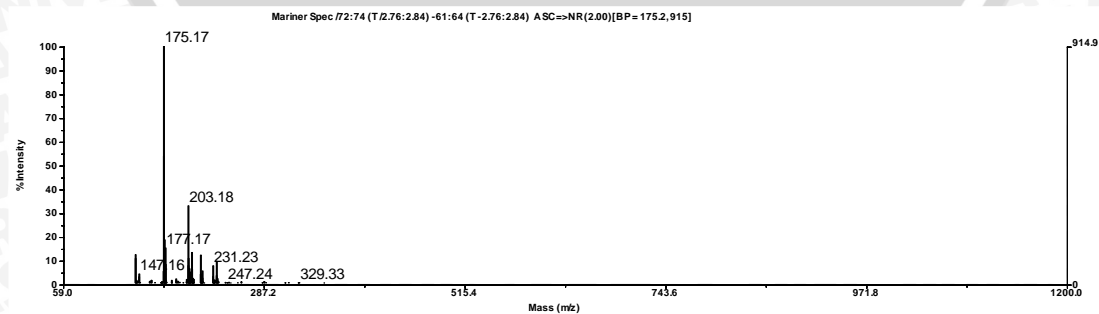
Collumn C-18 (15mm x 1 mm)

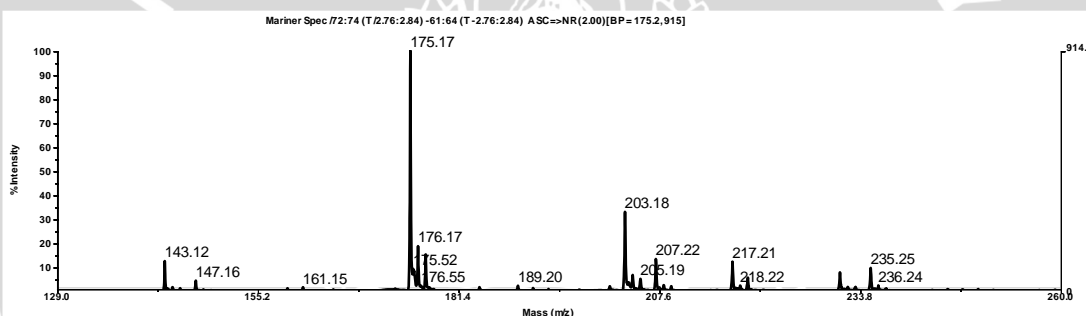
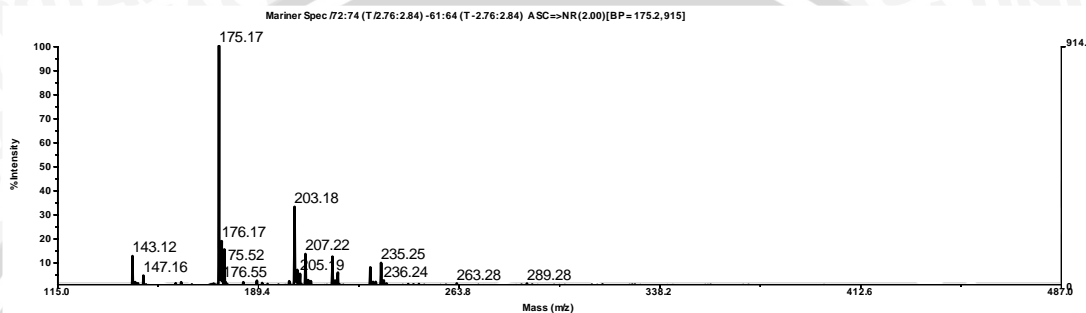
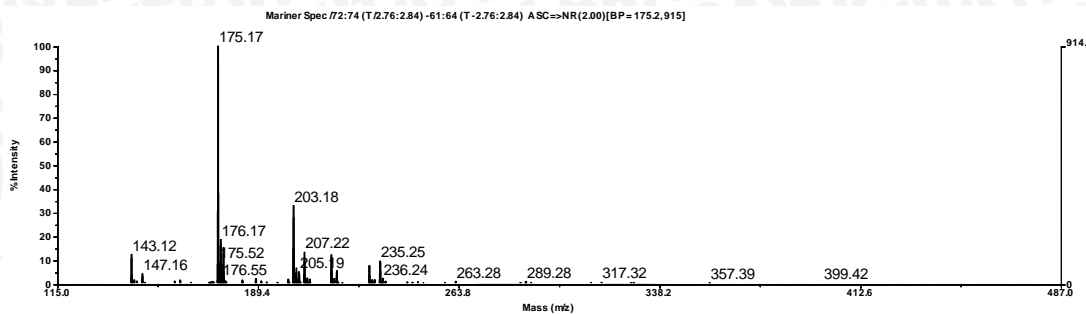
Eluent MeOH

Operating by :Puspa D N Lotulung



Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	2.796350	2.368233	6.412384	799	13559.28





Index	Centroid Mass	Relative Intensity	Area
1	143.119231	12.44	747.27
2	144.122018	1.64	101.23
3	145.117025	1.18	86.25
4	147.160922	4.31	298.99
5	148.151195	0.67	36.87
6	159.141531	1.16	97.19
7	161.146238	1.61	139.05
8	175.165605	100	6477.27
9	175.523921	9.21	44.24

10	175.67085	8.19	61.31
11	176.166177	18.63	1145.99
12	176.547506	2.18	44.1
13	177.167899	15.21	994.86
14	184.18707	1.6	103.86
15	189.200655	2.2	155.42
16	191.189633	1.25	105.97
17	193.194829	0.82	47.27
18	197.22684	0.58	71.74
19	199.654686	0.34	72.9
20	201.198859	1.98	153.35
21	203.184945	32.95	2492.38
22	203.684786	3.49	45.21
23	204.183253	6.68	426.08
24	205.191942	5.07	358.8
25	206.144307	0.45	41.9
26	207.223465	13.3	1024.67
27	207.653389	1.51	55.53
28	208.236013	2.45	158.96
29	209.208661	2.02	131.9
30	215.178498	0.43	45.36
31	217.214724	12.22	878.56
32	218.21891	2.27	143.2
33	219.201658	5.56	438.16
34	219.642244	0.75	59.54
35	220.199792	0.43	32.63
36	221.237153	0.49	47.36
37	231.234253	7.72	557.9
38	232.247096	1.71	107.6
39	233.238632	1.71	135.28
40	235.246066	9.6	711.1
41	236.237694	2.32	105.27

42	237.227649	1.07	89.23
43	243.283458	0.44	40.76
44	244.226775	0.29	34.38
45	245.286623	0.76	86.6
46	247.235658	0.66	67.08
47	249.257939	0.8	62.4
48	259.300267	0.51	45.77
49	263.283557	1.06	81.61
50	271.285704	0.45	42.95
51	273.295581	0.31	40.27
52	287.286512	0.57	57.35
53	289.282317	0.99	95.76
54	291.274433	0.59	49.19
55	299.361518	0.45	33.69
56	301.297618	0.33	37.91
57	303.32893	0.43	35.45
58	313.325063	0.54	44.16
59	315.364752	0.44	33.43
60	317.324983	0.65	61.7
61	327.337196	0.42	37.43
62	328.356301	0.57	51.48
63	329.331291	0.57	47.62
64	343.382156	0.35	38.72
65	355.366147	0.36	33.14
66	356.352406	0.37	34.57
67	371.419753	0.41	48.41

Sample
Vol injection 2 ul
Flow rate 0.1 ml/min
Eluent Methanol
LC-MS : Mariner Biospectrometry
LC: Hitachi L 6200

System ESI (Electrospray Ionisation)	
Positive ion mode	
Kolom C18 (RP 18) Phenomenex	
Column length	: 150 mm
ID	: 1 mm
Particle size	: 5 µm
Analysis by : Puspa .D. Lotulung, PusatPenelitian Kimia – LIPI	

BPI = BasePeak Intensity
BP = BasePeak
TIC = Total Ion Chromatogram
NR = NoiseRemoval
BC = Base Correction
MC = Mass Calibration
BP = BasePeak
CT = Centroiding
SM = Gaussian smooth

Temperaturkolom = temp ruangan
;isokratik, Detector massa

Method : positive ion

Lampiran 12. Skema kerja dan Perhitungan DMSO 10% Konsentrasi 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm dan 1000 ppm.

- DMSO 10% = 10 ml DMSO murni dilarutkan dalam 100 ml aquades.

$$= \frac{10}{100} \times 100 \%$$

$$= 10\%$$

- Pembuatan 5000 ppm

$$5.000 : 1.000.000$$

$$5 : 1000$$

0,05 mg : 10 ml karena hanya membutuhkan 10 ml larutan.

0,05 mg sampel dilarutkan ke dalam 10 ml DMSO 10%.

- Pembuatan 4000 ppm

$$= \frac{x}{5000} \rightarrow \text{konsentrasi yang akan dibuat}$$

$$= \frac{4000}{5000}$$

$$= 0,8$$

Dibuat dalam 10 ml (DMSO + ekstrak)

Jadi, $0,8 \times 10$ (jumlah larutan yang akan dibuat)

$$= 8 \text{ ml (diambil dari konsentrasi 5000 ppm)}$$

Karena volume keseluruhan yang akan dibuat adalah 10 ml, jadi larutan DMSO

10% ditambahkan sebanyak:

$$8 + x = 10 \text{ ml} \rightarrow \text{volume keseluruhan}$$

↳ Dari konsentrasi 5000 ppm

$$x = 10 - 8$$

$$x = 2 \text{ ml larutan DMSO 10\%}$$

- Pembuatan 3000 ppm

$$\begin{aligned}
 &= \frac{x}{4000} \rightarrow \text{konsentrasi yang akan dibuat} \\
 &= \frac{3000}{4000} \\
 &= 0,75
 \end{aligned}$$

Jadi $0,75 \times 10$ (jumlah larutan yang akan dibuat)

$$= 7,5 \text{ ml (diambil dari konsentrasi 4000 ppm)}$$

Jadi larutan DMSO 10% ditambah sebanyak:

$$7,5 + x = 10 \text{ ml} \rightarrow \text{volume keseluruhan}$$

↳ Dari konsentrasi 4000 ppm

$$x = 10 - 7,5$$

$$x = 2,5 \text{ ml larutan DMSO 10\%}$$

- Pembuatan 2000 ppm

$$\begin{aligned}
 &= \frac{x}{3000} \rightarrow \text{konsentrasi yang akan dibuat} \\
 &= \frac{2000}{3000} \\
 &= 0,67
 \end{aligned}$$

Jadi $0,67 \times 10$ (jumlah larutan yang akan dibuat)

$$= 6,7 \text{ ml (diambil dari konsentrasi 3000 ppm)}$$

Jadi larutan DMSO 10% ditambah sebanyak:

$$6,7 + x = 10 \text{ ml} \rightarrow \text{volume keseluruhan}$$

↳ Dari konsentrasi 4000 ppm

$$x = 10 - 6,7$$

$$x = 3,3 \text{ ml larutan DMSO 10\%}$$

- Pembuatan 1000 ppm


$$\begin{aligned} &= \frac{x}{2000} \rightarrow \text{konsentrasi yang akan dibuat} \\ &= \frac{1000}{2000} \\ &= 0,5 \end{aligned}$$

Jadi $0,5 \times 10$ (jumlah larutan yang akan dibuat)

= 5 ml (diambil dari konsentrasi 2000 ppm)

Jadi larutan DMSO 10% ditambah sebanyak:

$$5 + x = 5 \text{ ml} \rightarrow \text{volume keseluruhan}$$

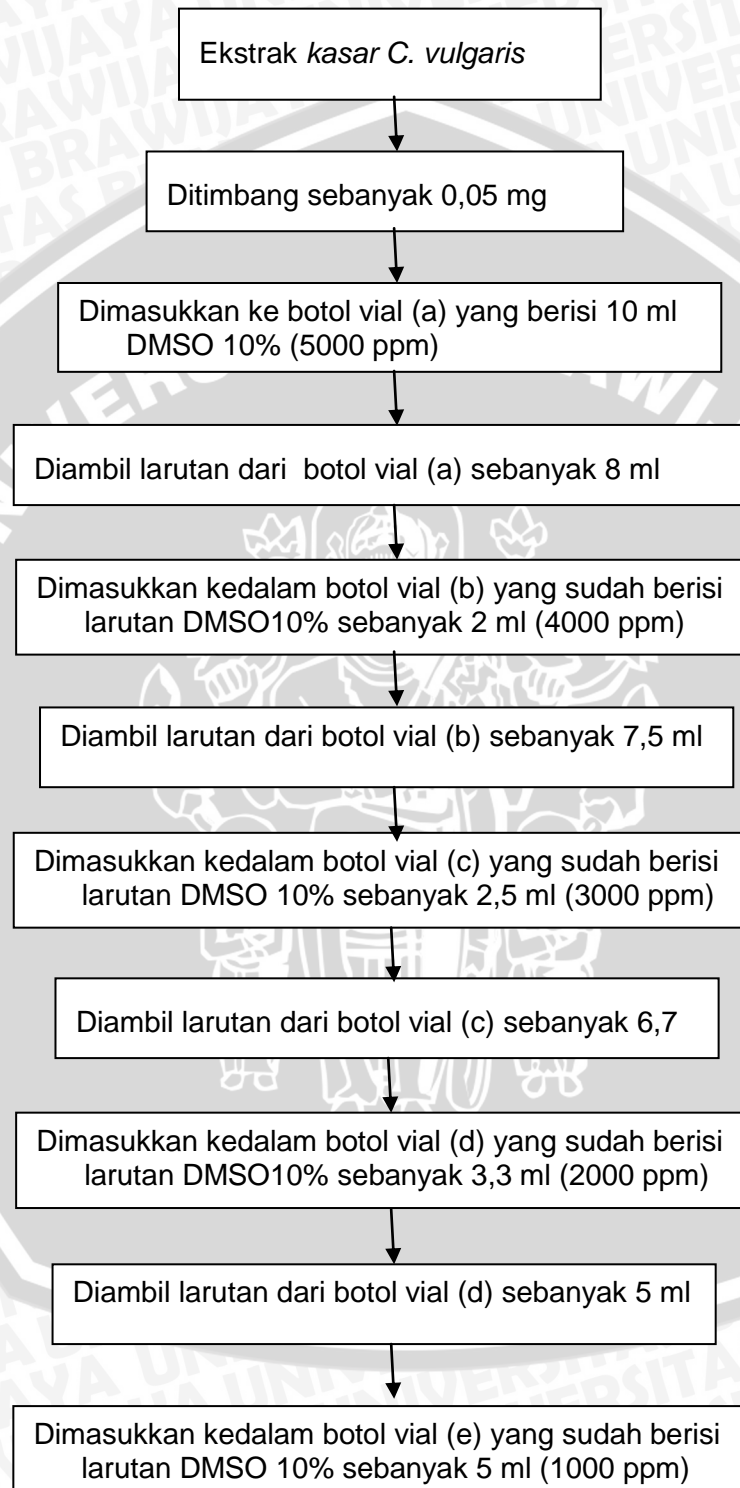
 Dari konsentrasi 2000 ppm

$$x = 10 - 5$$

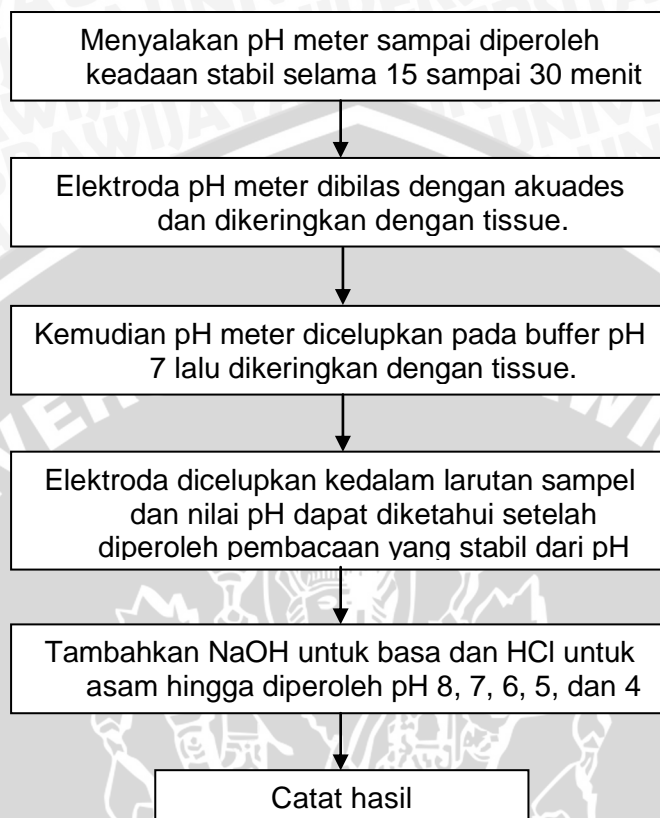
$$x = 5 \text{ ml larutan DMSO 10\%}$$



- Skema Kerja Pembuatan DMSO 10% dengan Konsentrasi 5000 ppm, 4000 ppm, 3000 ppm, 2000 ppm, 1000 ppm



Lampiran 13. Skema kerja dan Proses pembuatan ekstrak dengan perlakuan pH



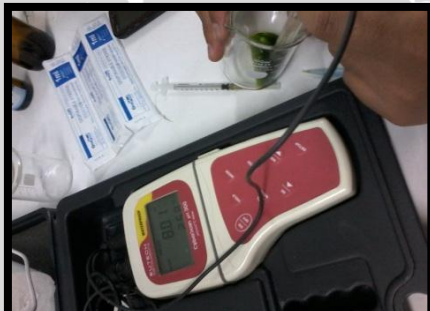
- Proses Pembuatan Larutan Ekstrak Kasar *Chlorella vulgaris* pH 8, 7, 6, 5, 4



pH meter dinyalakan dan ditunggu hingga keadaan stabil



Elektroda pH dibilas dengan aquades



Elektroda dicelupkan kedalam sampel dan ditunggu hingga nilai pH stabil



pH meter dicelupkan pada buffer pH 7 dan dikeringkan dengan



Tambahkan NaOH untuk basa dan HCl untuk asam hingga diperoleh pH 8, 7, 6, 5, dan 4



Ekstrak kasar *S. costatum* pH 8, 7, 6, 5, dan 4

Lampiran 14. Uji Pengaruh pH ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap kapang *Aspergillus niger*

Perlakuan pH	Ulangan		
	1	2	3
4	8,33	7,87	7,88
5	7,68	7,41	9,21
6	8,69	8,82	7,41
7	8,31	9,23	8,85
8	10,69	10,92	10,86

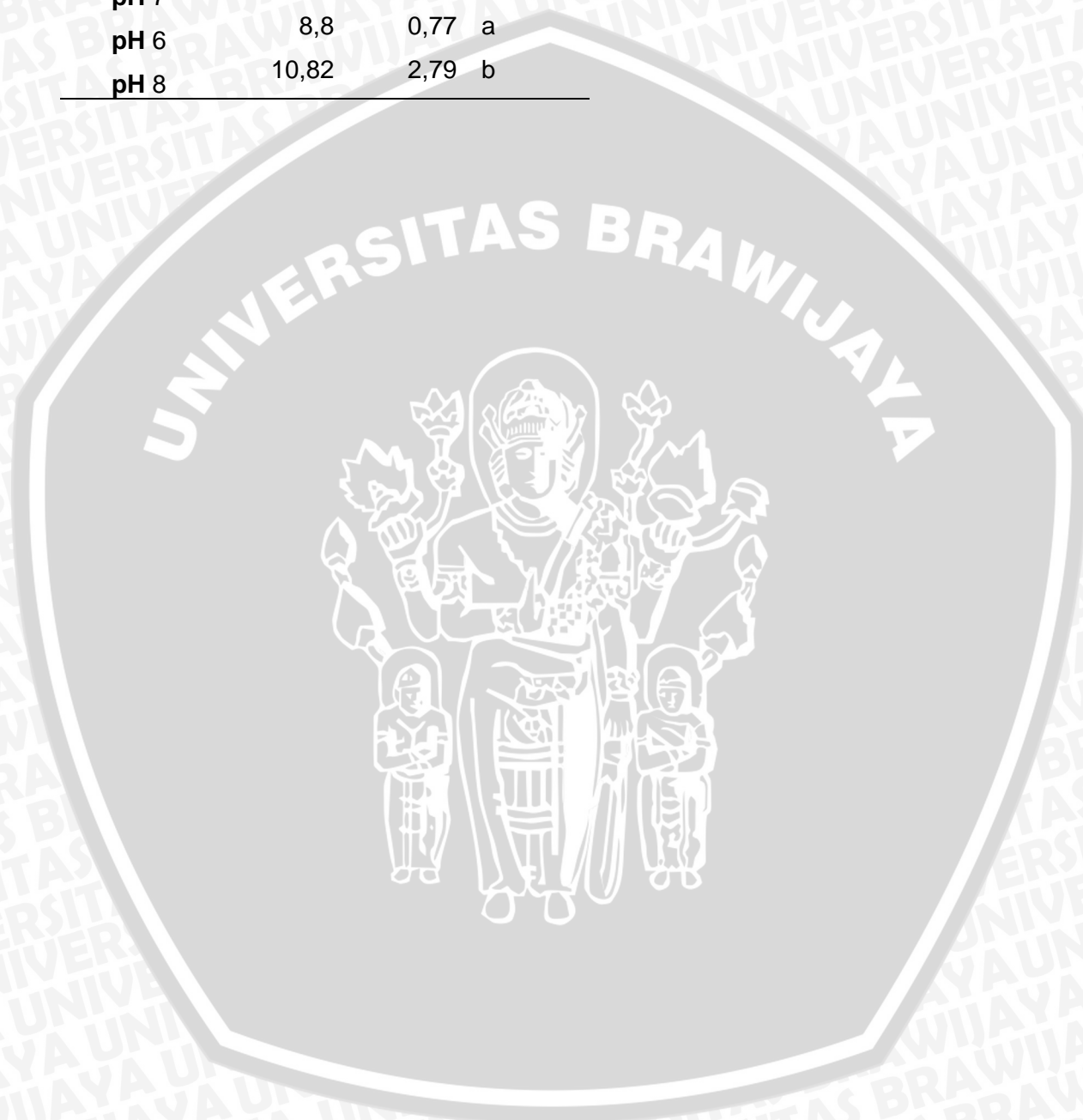
Sampel	Ulangan			TOTAL	RERATA	SD
	I	II	III			
pH 4	8,33	7,87	7,88	24,08	8,03	0,26
pH 5	7,68	7,41	9,21	24,3	8,10	0,97
pH 6	8,69	8,82	7,41	24,92	8,31	0,78
pH 7	8,31	9,23	8,85	26,39	8,80	0,46
pH 8	10,69	10,92	10,86	32,47	10,82	0,12
TOTAL	43,7	44,25	44,21	132,16		

FK	1164,42	
JK TOTAL	19,97	
JK PERLAKUAN	1180,69	16,27
JK GALAT	3,69	

ANOVA						
SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	4	16,27	4,07	12,12	3,36	5,67
Galat	11	3,69	0,34			
Total	15	19,97	1,33			

T tabel	1,79588
BNT 5%	0,84962819

SAMPEL	RERATA	SELISIH	NOTASI
pH 4	8,03		a
pH 5	8,1	0,07	a
pH 7	8,31	0,28	a
pH 6	8,8	0,77	a
pH 8	10,82	2,79	b

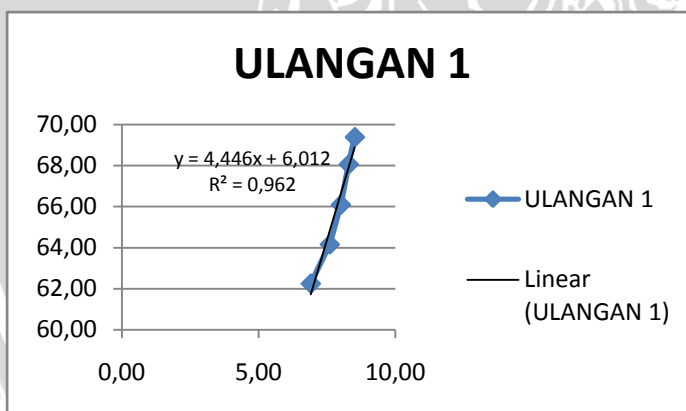


Lampiran 15. Perhitungan MIC dan MFC tahap kedua

- Perhitungan MIC dan MFC perlakuan pH 4

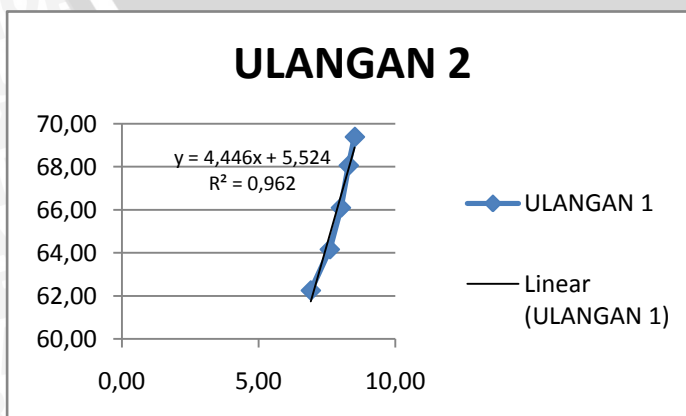
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	7,89	7,45	7,41
2000	8,01	7,51	7,52
3000	8,13	7,68	7,61
4000	8,25	7,75	7,68
5000	8,33	7,86	7,88

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	62,25	55,50	54,91
7,60	64,16	56,40	56,55
8,01	66,10	58,98	57,91
8,29	68,06	60,06	58,98
8,52	69,39	61,78	62,09



MIC= 6,012 X 0,25= 1,50

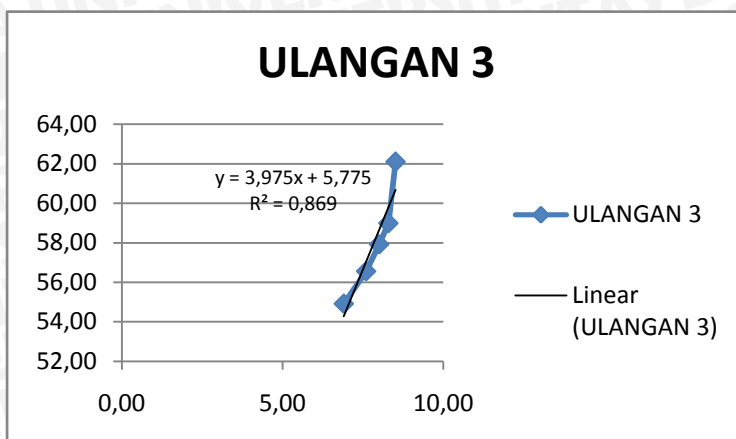
MFC= 1,50 X 4 = 6,01



MIC= 5,524 X 0,25 = 1,41

MFC= 1,41 X 4 = 5,52

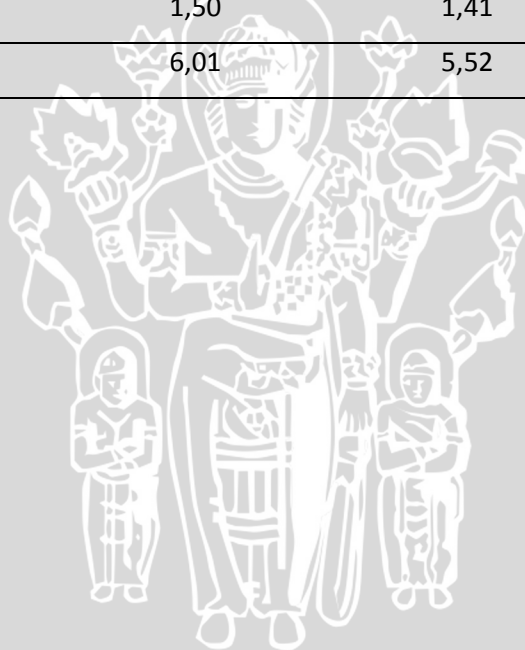




MIC= $5,77 \times 0,25 = 1,44$

MFC= $1,44 \times 4 = 5,77$

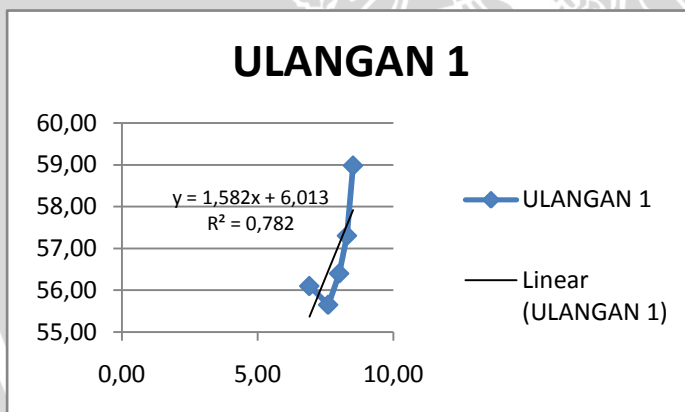
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	1,50	1,41	1,44
MFC	6,01	5,52	5,77



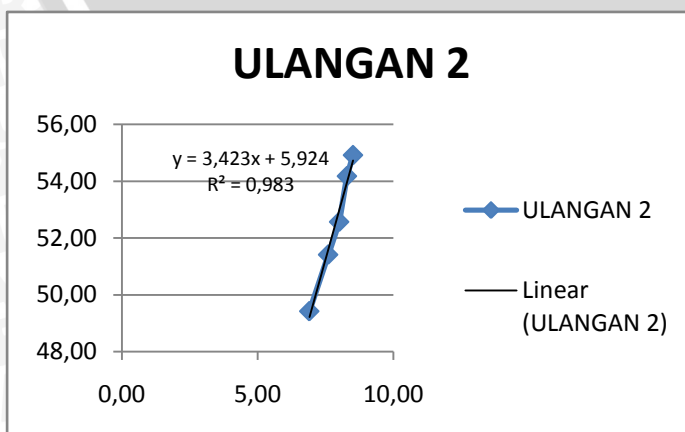
• Perhitungan MIC dan MFC perlakuan pH 5

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	7,49	7,03	8,72
2000	7,46	7,17	8,87
3000	7,51	7,25	9,01
4000	7,57	7,36	9,11
5000	7,68	7,41	9,21

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	56,10	49,42	76,04
7,60	55,65	51,41	78,68
8,01	56,40	52,56	81,18
8,29	57,30	54,17	82,99
8,52	58,98	54,91	84,82



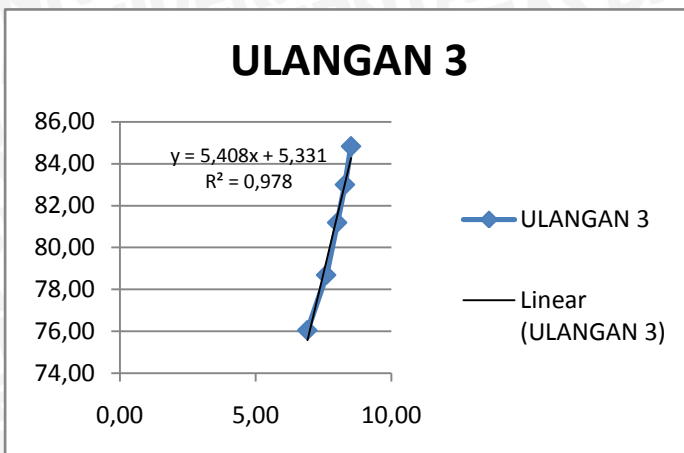
MIC = $6,013 \times 0,25 = 1,50$
MFC = $1,50 \times 4 = 6,01$



MIC = $5,924 \times 0,25 = 1,48$
MFC = $1,48 \times 4 = 5,92$



ULANGAN 3

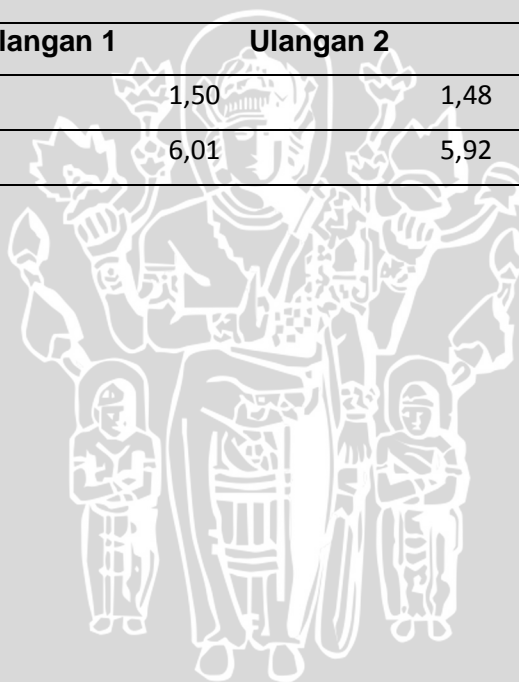


MIC= 5,331 X 0,25=

1,33

MFC= 1,33X 4= 5,33

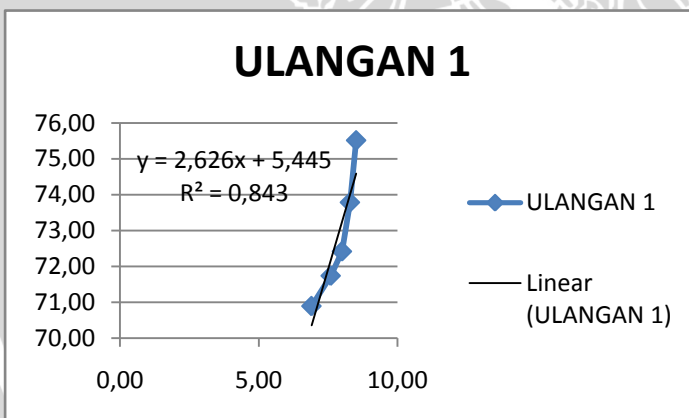
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	1,50	1,48	1,33
MFC	6,01	5,92	5,33



• Perhitungan MIC dan MFC perlakuan pH 6

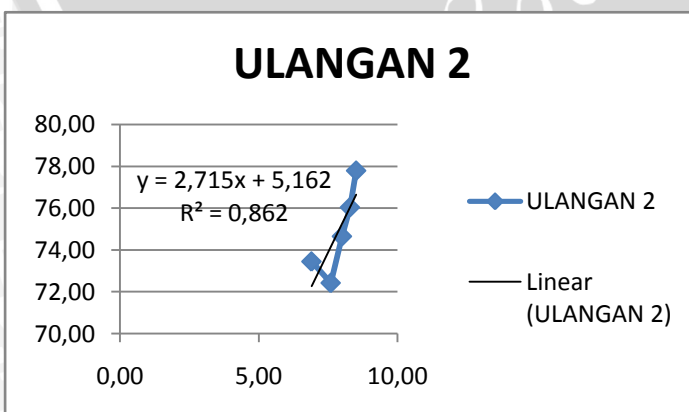
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	8,42	8,57	7,11
2000	8,47	8,51	7,17
3000	8,51	8,64	7,22
4000	8,59	8,72	7,29
5000	8,69	8,82	7,41

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	70,90	73,44	50,55
7,60	71,74	72,42	51,41
8,01	72,42	74,65	52,13
8,29	73,79	76,04	53,14
8,52	75,52	77,79	54,91



MIC = $5,445 \times 0,25 = 1,36$

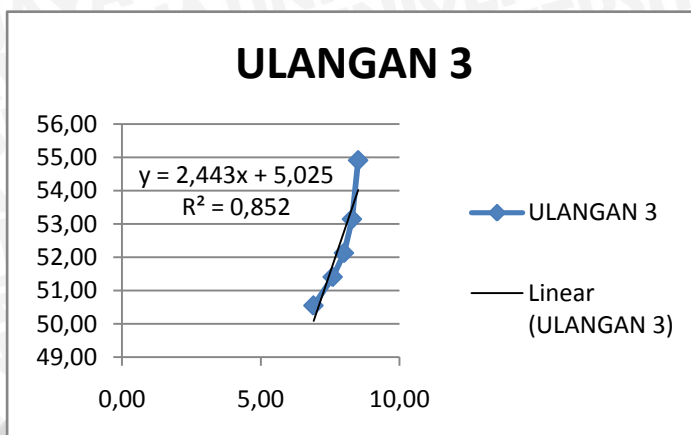
MFC = $1,36 \times 4 = 5,44$



MIC = $5,162 \times 0,25 = 1,29$



$MFC = 1,29 \times 4 = 5,16$



$MIC = 5,025 \times 0,25 =$

1,26

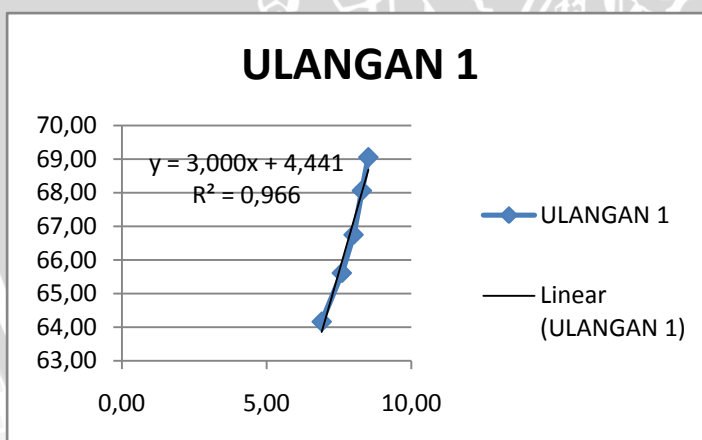
$MFC = 1,26 \times 4 = 5,02$

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	1,36	1,29	1,26
MFC	5,44	5,16	5,02

• Perhitungan MIC dan MFC perlakuan pH 7

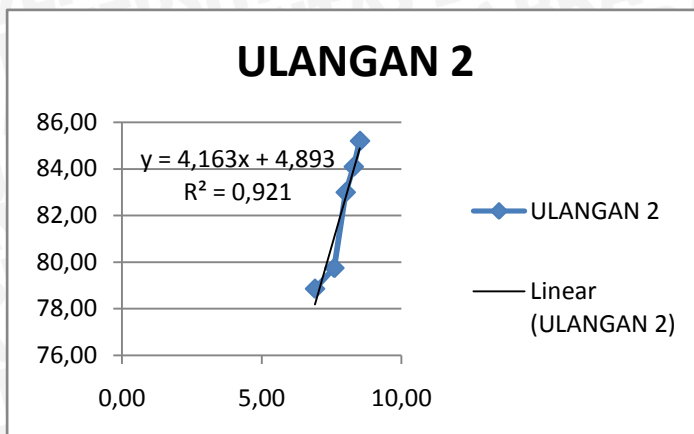
Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	8,01	8,88	8,53
2000	8,1	8,93	8,62
3000	8,17	9,11	8,71
4000	8,25	9,17	8,77
5000	8,31	9,23	8,85

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	64,16	78,85	72,76
7,60	65,61	79,74	74,30
8,01	66,75	82,99	75,86
8,29	68,06	84,09	76,91
8,52	69,06	85,19	78,32



MIC = $4,441 \times 0,25 = 1,11$
 MFC = $1,11 \times 4 = 4,44$

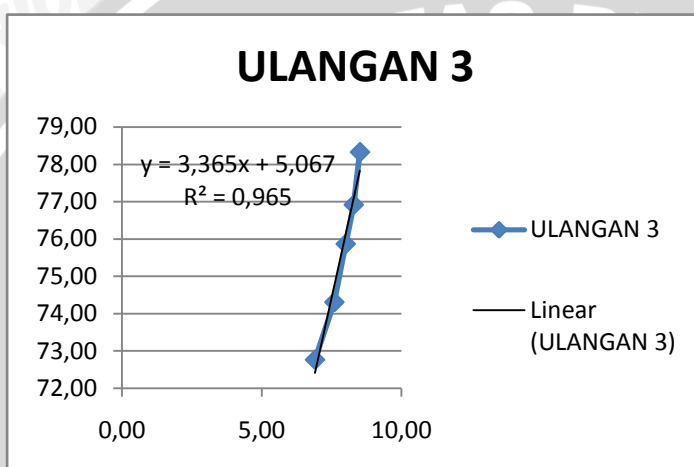




MIC= $4,893 \times 0,25 =$

1,24

MFC= $1,24 \times 4 = 4,89$



MIC= $5,067 \times 0,25 = 1,27$

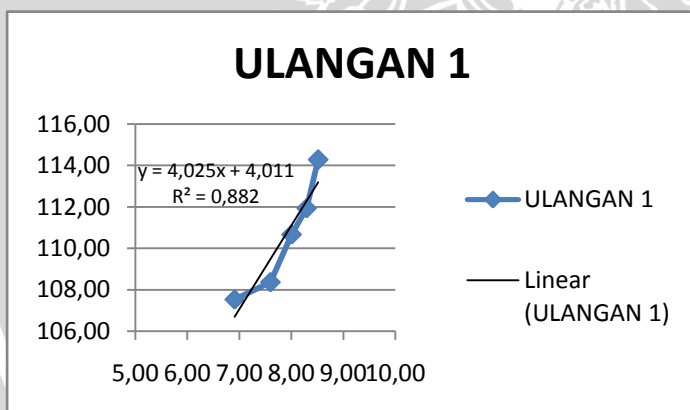
MFC= $1,27 \times 4 = 5,06$

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	1,11	1,25	1,27
MFC	4,44	4,89	5,06

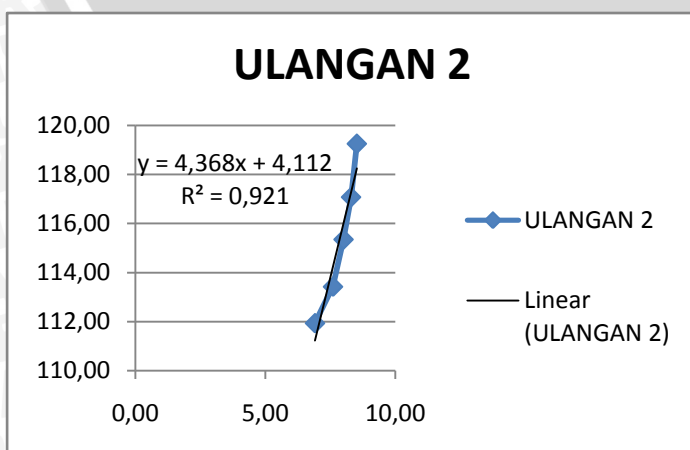
• Perhitungan MIC dan MFC perlakuan pH 8

Konsentrasi ppm	Ulangan		
	1	2	3
1000	10,37	10,58	10,56
2000	10,41	10,65	10,63
3000	10,52	10,74	10,71
4000	10,58	10,82	10,78
5000	10,69	10,92	10,86

Sumbu X	Sumbu Y 1	Sumbu Y 2	Sumbu Y 3
6,91	107,54	111,94	111,51
7,60	108,37	113,42	113,00
8,01	110,67	115,35	114,70
8,29	111,94	117,07	116,21
8,52	114,28	119,25	117,94

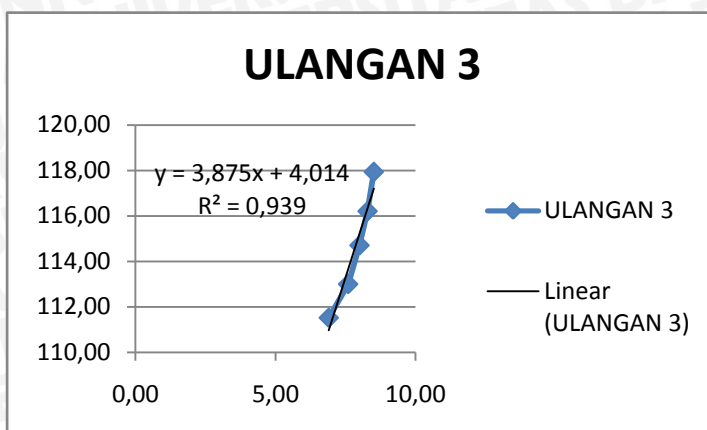


MIC= $4,011 \times 0,25 = 1,00$
 MFC= $1,00 \times 4 = 4,01$



MIC= $4,112 \times 0,25 = 1,04$
 MFC= $1,04 \times 4 = 4,11$



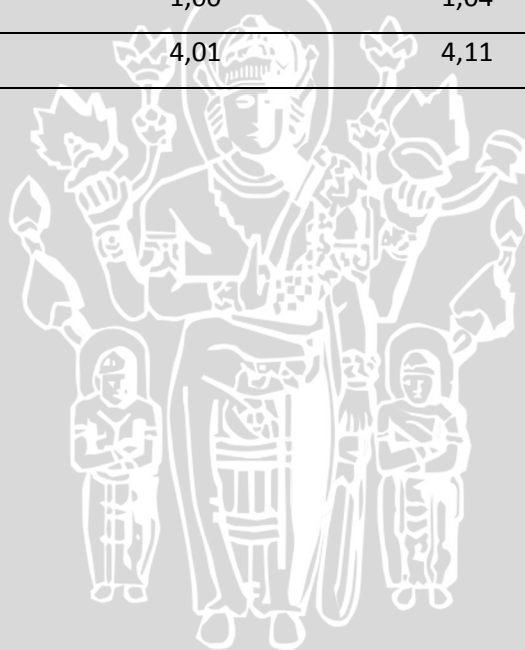


MIC= 4,014 X 0,25=

1,00

MFC= 1,00 X 4= 4,01

	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
MIC	1,00	1,04	1,00
MFC	4,01	4,11	4,01



Lampiran 16. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Tahap Kedua

Perlakuan Ph	Ulangan		
	1	2	3
pH 4	1,50	1,41	1,44
pH 5	1,50	1,48	1,33
pH 6	1,36	1,29	1,26
pH 7	1,11	1,25	1,27
pH 8	1,00	1,04	1,00

Sampel	Ulangan			TOTAL	RERATA	SD
	I	II	III			
pH 4	1,50	1,41	1,44	4,35	1,45	0,05
pH 5	1,50	1,48	1,33	4,32	1,44	0,09
pH 6	1,36	1,29	1,26	3,91	1,30	0,05
pH 7	1,11	1,25	1,27	3,62	1,21	0,08
pH 8	1,00	1,04	1,00	3,05	1,02	0,02
TOTAL	6,48	6,46	6,30	19,24		

FK	24,67	
JK TOTAL	0,43	
JK PERLAKUAN	25,06	0,39
JK GALAT	0,04	

ANOVA

	SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan		4	0,39	0,10	24,93	3,36	5,67
Galat		11	0,04	0,00			
Total		15	0,43	0,03			

T tabel	1,79588
BNT 5%	0,09166255

SAMPEL	RERATA	SELISIH	NOTASI
pH 8	1,02		a
pH 4	1,21	0,19	b
pH 5	1,30	0,09	b
pH 7	1,44	0,23	c
pH 6	1,45	0,01	c



Lampiran 17. Uji MFC (*Minimum Fungicidal Concentration*) Tahap Kedua

Perlakuan Ph	Ulangan		
	1	2	3
pH 4	6,01	5,52	5,77
pH 5	6,01	5,92	5,33
pH 6	5,44	5,16	5,02
pH 7	4,44	4,89	5,06
pH 8	4,01	4,11	4,01

Sampel	Ulangan			TOTAL	RERATA	SD
	I	II	III			
pH 4	6,01	5,52	5,77	17,3	5,77	0,25
pH 5	6,01	5,92	5,33	17,26	5,75	0,37
pH 6	5,44	5,16	5,02	15,62	5,21	0,21
pH 7	4,44	4,89	5,06	14,39	4,80	0,32
pH 8	4,01	4,11	4,01	12,13	4,04	0,06
TOTAL	25,91	25,6	25,19	76,7		

FK 392,19

JK TOTAL 6,97

JK PERLAKUAN 398,46 6,27

JK GALAT 0,70

ANOVA

SK	db	JK	KT	Fhitung	F5%	F1%
Perlakuan	4	6,27	1,57	24,77	3,36	5,67
Galat	11	0,70	0,06			
Total	15	6,97	0,46			

T tabel 1,79588

BNT 5% 0,86892997

SAMPEL	RERATA	SELISIH	NOTASI
pH 8	4,04		a
pH 4	4,8	0,76	b
pH 5	5,21	0,41	b
pH 7	5,75	0,95	c
pH 6	5,77	0,02	c



Lampiran 18. Perhitungan Media MHB dan MHA, PDB dan PDA**• Perhitungan Media MHB**

$$\text{MHB} = \frac{13}{1000} \times \text{jumlah tabung reaksi} \times \text{volume aquades (tabung reaksi)}$$

$$\text{MHB} = \frac{13}{1000} \times 3 \times 10$$

$$\text{MHB} = 0,39 \text{ gram}$$

• Perhitungan Media MHA

$$\text{MHA} = \frac{34}{1000} \times \text{jumlah cawan petri} \times \text{volume aquades (cawan petri)}$$

$$\text{MHA} = \frac{34}{1000} \times 27 \times 20$$

$$\text{MHA} = 18,36 \text{ gram}$$

• Perhitungan Media PDB

$$\text{PDB} = \frac{24}{1000} \times \text{jumlah tabung reaksi} \times \text{volume aquades (tabung reaksi)}$$

$$\text{PDB} = \frac{24}{1000} \times 3 \times 10$$

$$\text{PDB} = 0,72 \text{ gram}$$

• Perhitungan Media PDA

$$\text{PDA} = \frac{39}{1000} \times \text{jumlah cawan petri} \times \text{volume aquades (cawan petri)}$$

$$\text{PDA} = \frac{39}{1000} \times 27 \times 20$$

$$\text{PDA} = 21,06$$

Lampiran 19. Perhitungan konversi dari rpm menjadi satuan G

Adapun rumus perhitungan konversi dari rpm menjadi satuan G menurut Listiawati (2007), sebagai berikut:

$$RCF = 11.18^{-6} \times r \times N^2$$

Keterangan:

RCF : Relative Centrifugal Force (G)

r : jari-jari yang diukur dari pusat rotor (sumbu rotasi) (cm)

N : kecepatan dalam satuan rpm (*revolutions per minute*)

Di ketahui : r= 5,5 cm

N= 5000RPM

Ditanya = berapa RCF?

Jawab =

$$\begin{aligned} RCF &= 11.18^{-6} \times r \times N^2 \\ &= 11.18^{-6} \times 5,5 \times 5000^2 \\ &= 1537 \text{ G} \end{aligned}$$

