

**UJI DAYA HAMBAT DAN STABILITAS EKSTRAK KASAR
MIKROALGA *Tetraselmis chuii* TERHADAP AKTIVITAS BAKTERI
*Morganella morganii***

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Oleh :
DEWI ANGGRAINI A
NIM. 115080300111090**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**UJI DAYA HAMBAT DAN STABILITAS EKSTRAK KASAR MIKROALGA
Tetraselmis chuii TERHADAP AKTIVITAS BAKTERI *Morganella morganii***

Oleh :
DEWI ANGGRAINI A
NIM. 115080300111090

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 15 Februari 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Titik Dwi Sulistiati, MP
NIP. 19581231 198601 2 002
Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. Hardoko, MS
NIP. 19620108 1998802 1 001
Tanggal :

Dosen Penguji II

Dr. Ir. Bambang Budi S., MS
NIP. 19570119 198601 1 001
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP
NIP: 19680919 200501 1 001
Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal:

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, 27 Februari 2016
Mahasiswa

Dewi Anggraini A

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah memberikan rahmat berupa Kesehatan kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi ini, tak lupa juga kepada junjungan Nabi Besar Muhammad SAW. Ucapan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada:

- Kedua orang tua saya Ibu Hainiah dan Bapak Sahdim Mulyadi yang telah dengan sabar dan ikhlas serta senantiasa mendukung saya sehingga saya mampu menyelesaikan laporan ini, terima kasih juga karena telah bersedia menerima segala keluh kesah saya dan semua ini saya persembahkan khusus untuk bapak dan ibu. Saudara-saudara saya di Lombok, terima kasih atas dukungan dan semangat yang kalian berikan kepada saya.
- Kedua pembimbing saya, bapak Dr. Ir. Hardoko, MS dan bapak Dr. Ir. M. Firdaus selaku dosen pembimbing saya selama skripsi, terima kasih atas bimbingan dan ketelitian bapak dalam mengoreksi laporan ini hingga laporan ini dapat terselesaikan dengan baik.
- Terima kasih kepada sahabat-sahabat saya, yang telah bersedia saya jadikan pendengar setia dan siap saya culik ketika saya ingin berkeluh kesah ketika saya menyelesaikan Skripsi ini.
- Terima kasih pula kepada teman-teman Kertosari 22 dan teman-teman THP 2011 yang selalu memberikan semangat kepada saya dalam menyelesaikan skripsi ini.

RINGKASAN

DEWI ANGGRAINI A. Skripsi tentang Uji Daya Hambat dan Stabilitas Ekstrak Kasar Mikroalga *Tetraselmis chuii* terhadap Aktivitas Bakteri *Morganella morganii* (di bawah bimbingan **Dr. Ir. HARDOKO, MS** dan **Dr. Ir. M. FIRDAUS, MP**).

Mikroalga merupakan salah satu jenis sumberdaya perairan yang belum dimanfaatkan dengan optimal. Kandungan bioaktif dalam mikroalga mampu diaplikasikan sebagai antimikroba, terutama dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Salah satu mikroalga yang memiliki potensi untuk dijadikan antimikroba yaitu *Tetraselmis chuii*. *Morganella morganii* termasuk dalam bakteri patogen dimana bakteri ini mampu merombak histidin menjadi histamin oleh enzim histidin dekarboksilase dari *Morganella morganii*. Adanya kandungan histamin inilah yang dapat menyebabkan terjadinya keracunan bagi manusia, sehingga peneliti tertarik untuk mengetahui bagaimanakah kemampuan *Tetraselmis chuii* dalam menghambat *Morganella morganii*.

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui daya hambat dan kestabilan ekstrak *Tetraselmis chuii* dalam menghambat *Morganella morganii* secara umumnya. Secara khusus tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan besaran rendemen dengan maserasi menggunakan pelarut berbeda (non polar. Semi polar dan polar) serta dapat menentukan komponen bioaktif yang ada pada sampel melalui analisis fitokimia dan LC-MS. Mengukur dan menentukan daya hambat serta stabilitas ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* dalam menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*. Penelitian ini dilaksanakan mulai bulan Agustus hingga bulan November 2015 yang bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Analisa LC-MS ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Kimia (LIPI) Serpong, Tangerang Selatan.

Tahapan penelitian ini terbagi dalam dua tahapan yaitu penelitian tahap pertama dan penelitian tahap dua. Penelitian tahap pertama dilakukan maserasi dengan pemberian pelarut berbeda (heksan, etil asetat, dan etanol) dengan waktu perendaman berbeda pula (24 jam, 48 jam, dan 72 jam) dan pengujian daya hambat. Parameter yang diamati yaitu, rendemen, diameter hambat, penentuan MBC dan MIC pemberian konsentrasi ekstrak 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ppm, uji fitokimia dan analisis LC-MS. Penelitian tahap dua dilakukan uji stabilitas dengan pemberian suhu (60°, 70°, 80°, 90° dan 100°C) dan waktu pemanasan (5, 10, 15 dan 20 menit) dengan parameter uji yaitu, diameter hambat dan penetapan MBC dan MIC.

Dari hasil penelitian didapatkan hasil bahwa, pada penelitian tahap pertama dengan waktu maserasi dan pelarut berbeda diperoleh persentase rendemen berkisar antara $0,83 \pm 0,31$ % hingga $6,78 \pm 0,280$ %. Besarnya diameter hambat dari ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii* berkisar antara $3,37 \pm 0,19$ mm hingga $10,88 \pm 0,47$ mm. Dari hasil uji MBC dan MIC secara berturut nilai terkecil dalam menghambat bakteri yaitu 3,13

$\pm 0,11$ ppm dan $12,53 \pm 0,48$ ppm. Senyawa bioaktif teranalisis dengan uji fitokimia, senyawa yang dapat teranalisa yaitu alkaloid, terpenoid dan steroid dan tanin. Senyawa analisa melalui uji LC-MS yaitu 7-Hydroxy-4-methylcoumarin dan D-Pantothenic acid. Senyawa-senyawa bioaktif dugaan ini diduga mampu menghambat bakteri *Morganella morganii* dengan memenuhi permeabilitas sel sehingga permeabilitas sel bakteri menjadi terganggu yang akhirnya dapat menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Pengujian stabilitas pada ekstrak *Tetraselmis chuii* dengan pengaruh suhu dan waktu didapat diameter hambat yang berkisar antara $8,25 \pm 0,624$ mm hingga $11,03 \pm 0,653$ mm. Dari hasil uji MBC dan MIC diperoleh nilai MBC berkisar antara $3,76 \pm 0,43$ ppm hingga $19,82 \pm 0,74$ ppm. MIC yang diperoleh berkisar antara $15,02 \pm 0,33$ hingga $79,26 \pm 2,98$ ppm.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KATA PENGANTAR

Laporan Skripsi yang berjudul “Uji Daya Hambat dan Stabilitas (Waktu dan Suhu) Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* terhadap Aktivitas Bakteri *Morganella morganii*” ini disajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi penelitian tahap pertama yang membahas tentang bagaimana kemampuan hambat dari ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii* dengan pemberian pelarut dan waktu maserasi yang berbeda pada sampel, adapun parameter uji meliputi: rendemen, uji daya hambat, uji MIC dan MBC, uji Fitokimia dan Uji LC-MS. Pada penelitian tahap kedua, pokok bahasan yang disajikan berupa kemampuan hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii* setelah diberikan perlakuan suhu dan waktu pemanasan pada ekstrak, serta mengetahui besarnya nilai MBC dan MIC dari ekstrak tersebut.

Penulis sangat menyadari bahwa masih sangat banyak kekurangan dan keterbatasan dalam menulis, walaupun telah dikerahkan seluruh kemampuan untuk lebih teliti lagi dalam penulisan tetapi masih dirasakan banyak kekurangan dalam penulisan laporan ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran positif dari pembaca yang dapat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

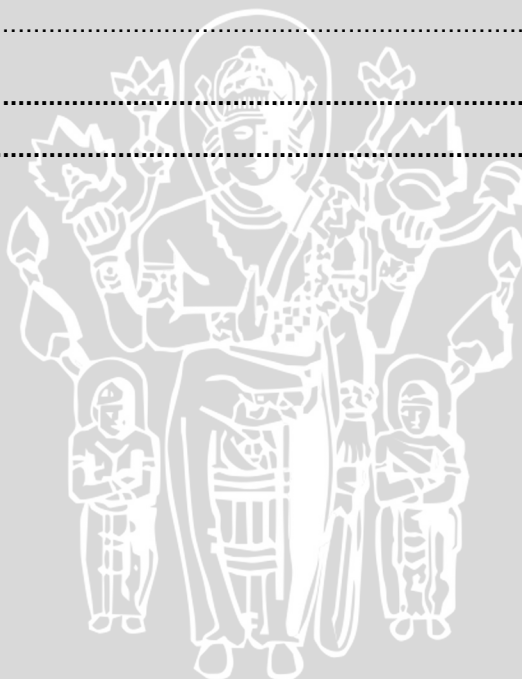
Malang, Februari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
LEMBAR ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
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. Hipotesis	4
1.5. Waktu dan Tempat	4
 2. TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1. Mikroalga	5
2.1.1. <i>Tetraselmis chuii</i>	6
2.2. Ekstraksi	7
2.3. Jenis Pelarut yang digunakan	8
2.3.1. Heksan	9
2.3.2. Etil Asetat	9
2.3.3. Etanol	10
2.4. Analisis Fitokimia	11
2.5. Mekanisme Kerja Senyawa Antibakteri	13
2.6. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri	14
2.7. <i>Morganella morganii</i>	15
2.8. Metode <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LC-MS)	16
 3. METODOLOGI	 17
3.1. Bahan dan Alat Penelitian	17
3.2. Metode Penelitian	17
3.2.1. Penelitian Tahap Pertama	18
3.2.2. Penelitian Tahap Kedua	23
3.2.3. Prosedur Analisa Parameter	26
 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	 31
4.1. Penelitian Tahap Pertama	31
4.1.1. Rendemen Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	31

4.1.2.	Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> terhadap Bakteri <i>Morganella morganii</i>	35
4.1.3.	Uji MBC (<i>Minimum Bacterial Concentration</i>) dan MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	38
4.1.4.	Uji Fitokimia	42
4.1.5.	Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> menggunakan LC-MS	44
4.2.	Penelitian Tahap Dua	47
4.2.1.	Uji Stabilitas Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> terhadap Daya Hambat Bakteri <i>Morganella morganii</i>	48
4.2.2.	Uji Stabilitas MBC (<i>Minimum Bacterial Concentration</i>) dan MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) Bakteri <i>Morganella morganii</i>	51
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	56
5.1.	Kesimpulan	56
5.2.	Saran	57
	DAFTAR PUSTAKA	58
	LAMPIRAN	68



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Tetraselmis chuii</i>	6
2. Bakteri <i>Morganella morganii</i>	16
3. Diagram alir proses ekstraksi bertingkat <i>Tetraselmis chuii</i>	22
4. Diagram uji stabilitas (suhu dan waktu) terhadap bakteri <i>Morganella morganii</i>	25
5. Rendemen ekstrak kasar kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	32
6. Grafik daya hambat ekstrak kasar <i>Tetraselmis chuii</i> dengan berbagai pelarut	36
7. Nilai MBC dengan pemberian pelarut dan lama maserasi berbeda	39
8. Grafik nilai MIC dari ekstrak pelarut berbeda	41
9. Spektrum LC ekstrak kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	45
10. Spektrum MS Rt 1,9 ekstrak kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	45
11. Spektrum MS Rt 7,15 ekstrak kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	45
12. Struktur kimia senyawa 7-Hydroxy-4-methylcoumarin	46
13. Struktur kimia senyawa D-Panthotenic acid	47
14. Grafik Rerata Daya Hambat Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> terhadap Bakteri <i>Morganella morganii</i>	49
15. Grafik Nilai MBC Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> dengan Pemberian Suhu terhadap Bakteri <i>Morganella morganii</i>	52
16. Grafik Nilai MIC Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i> dengan Pemberian Suhu terhadap Bakteri <i>Morganella morganii</i>	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tingkat kelarutan beberapa jenis pelarut di dalam air dan konstanta nilai dielektrik ...	9
2. Karakteristik Heksana	9
3. Karakteristik etil asetat	10
4. Sifat-sifat pelarut etanol	10
5. Desain rancangan percobaan penelitian tahap satu	20
6. Desain rancangan penelitian tahap dua	24
7. Nilai MBC dan MIC Bakteri <i>Morganella morganii</i>	41
8. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	43
9. Senyawa Analisa LC-MS ESI Positif	46



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Kasar <i>Tetraselmis chuii</i>	69
2. Data Rendemen Ekstrak	70
3. Prosedur Pembuatan Konsentrasi Ekstrak	71
4. Analisis Keragaman Penelitian Tahap Satu	72
5. Penentuan Nilai Mt	74
6. ANOVA MBC	76
7. ANOVA MIC	77
8. Pengujian Stabilitas Ekstrak dengan Pengaruh Suhu dan Waktu	78
9. Anova MBC uji Stabilitas	80
10. Anova MIC uji Stabilitas	82
11. Hasil Analisa LC-MS	84
12. Dokumentasi Penelitian	89



1. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Keanekaragaman jenis sumberdaya perairan yang belum dimanfaatkan secara optimal memiliki potensi yang sangat tinggi untuk dikembangkan. Salah satu sumber daya perairan yang memiliki potensi tinggi untuk dioptimalkan adalah mikroalga. Dahuri (2003) menyatakan bahwa terdapat lebih dari 35.000 spesies biota laut yang berpotensi tinggi namun hanya sekitar 5.000 saja yang telah dimanfaatkan. Potensi biota laut yang tinggi ini masih belum banyak diamati (Yudha, 2008).

Mikroalga merupakan mikroorganisme dengan sel multiseluler maupun uni seluler, memiliki senyawa utama berupa lemak, karbohidrat, dan protein (Wenno *et al.*, 2010; Agustini dan Kusmiati, 2012). Kandungan metabolit sekunder yang terdapat pada mikroalga dapat digunakan sebagai bioaktif sehingga dapat diaplikasikan sebagai antimikroba, antiinflamasi, dan antikoagulan (Borowitzka, 1995; Athukorara *et al.*, 2006). Maligan *et al.*, (2014) menyatakan bahwa, mikroalga juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri terutama bakteri patogen. Mikroalga yang memiliki potensi sebagai antimikroba diantaranya, *Tetraselmis chuii* (Metting dan Pyne, 1986); *P. cruentum* (Kusmiyati dan Agustini, 2007); *D. primolecta* (Weldy dan Huesemann, 2007); *Chlorella vulgaris* (Indhira, 2004). Pada penelitian ini mikroalga *Tetraselmis chuii* akan dilakukan pengujian terhadap daya hambat aktivitas *Morganella morganii*.

Berbagai metode ekstraksi telah dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat pada *Tetraselmis chuii* salah satunya adalah metode ekstraksi maserasi (Widayanti, 2012), metode *Microwave Assisted Extraction* (Kusuma, 2012) dan metode *Ultrasound Assisted Extraction* (Adhianata, 2012). Sani *et al.*, (2014) dalam penelitiannya menyatakan bahwa *Tetraselmis chuii* mengandung

senyawa bioaktif berupa alkaloid, flavonoid dan glikosida flavonoid, pengujian senyawa fitokimia ini dilakukan dengan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang ditandai dengan adanya noda warna yang tampak. Adanya kandungan alkaloid dalam suatu ekstrak dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga dapat menyebabkan kematian sel bakteri (Mahanani *et al.*, 2012). Senyawa flavonoid yang terdapat dalam ekstrak dapat menyebabkan struktur protein bakteri menjadi rusak sehingga sel bakteri menjadi kehilangan bentuk (Rinawati, 2011). Senyawa glikosida flavonoid dalam menghambat bakteri memiliki kemampuan dalam menghambat aktivitas enzim mikroba yang dapat menyebabkan terganggunya proses metabolisme (Nikham dan Basjir, 2012).

Keracunan akibat mengkonsumsi ikan merupakan salah satu penyebab utama kurangnya minat konsumen akan produk perikanan. Keracunan ini diakibatkan karena adanya kandungan histamin pada ikan terutama ikan famili scombroidae (Aryadnyani, 2012). Histamin ini terbentuk karena adanya aktivitas enzim *L-Histidine decarboxylase* yang dihasilkan oleh bakteri (Martono *et al.*, 2014) diantaranya yaitu, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *Clostridium perfringens*, *Enterobacter aerogenes* dan *Proteus* sp. (Kusmarwati dan Indriati, 2008).

Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengetahui besarnya daya hambat dari suatu ekstrak, seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Saksony (2012) dengan ekstraksi *Tetraselmis chuii* menggunakan metode maserasi diperoleh hasil bahwa ekstrak dapat menghambat aktivitas bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kusmarwati dan Indriati (2008) dalam penelitiannya menggunakan ekstrak biji picung yang dilarutkan pada pelarut etanol dengan pemberian konsentrasi berkisar 10-30 mg/mL mampu menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*. Martono (2014) dalam penelitiannya menggunakan ekstrak *Gracilaria* sp. dengan pemberian berbagai

konsentrasi mampu menghambat pertumbuhan *Morganella morganii* dan *Rastrelliger sp.*

Penelitian ini nantinya akan dilakukan proses ekstraksi bertingkat dengan metode maserasi modifikasi mesin pengaduk, dimana pelarut yang digunakan adalah pelarut heksan, etil asetat, dan etanol. Pengujian juga dilakukan dengan mengetahui komponen bioaktif dalam sampel dengan analisa fitokimia serta mengetahui daya hambat ekstrak *Tetraselmis chuii* dengan menentukan besarnya nilai MIC dan MBC. Untuk mengetahui kestabilan suhu dari ekstrak dilakukan uji stabilitas. Konsentrasi terbaik dilakukan analisa menggunakan LC-MS untuk mengetahui berat molekul dan senyawa antibakteri yang terkandung dalam *Tetraselmis chuii*.

1.2. Rumusan Masalah

Adapun masalah yang ditimbulkan dari penjelasan diatas diantaranya:

- Mengetahui besaran rendemen ekstrak dan kandungan fitokimia yang ada pada *Tetraselmis chuii*.
- Mengetahui batas minimum daya hambat ekstrak terhadap *Morganella morganii*.
- Mengetahui stabilitas suhu dan waktu dari ekstrak *Tetraselmis chuii* sebagai antibakteri

1.3. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan umum dari penelitian ini yaitu, untuk mengetahui daya hambat stabilitas ekstrak mikroalga *Tetraselmis chuii* terhadap aktivitas *Morganella morganii*.

Tujuan khusus dari penelitian ini yaitu :

- Untuk menentukan besaran rendemen dengan maserasi bertingkat menggunakan pelarut berbeda (non polar, semi polar dan polar) serta

menentukan komponen bioaktif yang ada pada sampel melalui analisa fitokimia dan LC-MS.

- b. Mengukur daya hambat bakteri dengan metode difusi agar sumuran (*Well Diffusion Agar*).
- c. Menentukan stabilitas ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* dengan pemberian suhu dan waktu berbeda terhadap daya hambat *Morganella morganii*.

1.4. Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

H0: diduga ekstrak *Tetraselmis chuii* tidak dapat menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*.

H1: diduga ekstrak *Tetraselmis chuii* dapat menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*.

1.5. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus hingga November 2015. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Hidrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Analisa LC-MS sampel dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Kimia (LIPI) Serpong, Tangerang Selatan.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Mikroalga

Mikroalga merupakan tumbuhan air yang memiliki sel eukariotik dengan ukuran yang sangat kecil yaitu 3-30 μm (Miranda, 2014). Keberagaman mikroalga sangat tinggi dan diperkirakan antara 200.000 – 800.000 spesies. Hanya sekitar 35.000 saja yang telah diidentifikasi. Beberapa diantaranya seperti *Dunaliella primolecta*, *Tetraselmis* sp *Spirulina*, *Nannochloropsis* sp, *Chlorella* sp. dan lain sebagainya (Widjaja, 2009).

Karbohidrat, protein, asam nukleat, dan lemak merupakan kandungan yang sangat penting pada mikroalga. Besar kecilnya persentase kandungan dari keempat komponen tersebut dapat dipengaruhi oleh kondisi kultivasi (Dianursanti, 2012). Kandungan protein dalam mikroalga cukup tinggi sebesar 12-35%, lemak/lipid sebesar 7,2 – 23% dan kandungan karbohidrat sebesar 4,6 – 23% (Yudiati *et al.*, 2011). Widayanti (2012), mikroalga juga kaya akan asam askorbat yakni 0,11 – 1,62%.

Mikroalga merupakan mikroorganisme yang memanfaatkan sinar matahari untuk proses fotosintesis. Mikroorganisme ini memiliki waktu hidup yang cukup singkat yaitu hanya dalam hitungan hari hingga beberapa minggu (Uju dan Wahyuni, 2007). Oksigen yang dihasilkan mikroalga melalui fotosintesis dapat mengurangi kandungan CO_2 di udara (Waliyansyah, 2014). Cahaya adalah salah satu faktor pendukung dalam keberlangsungan hidup mikroalga karena energi sinar matahari yang diserap berdasarkan lamanya penyinaran, panjang gelombang yang diserap, dan intensitas cahaya yang diterima (Wijaksono, 2008).

2.1.1. *Tetraselmis Chuii*

Tetraselmis chuii merupakan salah satu alga bersel satu dengan ukuran yang sangat kecil berkisar antara 7 – 12 mikron. Memiliki inti sel yang sangat jelas serta dinding sel mengandung selulosa dan pektosa (Isnansetyo dan Kurniastuty, 1995). Karotin dan xantofil merupakan dua jenis pigmen klorofil yang ada pada *Tetraselmis chuii* dimana klorofil merupakan pigmen yang dominan yang menyebabkan warna hijau (Pujiono, 2013). Ditambahkan oleh Rostini (2007), klasifikasi dari *Tetraselmis chuii* yaitu:

Filum	: Chlorophyta
Kelas	: Chlorophyceae
Ordo	: Volvocales
Sub Ordo	: Chlamidomonacea
Genus	: Tetraselmis
Spesies	: <i>Tetraselmis chuii</i>



Gambar 1: *Tetraselmis chuii*
Sumber : Pujiono, 2012

Tetraselmis chuii biasanya ditemukan di perairan payau atau perairan laut namun sekarang ini mikroalga ini telah banyak dibudidayakan terutama pada tempat – tempat pembenihan udang (Mudjiman, 2004). Adhianata (2012) menyatakan bahwa salinitas optimal untuk pertumbuhan *Tetraselmis chuii* berkisar antara 25 – 35 ppm, sedangkan suhu 15°C – 35°C merupakan kisaran suhu optimal untuk pertumbuhan mikroalga *Tetraselmis chuii*.

Salah satu mikroalga yang memiliki potensial tinggi untuk dikembangkan yaitu *Tetraselmis chuii* dimana diketahui bahwa mikroalga ini memiliki kandungan gizi yang cukup tinggi yaitu, karbohidrat sebesar 21,1%, protein sebesar 48,42% dan lemak sebesar 9,7% (Brown *et al.*, 1997). Kumalasari (2011), dalam penelitiannya menyatakan bahwa kandungan antioksidan berkisar antara 2,55 – 31,29 mg/ml sedangkan kandungan klorofil berkisar antara 3,65 – 19,20 mg/g.

2.2. Ekstraksi

Proses ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan aktif dari suatu tanaman. Pemisahan bahan aktif ini menggunakan pelarut sesuai dengan kepolarannya (Sjahid, 2008). Proses ekstraksi berdasarkan fase yang diekstraksi dikelompokkan menjadi dua bagian utama yaitu ekstraksi fase cair-padat dan ekstraksi fase cair-cair. Prosedur ekstraksi padat-cair biasanya dilakukan dengan menghaluskan bahan padat hingga menjadi serbuk, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut, dilakukan penyaringan atau bahkan disentrifugasi untuk menghilangkan partikulat (Gandjar dan Rohman 2008).

Harborne (2006), ekstraksi cair padat terdiri dari beberapa cara yaitu maserasi, perkolasi, dan ekstraksi sinambung. Cara ekstraksi maserasi adalah cara pemisahan bahan aktif yang paling sederhana dimana bahan yang digunakan dihaluskan terlebih dahulu, misalnya dibuat dalam bentuk serbuk yang disatukan dengan pelarutnya. Yasita dan Rachmawati (2013) menyatakan bahwa, ada tiga langkah utama dalam proses ekstraksi diantaranya, proses pencampuran, proses terbentuknya fase yang setimbang dan proses pemisahan fase yang setimbang. Selain tiga hal tersebut adapula faktor lain yang mempengaruhi proses ekstraksi yaitu, perbandingan pelarut, suhu, ukuran partikel, pengadukan dan waktu kontak.

Prinsip dari ekstraksi adalah memisahkan satu atau beberapa zat dari bentuk cair maupun padatan. Dalam hal ini terjadi kontak antar bahan dengan pelarut ekstraksi sehingga terjadi pengendapan massa sampel hingga terbentuk keseimbangan konsentrasi antara larutan yang masuk kedalam bahan dan larutan yang di luar bahan (Bernasconi, 1995). Voight (1994) yang menyatakan bahwa ketika proses ekstraksi berlangsung, dimungkinkan terjadi perlintasan pelarut didalam sel sehingga pelarut dapat mencapai sel. Pelarut yang mengalir

ke dalam sel akan mengakibatkan pembengkakan pada protoplasma sehingga komponen di dalam sel akan terlarut sesuai kelarutannya.

2.3. Jenis Pelarut yang digunakan

Penggunaan berbagai jenis pelarut dalam proses ekstraksi dapat menentukan jumlah ekstrak yang didapat. Sehingga ada beberapa kriteria pelarut yang harus dipilih untuk mendapatkan hasil terbaik, diantaranya mempunyai kemurnian yang tinggi, dapat bereaksi dengan diluents dan solute, dapat melarutkan solute namun tidak dapat atau sedikit melarutkan diluents (Maulida dan Naufal, 2010). Pelarut organik yang digunakan merupakan salah satu faktor penentu dalam proses ekstraksi, dimana pelarut yang baik memiliki kemampuan tinggi dalam melarutkan (Guenther, 1987).

Yasitha dan Rachmawati (2013), menyatakan bahwa adapun sifat pelarut yang digunakan dalam ekstraksi yaitu: memiliki selektivitas yang tinggi terhadap senyawa yang diekstraksi, tidak beracun, tidak bersifat korosif, bersifat inert, tidak mudah terbakar, memiliki viskositas yang kecil, murah dan mudah didapat, serta dapat bersifat reaktif terhadap senyawa yang diekstraksi.

Sudarmadji *et al.*, (2007), menyatakan bahwa, senyawa kimia dan bahan yang di ekstrak akan mudah larut jika memiliki polaritas yang sama dengan pelarutnya. Secara fisika, kepolaran suatu pelarut yang digunakan ditunjukkan dengan nilai konstanta dielektrik. Semakin polar suatu pelarut maka semakin besar pula nilai konstanta dielektrik yang ditunjukkan seperti yang dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Tingkat kelarutan beberapa jenis pelarut di dalam air dan konstanta nilai dielektrik

Pelarut	Tingkat kelarutan dalam air	Konstanta dielektrik
Metanol	Misibel	33,60
Aseton	Misibel	20,70
Air	Misibel	80,40
Dietil eter	Sedikit	3,34
Etil asetat	Sedikit	6,02
n-heksan	Tidak larut	1,89
Petroleum eter	Tidak larut	1,90

Sumber : Sudarmadji *et al.*, 2007

2.3.1. Heksan

Heksan memiliki rumus molekul C_6H_{14} dan merupakan senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus isomer utama $CH_3(CH_2)_4CH_3$. Heksana biasanya juga dikenal dengan nama senyawa n-heksan dan termasuk dalam salah satu jenis pelarut non polar (Maulida dan Naufal, 2010). Heksana juga merupakan hidrokarbon aromatik yang sangat mudah menguap (Arindah, 2010). Adapun sifat-sifat dari heksana ini yang dikutip dari Lide (2005) dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Karakteristik Heksana

Karakteristik	Keterangan
Nama	Heksana (<i>hexane</i>)
Rumus molekul	C_6H_{14}
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	86,175
Titik didih	$68,73^{\circ}C$
Titik lebur	$-95,35^{\circ}C$
Densitas	$0,6606^{25} g/cm^3$
Konstanta dielektrik	1,8865
Kelarutan	Tidak larut dalam air, sangat larut etanol, larut dalam dietil eter, klorofom

Sumber : Lide, 2005

2.3.2. Etil Asetat

Etil asetat merupakan senyawa yang terbentuk dari asam etanoat dan etanol, dengan bentuk cair dan memiliki aroma tajam dan kurang enak (Daintith, 2004). Etil asetat juga dikenal dengan nama ester asetat dengan sifat sedikit

larut dalam air dan dapat mendidih pada suhu 77°C (Hill, 2003). Etil asetat memiliki rumus molekul ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) dengan rumus isomer utama $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, sehingga adapun keuntungan dalam menggunakan pelarut ini yaitu, sifat pelarut yang tidak toksik, tidak higroskopis dan sifat pelarut yang volatil (Reapina, 2007). Adapun karakteristik dari etil asetat ini yang dikutip dari Lide (2005) dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Karakteristik Etil asetat

Karakteristik	Keterangan
Nama	Etil asetat (<i>Ethyl acetate</i>)
Rumus molekul	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$
Bentuk fisik	Cair
Berat molekul	88,106
Titik didih	$77,11^{\circ}\text{C}$
Titik lebur	$-83,8^{\circ}\text{C}$
Densitas	$0,9003^{20} \text{ g/cm}^3$
Konstanta dielektrik	6,0814
Kelarutan	Larut dalam air, misibel dalam etanol dan dietil eter, sangat larut dalam aseton dan benzene

Sumber : Lide, 2005

2.3.3. Etanol

Etanol merupakan pelarut organik yang biasa disebut dengan etil alkohol dengan rumus molekul $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$. Bentuk dari pelarut ini yaitu cairan tidak berwarna, mudah terbakar, memiliki aroma yang khas, mudah bercampur dengan air dalam berbagai perbandingan dan dapat larut dalam senyawa polar yang lain (Lorimer, 1995). Ditambahkan oleh Ningrum (2011), etanol dapat diproduksi melalui fermentasi gula, pati, dan karbohidrat. Adapun sifat-sifat dari etanol ini dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Sifat-sifat pelarut etanol

Keterangan	Sifat
Nama IUPAC	Etanol
Molecular Formula	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Penampilan	Cair tidak berwarna
Massa molar	$32,04 \text{ g mol}^{-1}$
Titik lebur	$-114,3^{\circ}\text{C}$, $-142,9^{\circ}\text{F}$ (176 K)
Titik didih	$78,4^{\circ}\text{C}$, $148,4^{\circ}\text{F}$ (337,8 K)
Kelarutan dalam air	Miscible

Sumber : Ningrum, 2011

2.4. Analisis Fitokimia

Identifikasi senyawa bioaktif atau yang lebih dikenal dengan analisa fitokimia ini bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam tanaman (Studiawan, 2009). Senyawa bioaktif ini merupakan senyawa non gizi hasil metabolisme tanaman yang berupa senyawa metabolit sekunder, misalnya terpenoid, alkaloid, dan senyawa fenolik (Kristanti *et al.*, 2008). Adanya kandungan bioaktif pada tanaman dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan fungsional yang memberikan efek terhadap kesehatan (Sani, 2013).

Dalam analisa senyawa fitikomia ini, ada beberapa metode yang biasanya dilakukan untuk mengetahui kandungan bioaktif diantaranya menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), reaksi pengendapan dan reaksi warna (Harborne, 2006). Senyawa yang diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan spektrum seperti sinar UV, resonansi magnet inti (RMI), infrared (IR) dan spektrum massa (Anggana, 2013).

Adanya senyawa-senyawa bioaktif yang biasanya terkandung dalam bahan alam sering dimanfaatkan sebagai antibakteri (Mahanani, 2012). Parubak (2013) menyatakan bahwa salah satu senyawa bioaktif yang biasa dimanfaatkan sebagai antibakteri diantaranya yaitu, alkaloid, tanin, saponin, terpenoid, steroid dan flavonoid.

a. Alkaloid

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam dan hampir semua alkaloid memiliki keaktifan biologis (Lenny, 2006). Mahanani (2012) menyatakan bahwa alkaloid mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, dimana mekanisme kerja senyawa alkaloid ini yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak mampu terbentuk secara utuh yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel tersebut.

b. Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa yang mampu mengendapkan protein (Haryati, 2011). Tanin dapat bekerja sebagai antibakteri karena kemampuannya dalam inaktivasi enzim, inaktivasi fungsi materi genetik yang ada pada sel bakteri dan mampu bereaksi dengan membran sel dengan menembus dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.*, 2014).

c. Saponin

Identifikasi senyawa saponin ditandai dengan adanya busa yang stabil selama 30 detik setelah dikocok dalam air dimana ketinggian busa yang dihasilkan mencapai 1-3 cm (Suharto, 2012). Nikham dan Basjir (2012) menyatakan bahwa senyawa saponin dapat digunakan untuk mengurangi gula dalam darah, sebagai antivirus dan sebagai antimikroba. Saponin memiliki kemampuan sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks sehingga dapat menghancurkan permeabilitas dinding sel yang dapat menimbulkan kematian sel (Noer dan Nurhayati, 2006).

d. Terpenoid dan Steroid

Kandungan senyawa steroid dan triterpenoid yang dijumpai pada tumbuhan rendah maupun tumbuhan tinggi dapat berfungsi sebagai antimikroba dan untuk menolak serangan (Riyanto *et al.*, 2013). Kemampuan senyawa terpenoid dalam merusak membran sel dikarenakan senyawa terpenoid bersifat lipofilik sehingga dapat terjadi lisis serta koagulasi sitoplasma dari sel bakteri (Pratiwi, 2014). Widodo (2007) menjelaskan mekanisme kerja senyawa steroid dalam menghambat bakteri yaitu dengan mengikat membran lipid bakteri sehingga mampu menyebabkan kebocoran pada liposom (penyusun dinding sel bakteri).

e. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu senyawa kimia yang terdapat dalam bahan organik yang mampu dijadikan sebagai antibakteri (Rinawati, 2011). Cushnie dan Lamb (2005) menyatakan bahwa sistem kerja dari flavonoid sebagai antibakteri dengan menghambat sintesis DNA-RNA dengan penumpukan basa asam nukleat, selain itu flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energi. Mekanisme kerja senyawa flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler yang kemudian terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri (Nuri *et al.*, 2009).

2.5. Mekanisme Kerja Senyawa Antibakteri

Senyawa antibakteri bekerja dengan merusak dinding sel bakteri, jika dinding sel ini rusak maka akan menyebabkan kematian bagi sel tersebut (Pelczar dan Chan, 1988). Masuknya senyawa antibakteri ke dalam membran juga dapat merubah permeabilitas selektif membran sehingga dapat menyebabkan keluarnya protein dan asam nukleat yang merupakan komponen penting untuk kelangsungan hidup bakteri (Ganiswara, 1995).

Anggana (2013) menyatakan, adapun mekanisme antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri yaitu: (1) merusak permeabilitas membran sel, (2) menghambat sintesis dinding sel, (3) menghambat sintesis RNA (proses transkrip) dan (4) mampu menghambat sintesis protein (sintesis translasi) dan replikasi DNA. Brunton (2006) juga menambahkan, mekanisme kerja antibakteri dan antibiotik terhadap sel organisme ditentukan oleh faktor-faktor, (1) terganggunya pembentukan dinding sel organisme oleh senyawa antibakteri dan antibiotik dengan merusak komposisi penyusun dinding sel, (2) mengganggu kerja enzim dalam sel bakteri, jika hal ini berlangsung lama dapat

menghentikan pertumbuhan bakteri dan (4) dapat menyebabkan inaktivasi fungsi material genetik (RNA dan DNA) sehingga sel bakteri tidak dapat berkembang biak.

Fardiaz (1989) menyatakan bahwa, senyawa antimikroba dalam menghambat tumbuhnya bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya, konsentrasi zat antimikroba, suhu lingkungan, dan waktu penyimpanan, namun sifat fisik dan kimia makanan termasuk kadar air, pH, dan jumlah senyawa di dalamnya termasuk faktor yang berpengaruh pula.

2.6. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan 2 metode pokok yakni metode dilusi dan metode difusi (Brooks *et al.*, 2005). Pengujian daya hambat bakteri dilakukan menggunakan metode difusi agar zona bening yang terbentuk dinyatakan sebagai aktivitas daya hambat bakteri (Kusmarwati dan Indriati, 2008). Ada tiga metode difusi agar yang digunakan dalam mengetahui daya hambat bakteri diantaranya, metode sumuran, metode cakram kertas dan metode silinder. Salah satu yang biasa digunakan yaitu metode sumuran, dimana teknik penentuan daya hambat bakteri dari metode ini adalah dengan membuat lubang-lubang yang kemudian diinjeksikan dengan ekstrak uji. Ekstrak uji yang telah di masukkan dalam lubang kemudian diinkubasi.

Penentuan daya hambat bakteri ditentukan dengan menghitung besarnya zona hambat yang terbentuk disekeliling sumuran (Kusmiyati dan Agustini, 2007). Ditambahkan oleh Ardiansyah *et al.*, (2003) bahwa dengan menggunakan metode sumuran juga dapat ditentukan pula nilai *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) dan nilai *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC) terhadap aktivitas bakteri.

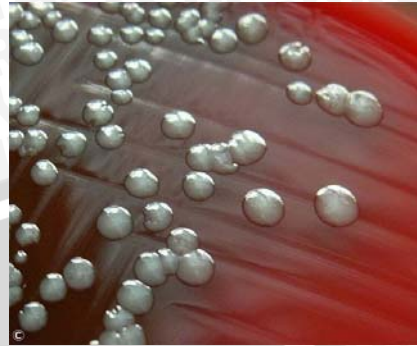
2.7. *Morganella morganii*

Morganella morganii merupakan bakteri patogen nosokomial. *Morganella morganii* ini termasuk salah satu bakteri penyebab dekarboksilasi dari asam amino bebas histidin menjadi histamin. Histamin ini juga dapat menimbulkan keracunan pada manusia (Jaryatin, 2009). *Morganella morganii* termasuk dalam genus proteus. Organisme proteus bersifat motil, termasuk dalam bakteri gram negatif, basil aerobik, dan tidak memiliki kapsul (Glynn, 1972).

Keracunan akibat mengonsumsi ikan dapat disebabkan oleh toksin yang ada pada ikan diantaranya yaitu: tetradoxin, scombrotoxin, dan ciguatoxin. Salah satu toksin yang sering ditemukan dari ikan golongan scombroidae adalah scombrotoxin. Ikan scombroidae memiliki kandungan daging merah yang lebih tinggi dari daging putih. Dalam daging merah terdapat kandungan asam amino bebas histidin dimana jika asam amino histidin ini dirombak oleh enzim histidin dekarboksilase dari bakteri *Morganella morganii* maka akan terbentuk histamin. Histamin inilah yang nantinya dapat menyebabkan terjadinya keracunan bagi manusia (Suryati *et al.*, 2003).

Fulton (1943) menyatakan bahwa, bakteri *Morganella morganii* berbentuk sel batang yang lurus dengan diameter 0,6-0,7 μm dan panjang 1,0-1,7 μm . organisme ini dapat bergerak dengan flagel, namun beberapa *strain* tidak terbentuk *flagel* pada suhu 30°C. Adapun klasifikasi dari *Morganella morganii* yaitu:

Kingdom : Bakteri
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Family : Enterobacteriaceae
Tribe : Proteae
Genus : *Morganella*
Species : *Morganella morganii*



Gambar 2. Koloni *Morganella morganii*
Sumber : Fulton, 1943

2.8. Metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS)

Metode *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* adalah metode analisa yang memiliki teknik analisis yang sangat sensitif dan memiliki selektifitas dan akurasi yang tinggi serta dapat digunakan dalam berbagai aplikasi (Susiana, 2014; Kang, 2012). Maryam (2007) menyatakan bahwa, selektifitas yang tinggi dari analisis LC-MS mampu mengetahui berat molekul senyawa meskipun dalam jumlah sampel yang sedikit serta mampu mengidentifikasi senyawa yang terkandung.

Prinsip kerja dari LC-MS ini adalah dengan menyuntikkan sampel ke dalam instrumen sehingga sampel akan masuk ke dalam sistem pemisah kromatografi cair (LC) terlebih dahulu. Selama terjadi proses pemisahan, sampel didorong pada tekanan tinggi dengan dilarutkan pada fase gerak sehingga sampel dapat mengalir melalui kolom yang tersusun oleh fase diam dan terdiri dari partikel-partikel kecil membran berpori (*porous*) atau dapat berupa lapisan monolitik.

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Bahan dan Alat Penelitian

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya, mikroalga *Tetraselmis chuii* sebagai bahan utama yang didapat dari Balai Benih Air Payau (BBAP) Situbondo. Biakan *Morganella morganii* dengan kepadatan 10^6 koloni/mL didapat dari koleksi bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, FMIPA UGM, Yogyakarta. Untuk maserasi pelarut yang digunakan yaitu, etanol (Merck), heksan (Merck), etil asetat (Merck). adapun bahan-bahan lainnya yang digunakan adalah alkohol 70 %, aquadest, media MHA (*Mueller Hinton Agar*) (Merck) untuk menumbuhkan bakteri *Morganella morganii*, *alumunium foil*, *plastic wrap*, kertas saring dan spirtus.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: timbangan digital (Mettler Toledo), *rotary evaporator* (IKA®RV10), *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, corong, *magnetic stirrer*, Hot Plate (Cimarec), pipet volume, bola hisap, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator (Memmert), cawan petri, autoklaf (HL-36Ae), vortex mixer, sentrifuge (EBA), waterbath (GFL) dan jangka sorong. Adapun alat yang digunakan untuk analisa adalah instrumen LC-MS (Hitachi L 6200) yang terdapat di Lembaga Ilmu dan Pengkajian Ilmiah (LIPI) Serpong.

3.2. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimen, dimana kegiatan penelitian secara umum bertujuan untuk mengetahui dan menilai pengaruh suatu perlakuan, sedangkan tujuan umum dari metode eksperimen adalah meneliti pengaruh perlakuan berbeda terhadap gejala yang timbul dalam kelompok yang dibandingkan (Supardi, 2007). Ditambahkan oleh Sukardi (2011), bahwa prinsip dari penelitian eksperimen adalah terbangunnya

hubungan sebab akibat (*Causal-effect relationship*) melalui metode yang sistematis. Penelitian ini dilakukan dalam dua tahapan yaitu tahap pertama dan tahap kedua. Penelitian tahap pertama ini dilakukan dengan ekstraksi maserasi dengan modifikasi mesin pengaduk (Prasetyo *et al.*, 2012). Ekstraksi *Tetraselmis chuii* ini direndam menggunakan pelarut non polar, semi polar dan polar yang dilakukan secara bertingkat. Penelitian tahap kedua dilakukan untuk mengetahui stabilitas ekstrak *Tetraselmis chuii* terhadap suhu sebagai antibakteri. Penelitian tahap 2 ini menggunakan suhu dan waktu yang berbeda terhadap uji stabilitas ekstrak *Tetraselmis chuii* sebagai anti mikroba.

3.2.1. Penelitian Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama ini bertujuan untuk mengetahui lama maserasi dan pelarut terbaik ekstrak mikroalga *Tetraselmis chuii* yang dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dengan pemberian pelarut pertama yaitu heksan, kemudian etil asetat dan etanol untuk hasil ekstraksi lebih murni sehingga dapat dilakukan analisis.

3.2.1.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Perlakuan yang diterapkan pada tahap pertama yaitu tahap ekstraksi secara maserasi dengan metode ekstraksi bertingkat. Metode ekstraksi ini dilakukan berdasarkan tingkat kepolaran pelarut (A) yaitu pelarut heksan (A1), etil asetat (A2), dan etanol (A3). Rasio perbandingan sampel dengan pelarut yaitu 1:5. Penggunaan lama maserasi (B) terdiri dari 24 jam (B1), 48 jam (B2), 72 jam (B3). Penelitian Widayanti (2012), juga telah menggunakan pelarut berbeda dalam perendaman sampel dengan perbandingan pelarut 1:5 dan lama maserasi yang berbeda pula. Dari perlakuan tersebut dilakukan tiga kali ulangan seperti pada Tabel 5. Penentuan ulangan diketahui melalui persamaan :

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

Dimana: t = Perlakuan

r = Ulangan

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

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

$$(9 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$8 (r - 1) \geq 15$$

$$8r - 8 \geq 15$$

$$8r \geq 15 + 8$$

$$8r \geq 23$$

$$r \geq 2,8 \text{ (dibulatkan menjadi 3 ulangan)}$$

Berdasarkan perlakuan tersebut, maka penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dari data yang diperoleh dilakukan pengujian data menggunakan sidik ragam (ANOVA). Jika terdapat pengaruh yang berbeda nyata atau sangat nyata maka dilanjutkan menggunakan uji Duncan (DMRT) dengan taraf 5% dan 1%. Adapun model persamaan statistika yang digunakan dalam penelitian pendahuluan ini adalah:

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

Keterangan :

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

$(AB)_{ij}$ = Interaksi antara faktor jenis pelarut dan faktor lama maserasi pada faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama maserasi taraf ke-j

ε_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor ke faktor lama maserasi taraf ke-j pada ulangan ke-k

Tabel 5. Desain rancangan percobaan penelitian tahap satu

Jenis Pelarut	Waktu Maserasi	Ulangan		
		1	2	3
Heksan (A1)	24 jam (B1)	A1.B1 (1)	A1.B1 (2)	A1.B1 (3)
	48 jam (B2)	A1.B2 (1)	A1.B2 (2)	A1.B2 (3)
	72 jam (B3)	A1.B3 (1)	A1.B3 (2)	A1.B3 (3)
Etil asetat (A2)	24 jam (B1)	A2.B1 (1)	A2.B1 (2)	A2.B1 (3)
	48 jam (B2)	A2.B2 (1)	A2.B2 (2)	A2.B2 (3)
	72 jam (B3)	A2.B3 (1)	A2.B3 (2)	A2.B3 (3)
Etanol (A3)	24 jam (B1)	A3.B1 (1)	A3.B1 (2)	A3.B1 (3)
	48 jam (B2)	A3.B2 (1)	A3.B2 (2)	A3.B2 (3)
	72 jam (B3)	A3.B3 (1)	A3.B3 (2)	A3.B3 (3)

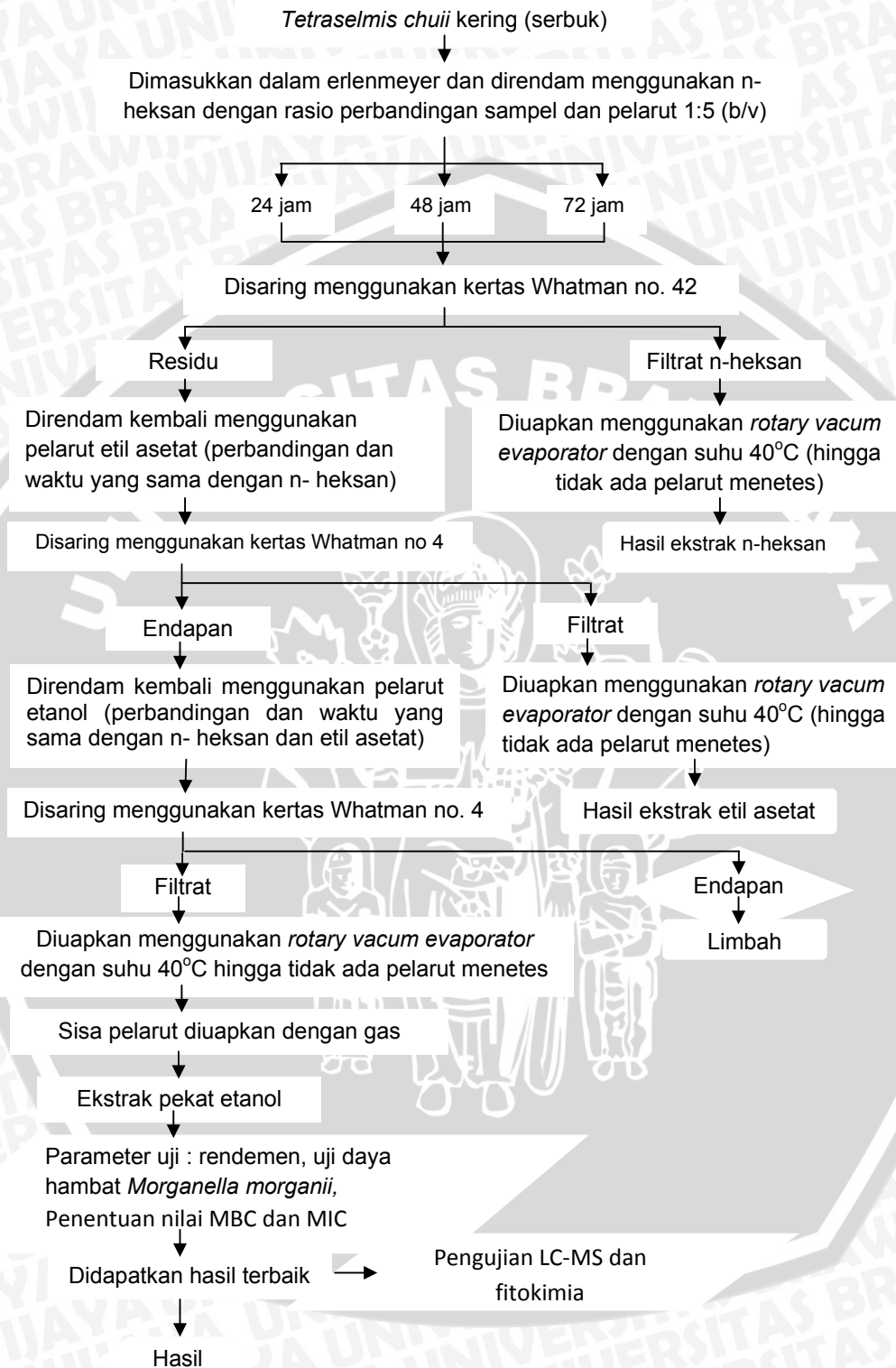
3.2.1.2. Prosedur Penelitian

Pada penelitian tahap pertama, *Tetraselmis chuii* kering (serbuk) yang diperoleh dari Balai Benih Air Payau (BBAP) Situbondo disiapkan terlebih dahulu. Sampel yang telah disiapkan dimasukkan dalam erlenmeyer. Pertama-tama serbuk *Tetraselmis chuii* ditimbang dan dimaserasi menggunakan pelarut heksan (A1) dengan rasio perbandingan sampel dan pelarut 1:5 dengan lama maserasi (B) selama 24 jam (B1), 48 jam (B2), dan 72 jam (B3). Ekstraksi dengan perbandingan rasio, jenis pelarut, dan waktu yang sama dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Filtrat yang diperoleh dari hasil ekstraksi heksan diambil sebagai ekstrak heksan. Residu yang berupa endapan diekstraksi kembali menggunakan etil asetat.

Endapan dari hasil ekstraksi heksan (A1) direndam menggunakan pelarut etil asetat (A2) dengan rasio perbandingan sampel dan pelarut 1:5 dengan lama maserasi yang sama dengan heksan. Filtrat yang diperoleh diambil sebagai ekstrak etil asetat sedangkan residu direndam kembali menggunakan pelarut etanol (A3). Endapan dari ekstrak etil asetat direndam dengan rasio sampel dan pelarut etanol 1:5 dengan perendaman dalam waktu yang sama seperti heksan dan etil asetat serta pengulangan yang sama pula. Filtrat dari ekstrak etanol diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C

hingga tidak ada pelarut yang menetes lagi. Sisa pelarut diuapkan menggunakan gas nitrogen sehingga ekstrak yang didapat digunakan sebagai sampel untuk analisa. Alur ekstraksi *Tetraselmis chunii* dapat dilihat pada Gambar 3.





Gambar 3. Diagram Alir Proses Ekstraksi Bertingkat *Tetraselmis chuii*
Sumber : Modifikasi Fitrial, 2011

3.2.1.3. Parameter yang Diamati

Parameter pada penelitian tahap pertama ini meliputi pengukuran rendemen (Prihanto *et al.*, 2011) dan penentuan nilai MIC dan MBC ekstrak *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii* (Parhuship *et al.*, 2010). Hasil terbaik dari pengukuran rendemen ekstrak dilakukan pengujian LC-MS. Untuk mengetahui kandungan bioaktif ekstrak dilakukan pengujian kualitatif fitokimia (Sulastri, 2011).

3.2.2. Penelitian Tahap Kedua

Pada penelitian tahap 2 ini bertujuan untuk mengetahui kestabilan antibakteri terhadap suhu. Beberapa bakteri dapat tumbuh dan berkembang dengan baik pada suhu tertentu, salah satunya yaitu bakteri *Morganella morganii*.

3.2.2.1. Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Pemberian suhu (C) dan waktu (D) yang bervariasi merupakan 2 faktor pengamatan yang dilakukan pada penelitian tahap kedua ini. Faktor suhu (C) dibagi menjadi 5 taraf yaitu: suhu 60°C (C1), 70°C (C2), 80°C (C3), 90°C (C4) dan suhu 100°C (C5). Waktu pemanasan (D) yang digunakan dibagi dalam 5 taraf yaitu: 5 menit (D1), 10 menit (D2), 15 menit (D3). Interaksi kedua faktor tersebut dilakukan dalam 2 kali ulangan seperti yang dapat dilihat pada Tabel 6, dimana jumlah ulangan yang digunakan dapat dihitung dengan 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:

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

$$(20 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$\begin{aligned}
 19(r-1) &\geq 15 \\
 19r - 19 &\geq 15 \\
 19r &\geq 15 + 19 \\
 19r &\geq 34 \\
 r &\geq 1,8 \text{ (dibulatkan menjadi 2 ulangan)}
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perlakuan tersebut, maka penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial. Dari data yang didapat dilakukan pengujian data menggunakan sidik ragam (ANOVA). Jika terdapat pengaruh yang berbeda nyata atau sangat nyata maka dilanjutkan menggunakan uji Duncan dengan taraf 5% dan 1%. Adapun model persamaan statistika yang digunakan dalam penelitian pendahuluan ini adalah:

$$Y_{ijk} = \mu + C_i + D_j + (CD)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Keterangan :

- Y_{ijk} = Hasil pengamatan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama maserasi taraf ke-j, pada ulangan ke-k
 μ = Rataan umum
 C_i = Pengaruh faktor jenis pelarut pada taraf ke-i
 D_j = Pengaruh faktor lama maserasi pada taraf ke-j
 $(CD)_{ij}$ = Interaksi antara faktor jenis pelarut dan faktor lama maserasi pada faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor lama maserasi taraf ke-j
 ε_{ijk} = Galat percobaan untuk faktor jenis pelarut taraf ke-I, faktor ke faktor lama maserasi taraf ke-j pada ulangan ke-k

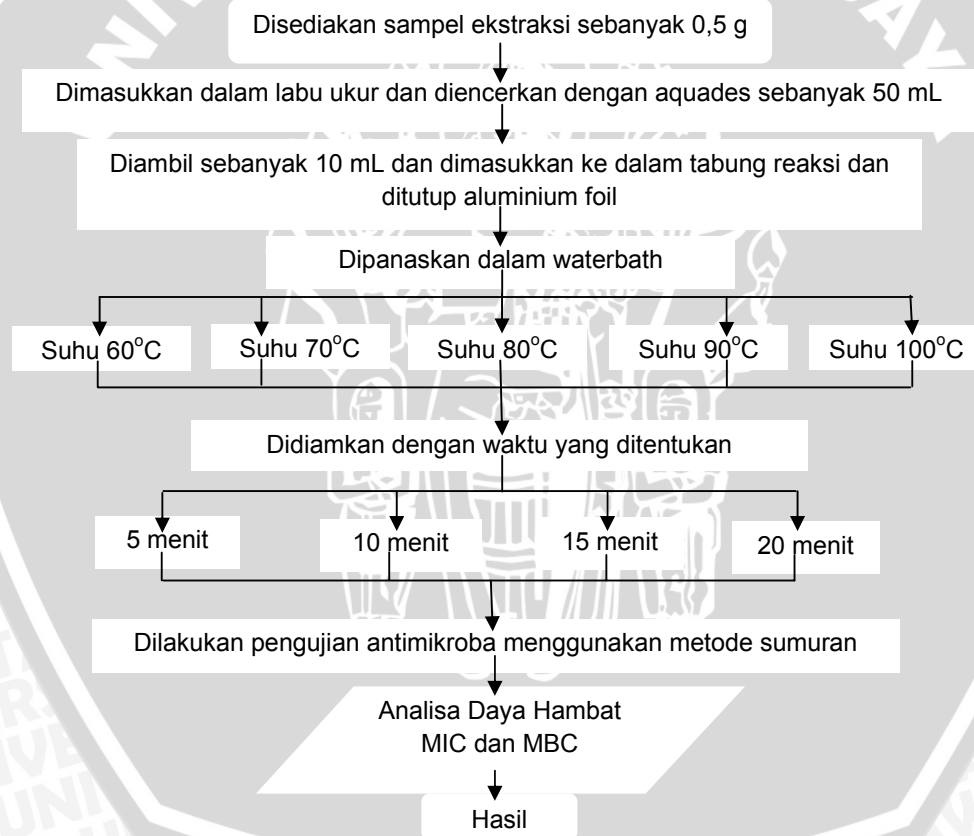
Tabel 6. Desain rancangan percobaan penelitian tahap 2

Perlakuan	Waktu (menit) (D)			
	5 (D1)	10 (D2)	15 (D3)	20 (D4)
60 (C1)	(C1D1)1	(C1D2)1	(C1D3)1	(C1D4)1
	(C1D1)2	(C1D2)2	(C1D3)2	(C1D4)2
70 (C2)	(C2D1)1	(C2D2)1	(C2D3)1	(C2D4)1
	(C2D1)2	(C2D2)2	(C2D3)2	(C2D4)2
80 (C3)	(C3D1)1	(C3D2)1	(C3D3)1	(C3D4)1
	(C3D1)2	(C3D2)2	(C3D3)2	(C3D4)2
90 (C4)	(C4D1)1	(C4D2)1	(C4D3)1	(C4D4)1
	(C4D1)2	(C4D2)2	(C4D3)2	(C4D4)2
100 (C5)	(C5D1)1	(C5D2)1	(C5D3)1	(C5D4)1
	(C5D1)2	(C5D2)2	(C5D3)2	(C5D4)2

3.2.2.2. Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian pada tahap kedua ini dilakukan dengan menyiapkan sampel ekstraksi maserasi terbaik sebanyak 5 mL. Dimasukkan dalam labu ukur

dan diencerkan dengan aquades sebanyak 250 mL (hingga tanda batas). Hasil pengenceran diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi. Kemudian ditutup dengan aluminium foil dan dipanaskan menggunakan *waterbath* pada suhu 60°C (C1), 70°C (C2), 80°C (C3), 90°C (C4) dan suhu 100°C (C4) dengan waktu 5 menit (D1), 10 menit (D2), dan 15 menit (D3). Penentuan suhu dan waktu pemanasan ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Pandiangan (2009). Kemudian dilakukan pengujian antibakteri menggunakan metode sumuran untuk menentukan nilai MIC dan MBC. Tahapan pengujian stabilitas ini dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram uji stabilitas suhu dalam waktu berbeda
Sumber: Modifikasi Pandiangan (2009)

3.2.2.3. Parameter yang Diamati

Parameter pengamatan dari penelitian tahap 2 ini yaitu melihat besarnya daya hambat dari pemberian suhu terhadap ekstrak (Pandiangan, 2009). Hasil

terbaik dilakukan analisa nilai MIC dan MBC dari ekstrak *Tetraselmis chuii* sebagai antibakteri (Parhusip., et al 2010).

3.2.3. Prosedur Analisis Parameter

3.2.3.1. Rendemen (Prihanto et al.,2011)

Rendemen merupakan persentase total ekstrak etanol *Tetraselmis chuii* yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah bahan baku serbuk *Tetraselmis chuii* yang digunakan. Tujuan perhitungan rendemen yaitu untuk mengetahui persentase ekstrak etanol *Tetraselmis chuii* yang dihasilkan. Untuk mendapatkan hasil rendemen ekstrak dapat dihitung menggunakan persamaan :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat awal Sampel}} \times 100 \%$$

3.2.3.2. Parameter Uji Zona Hambat (Darjono, 2011)

Pada penelitian ini, metode difusi sumuran digunakan untuk mengetahui besarnya zona hambat bakteri. Langkah pertama yang dilakukan yaitu, bakteri diambil dari media MHB dengan menggunakan pipet serologis steril sebanyak 1ml kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi MHA steril dan dihomogenkan. Setelah suspensi bakteri homogen, kemudian dituang dalam cawan petri dan ditunggu hingga padat. Setelah media padat, pada setiap cawan petri dibuat sumuran dengan diameter 6 mm menggunakan alat pelubang. Masing - masing sumuran diisi dengan larutan ekstrak *Tetraselmis chuii* sebanyak 30 μ l. Setelah semua sumuran terisi sampel uji, cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, diamati dan diukur zona hambat yang terbentuk. Pengukuran diameter hambat dilakukan menggunakan jangka sorong digital dengan ketelitian 0,05 mm. Penentuan zona hambat didapatkan dari diameter hambat dikurangi diameter sumuran.

3.2.3.3. Penentuan Nilai MIC dan MBC (Parhusip *et al.*,2010)

Penentuan nilai MIC dan MBC dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar sumur. Konsentrasi pemberian ekstrak *Tetraselmis chuii* dari pelarut polar yaitu 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm dan 5000 ppm. MIC dan MBC didapatkan dengan menggambarkan kurva dengan $\ln Mo$ (konsentrasi ekstrak *Tetraselmis chuii*) pada sumbu X terhadap Z^2 (diameter penghambatan dikuadratkan) pada sumbu Y. Perpotongannya disebut Mt dan anti $\ln$ dari Mt menghasilkan MBC. MIC didapatkan dari nilai MBC dibagi 0,25. Adapun tahap penanaman bakteri pada media dengan menggunakan metode sumuran yaitu:

- Dilakukan media MHA sebanyak 38 g menggunakan aquadest hingga volume 1 L.
- Dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilakukan sterilisasi pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media steril didiamkan sampai kisaran suhu 50 - 60°C. Secara aseptis dicampurkan kultur bakteri uji dengan perbandingan 1:20 (1 ml bakteri dalam 20 ml media) dan dihomogenkan.
- Kultur yang telah tercampur dituang dalam cawan petri masing-masing 10 mL dan dibiarkan hingga media padat.
- Media yang telah tercampur dibuat sumuran menggunakan alat pelubang dengan diameter 6 mm.
- Diinjeksikan ekstrak *Tetraselmis chuii* (1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm dan 5000 ppm) ke dalam cawan petri yang telah dibuat sumuran.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C dalam inkubator.
- Setelah 24 jam, diukur zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong.
- Dihitung besarnya nilai MIC dan MBC hingga didapatkan hasil.

3.2.3.5. Analisa LC-MS

Pengujian LC – MS ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* bertujuan untuk mengetahui berat molekul dan senyawa antibakteri *Tetraselmis chuii*. Konsentrasi ekstrak terbaik dari uji daya hambat bakteri digunakan untuk dilakukan analisa LC-MS.

Kazakevich dan Lubritto (2007) mengatakan bahwa uji LC-MS dimulai dari pemisahan sampel pada kromatografi (LC) berdasarkan fase gerak dalam kolom dan kepolaran sampel dalam kolom. Nugraha (2014) menambahkan bahwa, adapun prinsip spektrofotometer massa dalam menghasilkan spektrum massa diantaranya yaitu, sampel harus dikenali terlebih dahulu, dalam fase gerak molekul netral dalam sampel diubah menjadi ion, dianalisa massa (terjadi pemisahan ion oleh rasio massa ke muatan) sehingga ion yang terpisah dapat terdeteksi.

Dalam spektrometer massa, terdapat dua komponen penting selama proses yaitu adanya sumber ion (*ion source*) sebagai penghasil ion dan analisa massa (*mass analyzer*) yang akan menyeleksi ion. Secara umum, sistem LC-MS menggunakan beberapa *mass analyzer* dan *ion source* sesuai dengan kepolaran senyawa yang dianalisa, sehingga komponen tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan yang harus disesuaikan dengan informasi yang dibutuhkan (Nagele, 2006).

3.2.3.6. Analisa Fitokimia (Harborne, 2006)

Uji fitokimia ini digunakan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang ada pada ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* yang diperoleh dari ekstraksi menggunakan metode maserasi. Uji fitokimia ini meliputi uji tanin, alkaloid, flavonoid, saponin, steroid, dan fenol.

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 1 ml ekstrak mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dari pelarut etanol dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambah dengan 5 tetes amonia pekat. Setelah itu, disaring kemudian ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberi lapisan atas dan bawah. Larutan dibagi menjadi 3 bagian, pada tabung pertama ditambahkan 1 tetes mayer, adanya alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan. Pada tabung kedua ditambah 1 tetes pereaksi Dragendorf dan terbentuknya endapan menandakan adanya alkaloid. Tabung ketiga ditambah 1 tetes pereaksi Wagner dan terbentuknya endapan. Reaksi dengan pereaksi Mayer akan terbentuk endapan putih, dengan pereaksi Dragendorff terbentuk endapan merah jingga dan dengan pereaksi wagner terbentuk endapan coklat.

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dari pelarut etanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah dengan 5 tetes etanol, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu ditambah dengan Mg 0,05 g dan 5 tetes HCl pekat. Jika menghasilkan warna kuning, orange, dan merah menandakan adanya flavonoid.

c. Uji kandungan steroid dan triterpenoid

Sebanyak 1 ml ekstrak mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dari pelarut etanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah dengan asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat. Jika terbentuk warna biru atau hijau menandakan adanya steroid. Jika terbantuk warna ungu atau jingga menandakan adanya triterpenoid.

d. Uji kandungan saponin

Sebanyak 1 ml ekstrak mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dari pelarut etanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 2 ml aquades, lalu

dikocok sampai homogen. Setelah itu, dipanaskan selama 2-3 menit. Tunggu hingga dingin, setelah itu kocok dengan kuat. Adanya busa yang stabil selama 30 detik menunjukkan sampel mengandung saponin.

e. Uji kandungan tanin

Sebanyak 1 ml ekstrak mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dari pelarut etanol dimasukkan dalam tabung reaksi. Kemudian ditambah 5 tetes NaCl 10%, lalu dikocok sampai homogen. Setelah itu disaring, filtrat yang dihasilkan ditambah dengan gelatin 1% dan NaCl 10%. Terbentuknya endapan menandakan adanya tanin.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada uji daya hambat dan stabilitas ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* sebagai antimikroba terhadap *Morganella morganii* terdapat dua tahapan penelitian yaitu tahap pertama dan tahap dua. Tahap pertama dilakukan untuk mendapatkan hasil terbaik dari rendemen dan daya hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*. Hasil terbaik dari tahap pertama digunakan sebagai tahap lanjutan pada tahap dua.

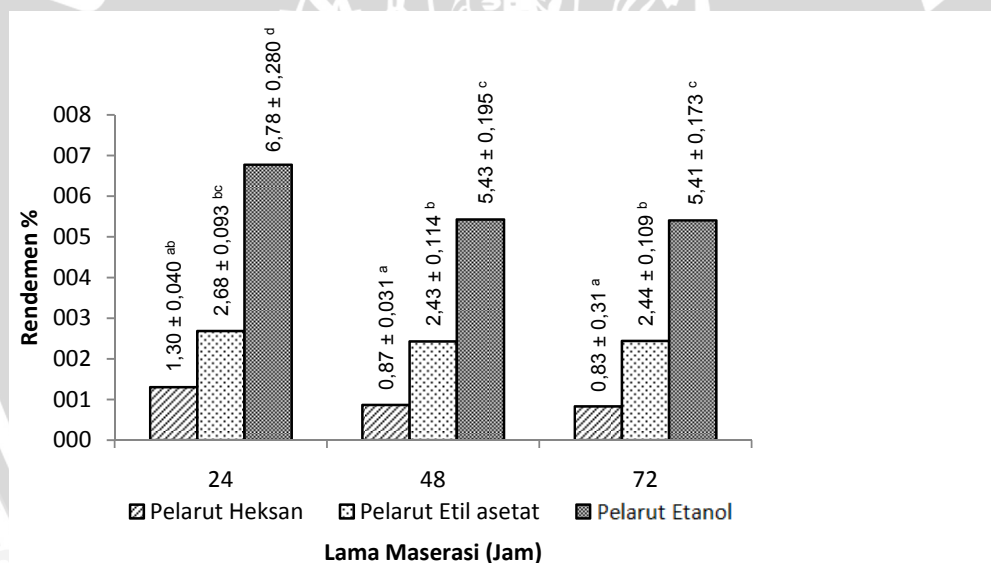
4.1. Penelitian Tahap Pertama

4.1.1. Rendemen Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii*

Pada penelitian ini, untuk mendapatkan ekstrak *Tetraselmis chuii* dilakukan ekstraksi dari mikroalga *Tetraselmis chuii* yang dilarutkan dengan pelarut heksan, etil asetat, dan etanol. Teknik perendaman dilakukan secara bertingkat mulai dari pelarut non polar hingga pelarut polar. Yudha (2008) mendefinisikan bahwa ekstraksi merupakan proses penarikan komponen dari suatu bahan, dengan kata lain bahwa ekstraksi ini merupakan proses pemisahan satu atau beberapa zat yang diinginkan dari sampel dengan bantuan pelarut. Tujuan dari ekstraksi menggunakan pelarut yaitu untuk mendapatkan ekstrak yang optimal berdasarkan jumlah dan senyawa aktif yang terkandung dalam mikroalga *Tetraselmis chuii* (Wenno *et al.*, 2010).

Penggunaan pelarut yang berbeda dan teknik pemberian pelarut secara bertingkat dalam ekstraksi ini bertujuan agar zat aktif yang terkandung dalam *Tetraselmis chuii* dapat terekstrak secara optimal sesuai kepolarannya. Dari hasil penelitian, didapat rata-rata nilai rendemen ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan etanol dengan lama maserasi selama 24 jam, 48 jam, dan 72 jam berkisar antara 1,20% - 8,36%.

Hasil perhitungan analisa keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan (DMRT) pemberian pelarut dan waktu perendaman terbaik dapat dilihat pada Lampiran 2. Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA) dari rendemen, terlihat bahwa maserasi dengan pemberian pelarut heksan, etil asetat dan etanol memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap hasil rendemen dan juga pemberian waktu 24, 48 dan 72 jam memiliki pengaruh yang tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Interaksi antara pemberian pelarut dan waktu terhadap peredaman memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen. Akibat adanya pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) pada perlakuan sehingga dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil uji lanjut Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Rendemen ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*

Dari hasil uji lanjut Duncan, perendaman serbuk *Tetraselmis chuii* menggunakan pelarut heksan selama 24 jam tidak berbeda nyata dengan dengan perendaman menggunakan pelarut heksan dalam waktu 48 jam dan 72 jam. Perendaman menggunakan pelarut etil asetat dalam waktu 24 jam, 48 jam dan 72 juga tidak memiliki perbedaan nyata dalam pemberian waktu.

Perendaman menggunakan pelarut etanol dalam waktu 24 jam, 48 jam dan 72 jam juga tidak memiliki perbedaan yang nyata. Adhianata (2012) menjelaskan bahwa penggunaan pelarut dan polaritas yang berbeda akan melarutkan senyawa dari biomassa sel *Tetraselmis chuii* berdasarkan kepolaran masing-masing pelarut.

Dari hasil analisa pada Gambar 5, diduga bahwa semakin polar suatu pelarut yang digunakan maka semakin optimal pula hasil ekstrak yang didapatkan, namun pemberian waktu tidak memiliki pengaruh yang nyata dalam menghasilkan ekstrak yang optimal. Ortuno *et al.*, (2010) menyatakan bahwa jenis pelarut dan lama maserasi memiliki interaksi yang nyata terhadap rendemen yang dihasilkan. Namun dari hasil penelitian tahap pertama yang dilakukan, diduga waktu tidak memberikan perbedaan yang nyata. Hasil ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Spigno dan DeFaveri (2007), dengan pemberian pelarut dan lama maserasi pada rasio tertentu tidak memberikan efek peningkatan rendemen, hal ini disebabkan karena kondisi bahan dan pelarut menjadi jenuh. Komara (1991) juga menambahkan bahwa pemberian lama maserasi pada larutan yang telah mencapai titik jenuh tidak menghasilkan ekstrak yang lebih baik.

Warna dari hasil perendaman juga tampak berbeda nyata antara perendaman menggunakan pelarut heksan, etil asetat dan etanol. Sampel dengan perendaman heksan tampak berwarna coklat kekuningan seperti yang dapat dilihat pada Lampiran 12. Warna yang tampak coklat kekuningan ini diduga karena adanya kandungan karotenoid. Salisbury dan Ross 1995, menyatakan bahwa karotenoid ini merupakan pigmen warna dengan kandungan warna kuning, jingga, atau merah yang terdapat dalam berbagai macam plastid berwarna (kromoplas).

Warna sampel dari hasil perendaman menggunakan pelarut etil asetat menghasilkan warna hijau pekat, terbentuknya warna hijau pekat ini diduga karena adanya karbohidrat, asam amino, dan gula yang ikut terlarut dalam pelarut etil asetat. Brown (2005) menjelaskan bahwa *Tetraselmis chuii* mengandung protein sebesar 31%, karbohidrat 12,1%, dan klorofil a 1,425. Ditambahkan oleh Adhianata (2012), permeabilitas membran sel *Tetraselmis chuii* akan berubah akibat adanya polaritas yang sama antara dinding sel dengan pelarut sehingga komponen sel *Tetraselmis chuii* dapat terlarut dalam pelarut.

Pelarut yang bersifat polar diduga dapat mengekstrak senyawa organik seperti alkaloid, gula dan asam amino. Sifat dari pelarut polar dengan nilai konstanta dielektrik yang tinggi dapat menyebabkan dinding sel terbuka sehingga komponen dalam sel dapat tertarik keluar (Harborne, 2006; Heat dan Reineccius, 1996). Dari hasil penelitian yang dilakukan, perendaman menggunakan pelarut etanol menghasilkan warna hijau tua seperti yang dapat dilihat pada Lampiran 12. Warna hijau tua ini diduga karena terekstraknya kandungan klorofil dari mikroalga *Tetraselmis chuii*. Yudha (2008) dalam penelitiannya, dihasilkan warna hijau tua dari perendaman mikroalga *Dunaliella sp* menggunakan pelarut etanol, sedangkan penelitian Sugiastuti (2002) melakukan perendaman daun sirih menggunakan pelarut etanol juga menghasilkan warna hijau kehitaman yang disebabkan oleh kandungan klorofil dalam daun sirih. Seperti yang diketahui bahwa klorofil merupakan zat hijau daun yang memiliki peranan sangat penting dalam proses fotosintesis (Salisbury dan Ross, 1995). Pada penelitian tahap pertama ini, hasil ekstrak yang didapat masih berupa ekstrak kasar dengan kandungan senyawa lainnya bukan hanya komponen yang diinginkan secara sempurna kecuali ekstrak dilanjutkan dengan pemurnian.

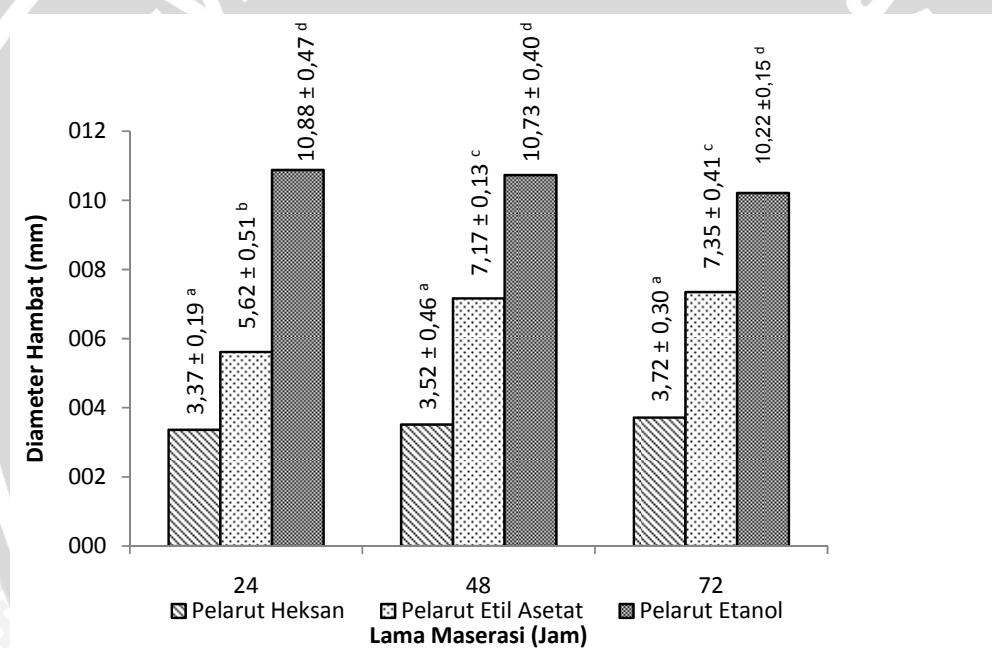
4.1.2. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii*

Tahap pertama yang dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dalam ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* maka dilakukan uji kualitatif terhadap pertumbuhan bakteri. Ketika kandungan mikroalga tinggi dalam sebuah kolam, bakteri koliform dan bakteri patogen dapat mati dengan cepat, hal ini membuktikan bahwa mikroalga memiliki kandungan senyawa yang mampu dijadikan sebagai antimikroba (Fogg, 1975). Makridis *et al.*, (2006) menyatakan bahwa dua spesies mikroalga terdeteksi dapat bertindak sebagai bakterisidal terhadap bakteri gram negatif, namun mekanisme penghambatan belum dapat ditentukan.

Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menggunakan metode difusi sumuran. Ekstrak yang ditambahkan dalam setiap lubang sebanyak 30 μ l. Kemampuan penghambatan ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* diindikasikan dengan terbentuknya zona bening disekitar permukaan media yang telah dimasukkan ekstrak. Dari hasil penelitian ini, diduga bahwa ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri, hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona bening di sekitar sumuran yang telah diberikan ekstrak. Sebagai penentuan bahwa ekstrak mengandung antibakteri dilakukan percobaan dengan memberikan kontrol positif (antibiotik Kloramfenikol) dan kontrol negatif (air). Kusmiyati dan Agustini (2007) menyatakan bahwa kontrol positif digunakan untuk membandingkan kemampuan hambat mikroalga sebagai larutan uji mempunyai efek antibakteri yang sebanding atau lebih kecil dari diameter hambat antibiotik kloramfenikol.

Diameter hambat yang terbentuk dari ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* memiliki hasil yang berbeda. Hasil uji lanjut Duncan uji daya hambat terbaik dapat dilihat pada Lampiran 4. Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA) terlihat

bahwa hasil ekstrak dari perlakuan lama maserasi dengan pemberian pelarut heksan, etil asetat dan etanol memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter hambat *Morganella morganii*. Namun waktu perendaman ekstrak selama 24, 48 dan 72 jam tidak berpengaruh nyata ($p > 0,05$) terhadap pembentukan diameter hambat *Morganella morganii*. Interaksi antara perlakuan lama maserasi terhadap pembentukan diameter hambat bakteri memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Akibat adanya pengaruh yang berbeda nyata sehingga dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil uji lanjut dengan uji Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diameter hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* berbagai pelarut dan lama maserasi

Dari hasil uji lanjut Duncan, pembentukan diameter hambat ekstrak dengan lama maserasi selama 24 jam menggunakan pelarut heksan tidak berbeda nyata dengan pembentukan diameter hambat dari ekstrak dengan lama maserasi sampel selama 48 jam dan 72 jam dengan pelarut sama. Ekstrak dengan maserasi selama 24 jam menggunakan etil asetat menghasilkan diameter hambat yang berbeda nyata dari ekstrak dengan maserasi selama 48

jam dan 72 jam, namun besarnya diameter hambat pada maserasi 48 jam tidak berbeda nyata dengan pembentukan diameter hambat ekstrak pada maserasi 72 jam. Terbentuknya diameter hambat dari ekstrak dengan maserasi selama 24 jam menggunakan pelarut etanol memiliki pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan diameter hambat dari ekstrak dengan maserasi selama 48 jam dan 72 jam. Dari grafik di atas, diduga bahwa pemberian pelarut berbeda pada ekstrak juga memiliki pengaruh dalam terbentuknya diameter hambat dari media tumbuh *Morganella morganii*. Kemampuan ini diduga akibat dari kemampuan ekstrak dalam merusak dinding sel bakteri. Widayanti (2012) menyatakan bahwa setiap mikroorganisme mampu menunjukkan respon antimikroba yang berbeda untuk tiap ekstrak dengan perlakuan yang sama. Nagarajan *et al.*, (2011) menyatakan bahwa, semakin lama maserasi yang digunakan, maka konsentrasi senyawa bioaktif yang dapat diikat oleh pelarut semakin meningkat sehingga mampu berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan baik.

Dari Gambar 6 menunjukkan bahwa ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* yang diekstrak menggunakan pelarut heksan, etil asetat, dan etanol memiliki aktivitas dalam menghambat bakteri. Aktivitas penghambatan dari masing-masing perlakuan menghasilkan diameter hambat yang berbeda seiring dengan tingkat kepolaran pelarut yang digunakan saat ekstraksi. Hasil pengujian antibakteri ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap pertumbuhan *Morganella morganii* didapat besarnya diameter hambat yang terbentuk berkisar antara 3,37 mm hingga 10,88 mm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Adhianata (2012) dimana diameter hambat yang terbentuk pada cawan dengan bakteri uji *Escherchia coli* memiliki kisaran diameter hambat sebesar 11,13 – 16,07 mm. Widayanti (2012) dalam penelitiannya, diketahui bahwa diameter hambat yang terbentuk berkisar antara 8,10 mm – 14,30 mm. Perbedaan diameter hambat yang terbentuk diduga karena kemampuan mikroorganisme

dalam merespon senyawa antibakteri dari setiap ekstrak berbeda. Kalemba dan Kunicka (2003) menjelaskan bahwa senyawa antibakteri memiliki kemampuan yang berbeda dalam merusak dinding sel bakteri. Adanya senyawa yang masuk dalam membran sel bakteri mengakibatkan terganggunya proses metabolisme seperti penyerapan *nutrient*, transport elektron dan produksi energi (Nychas, 1995).

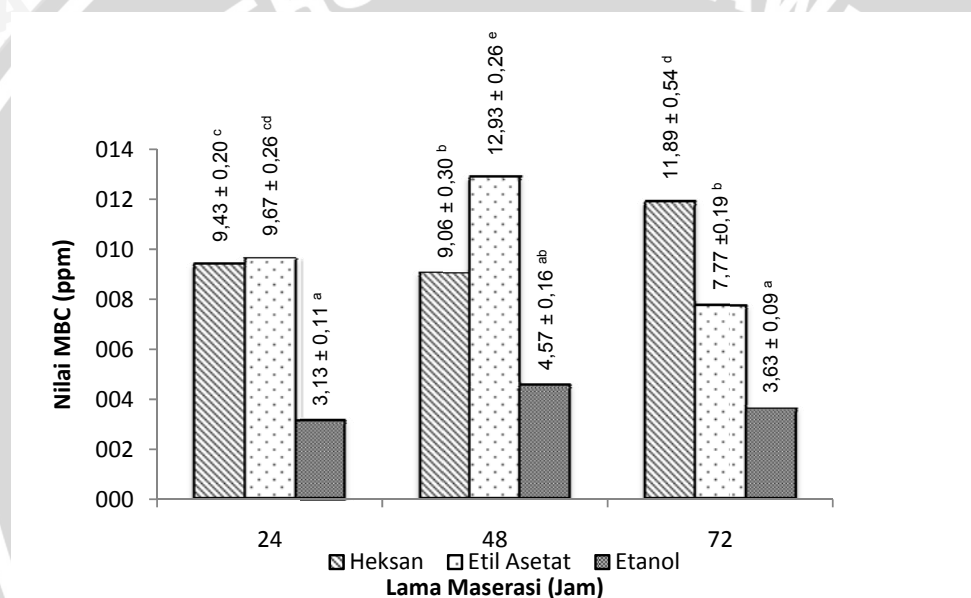
4.1.3. Uji MBC (*Minimum Bacterial Concentration*) dan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii*

4.1.3.1. Uji MBC (*Minimum Bacterial Concentration*)

Uji MBC digunakan sebagai indikator uji untuk mengetahui konsentrasi pemberian ekstrak dalam membunuh bakteri. Uji MIC merupakan indikator uji pemberian konsentrasi terhadap ekstrak yang digunakan untuk mengetahui besarnya daya hambat bakteri. Santoso *et al.*, (2011) menyatakan bahwa MIC merupakan kadar terendah antibakteri dalam menghambat bakteri, sedangkan MBC merupakan kadar terendah antibakteri yang dapat membunuh bakteri yang ditandai dengan pertumbuhan koloni $<0,1\%$. Akibat adanya efek penghambatan dan kemampuan bunuh bakteri dari pemberian konsentrasi ekstrak, maka ekstrak dapat dikelompokkan menjadi senyawa antibakteri yang bersifat bakterisidal dan bakteristatik (Wahyuni, 2010).

Data hasil MBC terhadap aktivitas *Morganella morganii* diperoleh dengan membuat konsentrasi ekstrak yang bervariasi. Konsentrasi yang digunakan yaitu 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm dan 5000 ppm serta dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali. Perhitungan nilai MBC ini didapat dari perpotongan sumbu X terhadap sumbu Y seperti yang dapat dilihat pada Lampiran 5. Penentuan nilai MBC terbaik ditentukan dari analisa keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan seperti yang dapat dilihat pada Lampiran 6.

Berdasarkan analisa keragaman bahwa pelarut etanol, etil asetat dan etanol memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap besarnya nilai MBC sedangkan lama perendaman 24, 48 dan 72 jam tidak memiliki pengaruh berbeda nyata ($p>0,05$). Adapun interaksi dari perlakuan pemberian pelarut, waktu perendaman dan pemberian konsentrasi ekstrak berbeda memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p<0,05$) terhadap besarnya nilai MBC. Akibat adanya pengaruh berbeda nyata ($p<0,05$) pada ANOVA kemudian dilakukan uji lanjut Duncan. Adapun Hasil uji lanjut dengan uji Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 7.



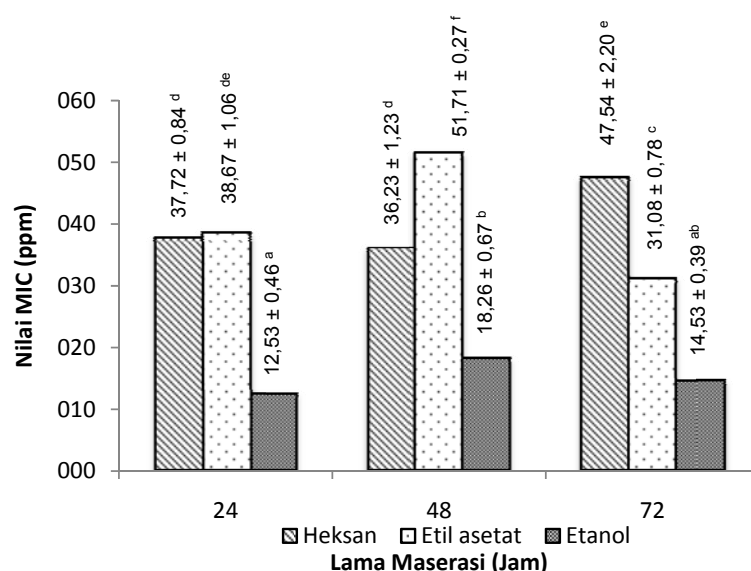
Gambar 7. Nilai MBC dengan pemberian pelarut dan lama maserasi berbeda

Dari hasil uji lanjut Duncan, perlakuan lama maserasi 24 jam menggunakan pelarut heksan berbeda nyata dengan perlakuan dengan lama maserasi 48 jam dan 72 jam perendaman menggunakan pelarut heksan. Perendaman dengan pelarut etil asetat dengan lama maserasi 24 berbeda nyata dengan perendaman 48 jam dan 72 jam. Perendaman menggunakan pelarut etanol dengan waktu 24 jam tidak berbeda nyata dengan perendaman dengan waktu 48 jam dan 72 jam. Keefektifan ekstrak sebagai bakterisidal diduga karena senyawa antibakteri yang terkandung dalam *Tetraselmis chuii* memiliki

kemampuan dalam membunuh bakteri gram negatif seperti *Morganella morganii*. Pemberian ekstrak dengan konsentrasi berbeda mampu membunuh bakteri hingga konsentrasi terkecil. Nilai MBC yang tampak pada gambar di atas memiliki kisaran bunuh bakteri antara $3,13 \pm 0,11$ ppm hingga $12,93 \pm 0,26$ ppm. Sri *et al.*, (2005) menyatakan bahwa, semakin tinggi konsentrasi senyawa antimikroba dalam ekstrak sampel uji, maka kemampuan dalam membunuh dan mengendalikan mikroba semakin besar.

4.1.3.2. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Penggunaan uji MIC dimaksudkan untuk mengetahui batas minimum pemberian konsentrasi ekstrak dalam menghambat. Dengan mengetahui besarnya nilai MIC maka dapat ditentukan pula apakah senyawa dari ekstrak uji dapat digunakan sebagai bakteristatik. Pada penelitian ini, nilai MIC dapat ditentukan dari besarnya nilai MBC yang telah diperoleh dibagi dengan 0,25. Hasil MIC terbaik dapat ditentukan melalui analisa keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan seperti yang dapat dilihat pada Lampiran 7. Berdasarkan analisa keragaman (ANOVA) bahwa pelarut etanol, etil asetat dan etanol memiliki pengaruh yang berbeda nyata terhadap besarnya nilai MIC sedangkan lama perendaman 24, 48 dan 72 jam tidak memiliki pengaruh berbeda nyata ($p > 0,05$). Adapun interaksi dari perlakuan pemberian pelarut, waktu perendaman dan pemberian konsentrasi ekstrak berbeda memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap besarnya nilai MIC. Adanya pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) pada ANOVA sehingga dilakukan uji lanjut Duncan. Secara ringkas besarnya nilai MIC dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Nilai MIC dari lama maserasi dan pelarut berbeda

Dari hasil uji lanjut Duncan, pemberian ekstrak dengan lama maserasi 24 jam menggunakan pelarut heksan tidak berbeda nyata dengan lama maserasi 48 jam dan 72 jam. Pemberian ekstrak hasil dari maserasi selama 24 jam dengan pelarut etil asetat berbeda nyata terhadap hasil MIC pemberian ekstrak dengan lama maserasi selama 48 jam dan 72 jam. Besarnya hasil MIC juga memiliki pengaruh berbeda nyata dari ekstrak hasil maserasi dengan pelarut etanol dengan maserasi selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Perhitungan besarnya nilai MIC seperti pada grafik di atas diduga bahwa dengan pemberian ekstrak yang dimaserasi menggunakan pelarut yang berbeda memiliki nilai MIC yang berbeda pula. Adapun besarnya nilai MBC dan MIC ekstrak sampel uji sebagai bakterisidal dan bakteristatik dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. MBC dan MIC *Morganella morganii* berbagai pelarut

Perlakuan	MBC (ppm)	MIC (ppm)
Ekstrak Etanol maserasi 24 jam	3,13 ± 0,11 ^a	12,53 ± 0,48 ^a
Ekstrak Etil asetat maserasi 72 jam	7,77 ± 0,19 ^b	31,08 ± 0,78 ^c
Ekstrak Heksan maserasi 48 jam	9,06 ± 0,30 ^b	36,23 ± 1,23 ^d

Dari data hasil pengujian seperti yang tampak pada tabel di atas, ekstrak *Tetraselmis chuii* diduga memiliki senyawa antibakteri yang dapat digunakan

untuk menentukan besarnya MBC dan MIC. Nilai MBC dan MIC terkecil menunjukkan bahwa pemberian konsentrasi terkecil masih memiliki kemampuan dalam membunuh dan menghambat bakteri. Dari hasil penelitian, diduga bahwa ekstrak *Tetraselmis chuii* yang dimaserasi dengan pelarut etanol memiliki kemampuan yang lebih efektif dalam membunuh dan menghambat *Morganella morganii* dibandingkan dengan pelarut etil asetat dan pelarut heksan. Kemampuan bunuh dan hambat hingga konsentrasi terkecil diduga karena adanya komponen senyawa aktif yang dapat menjadi antibakteri bagi *Morganella morganii*. Dalam penelitian Parhusip *et al.*, (2010) menjelaskan bahwa, ekstrak sampel uji yang digunakan lebih efektif menghambat dan membunuh bakteri gram positif pada nilai MBC sebesar 1,32% dan MIC sebesar 0,53% dibanding bakteri gram negatif pada nilai MBC sebesar 3,22% dan nilai MIC sebesar 1,29%. Diameter hambat yang terbentuk dalam permukaan media tumbuh bakteri setelah inkubasi selama 24 jam menunjukkan bahwa senyawa dalam ekstrak uji dapat menghambat pertumbuhan bakteri, baik bakteri gram positif maupun negatif (Polapa, 2015).

4.1.4. Uji Fitokimia

Uji fitokimia adalah analisa uji senyawa bioaktif yang terdapat pada tumbuhan yang memiliki fungsi tertentu bagi manusia. Prameswari dan Simon (2014), menjelaskan bahwa uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa bioaktif yang dapat berperan sebagai antimikroba. Adapun metode identifikasi fitokimia ini dibagi menjadi tiga macam yaitu, pengujian dengan KLT, reaksi pengendapan, dan reaksi warna. Pada penelitian ini, digunakan metode pengujian reaksi warna dan reaksi pengendapan dalam mengetahui kandungan senyawa fitokimia dalam *Tetraselmis chuii*. Adapun hasil uji fitokimia dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*

Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil	Kesimpulan
Alkaloid	Wagner	Terbentuk endapan putih	+
	Mayer	Terbentuk endapan merah	+
	Dragendroff	Terbentuk endapan coklat	+
Tanin	FeCl ₃	Terbentuk warna hijau kehitaman	+
Flavonoid	Mg dan HCl	Tidak terbentuk warna merah	-
Saponin	HCl 2 N	Busa tidak stabil selama 30 menit	-
Steroid	Asam sulfat	Terbentuk warna hijau	+
Triterpenoid	Asam asetat anhidrat	Terbentuk warna jingga	+

Ket: (+) = mengandung senyawa uji
 (-) = tidak mengandung senyawa uji

Dari hasil penelitian uji fitokimia, mikroalga *Tetraselmis chuii* diduga mengandung senyawa alkaloid, hal ini ditandai dengan terbentuknya endapan putih setelah penambahan pereaksi wagner, endapan merah bata setelah penambahan pereaksi Mayer dan endapan coklat setelah penambahan pereaksi Dragendroff. Kandungan metabolit sekunder berupa alkaloid, flavonoid, dan terpenoid yang dimiliki oleh mikroalga laut dapat dimanfaatkan sebagai sebagai antibakteri (Mudjiman, 2004). Bowo *et al.*, (2009) menyatakan bahwa, alkaloid mampu dijadikan sebagai antimikroba karena kemampuan alkaloid dalam mengacaukan komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroba, sehingga lapisan dinding sel tidak dapat terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut.

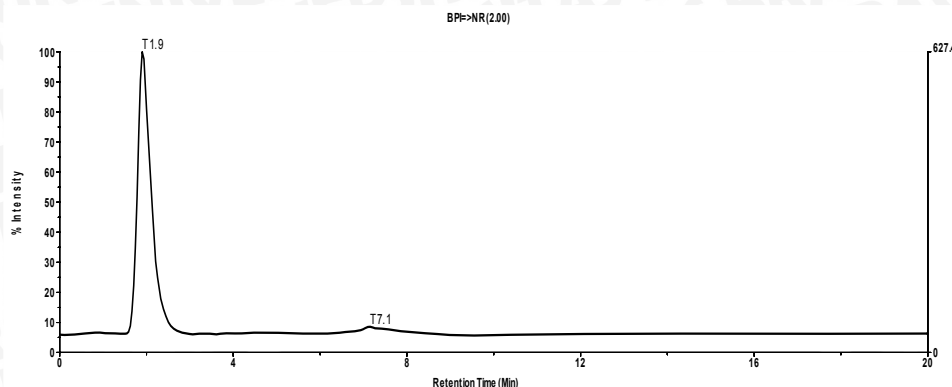
Terbentuknya warna hijau kehitaman setelah penambahan FeCl₃ pada sampel *Tetraselmis chuii* diduga bahwa *Tetraselmis chuii* mengandung senyawa tanin. Harborne (2006) memaparkan bahwa kandungan senyawa tanin pada tumbuhan memiliki kemampuan dalam mengendapkan protein yang mampu membentuk kopolimer sehingga tidak larut dalam air. Tanin sebagai antibakteri bekerja dalam menghambat aktivasi DNA (Nuri *et al.*, 2009) dan inaktivasi enzim (Widiana, 2010) sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk.

Terbentuknya warna jingga diawal dan dilanjutkan dengan warna hijau dalam sampel uji setelah penambahan asam asetat dan asam sitrat anhidrat

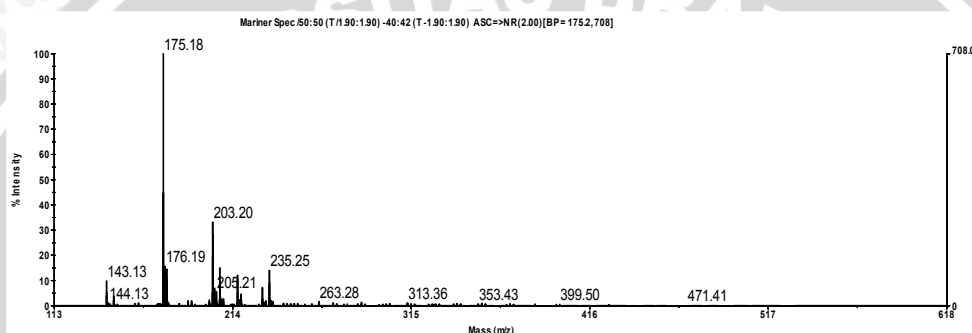
diduga sampel uji memiliki kandungan triterpenoid dan steroid. Mekanisme kerja senyawa terpenoid dalam menghambat bakteri yaitu bereaksi dengan porin, rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri. Mekanisme kerja steroid yaitu, berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat impermeabel terhadap senyawa lipofilik yang menyebabkan membran menurun, turunnya integritas membran menyebabkan membran sel rapuh dan lisis (Sulastrianah *et al.*, 2014).

4.1.5. Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* menggunakan LC-MS

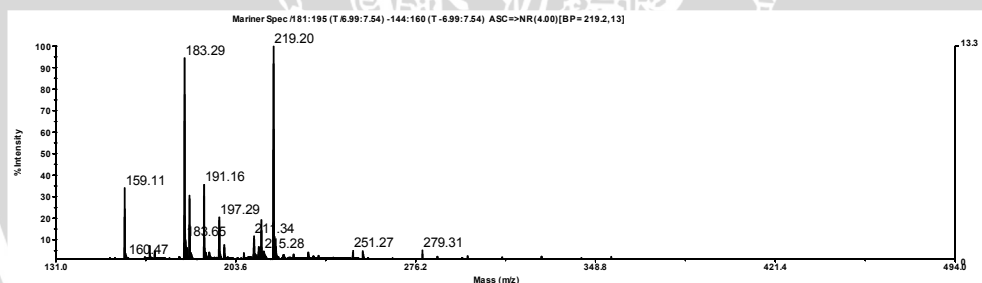
Pengujian LCMS-ESI ekstrak kasar mikroalga *Tetraselmis chuii* dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Kimia-LIPI, Serpong, Tangerang Selatan. Pengujian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam ekstrak berdasarkan berat molekul senyawa ekstrak. Hasil pengujian ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* menggunakan LCMS-ESI menunjukkan dua retensi waktu dengan masing-masing puncak sebesar 1,9 menit dan 7,1 menit. Senyawa yang teridentifikasi dari dua retensi waktu yang tampak menghasilkan 2 puncak MS tertinggi. Anggara (2015), menyatakan bahwa puncak dengan retensi waktu yang besar memiliki suatu jenis senyawa dengan kelimpahan yang tinggi. Hasil analisa pola spektrum LC-MS ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* pelarut etanol secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 9, 10, dan 11.



Gambar 9. Pola kromatogram ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* pelarut etanol



Gambar 10. Pola spektrum massa Rt 1,9 ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*



Gambar 11. Pola spektrum massa Rt 7,15 ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*

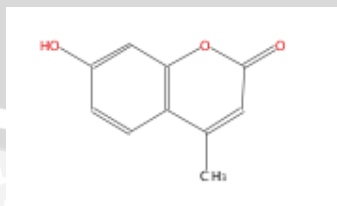
Hasil analisa spektrum MS pada Rt 1,90 seperti pada Lampiran 10 menunjukkan beberapa puncak tertinggi yang menandakan fragmentasi berdasarkan berat molekulnya. Pada Rt 1,90 dengan puncak MS tertinggi diduga memiliki spektrum puncak 175,18 m/z. Secara teoritis puncak yang muncul dengan nilai m/z berdekatan terjadi karena masih melekatnya atom H yang tidak hanya satu, dua bahkan lebih, sehingga untuk m/z dapat diketahui melalui $(M+H)^+$. Ion H^+ akan melekat pada atom N atau O pada gugus karbonil ($O=C$) (Dao *et al.*, 2009). Analisa yang digunakan untuk menentukan senyawa dari hasil

kromatogram LC yaitu dengan memasukkan besarnya mass spectra ke dalam tabel database (massbank.jp) yang kemudian ditentukan dengan melihat unsur senyawa dari senyawa-senyawa yang muncul pada database. Dari unsur senyawa tersebut dipilih senyawa polar dengan ikatan senyawa OH. Berdasarkan penelusuran database spektra melalui website (massbank.jp) diduga senyawa yang ada pada ekstrak kasar mikroalga *Tetraselmis chuii* seperti yang dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Senyawa analisa LC-MS ESI Positif

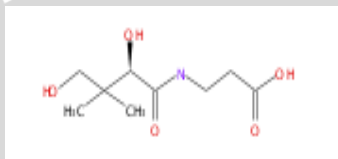
Retensi Time	Massa ion (m/z)	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
1,90	176,04	7-Hydroxy-4-methylcoumarin	C ₁₀ H ₈ O ₃
7,1	219,11	D-Pantothenic acid	C ₉ H ₁₇ NO ₅

Penelusuran senyawa melalui database, puncak spektrum yang dapat dijadikan sebagai antimikroba diduga pada 176,18 m/z dengan *relative intensity* analisis 15,61. Berdasarkan penelusuran database melalui website (massbank.jp) senyawa teranalisis diduga merupakan senyawa 7-Hydroxy-4-methylcoumarin (Cuthbertson *et al.*, 2004) yang merupakan senyawa turunan kumarin dengan MS fragmen sebesar 176,04 m/z. Adapun rumus kimia senyawa ini yaitu C₁₀H₈O₃. Wibowo 2010 menyatakan bahwa senyawa 7-Hydroxy-4-methylcoumarin merupakan senyawa turunan kumarin dimana senyawa kumarin memiliki efek toksik terhadap bakteri, bersifat antiradang dan antialergi. Struktur kimia senyawa 7-Hydroxy-4-methylcoumarin dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 12. Struktur kimia senyawa 7-Hydroxy-4-methylcoumarin

Dari hasil analisa LC-MS ESI positif dengan Retention time 7,15 min tampak bahwa puncak tertinggi sampel uji sebesar 219,20 m/z. Berdasarkan penelusuran menggunakan database melalui website (massbank.jp), senyawa analisis yang muncul ini diduga merupakan senyawa *D-Pantothenic acid* yang merupakan senyawa turunan vitamin B₅ (Kakazhu *et al.*, 2008). Adapun rumus kimia dari senyawa ini yaitu C₉H₁₇NO₅. Haliza *et al.*, (2007) menyatakan bahwa kandungan asam pantotenat efektif dalam melawan diare yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Struktur kimia *D-Pantothenic acid* dapat dilihat pada Gambar 13.



Kumarin merupakan suatu metabolit yang sering dijumpai sebagai glikosidal (Suryaningrum, 2011). Wardakhan dan Nadia (2007) membuktikan bahwa senyawa kumarin mempunyai aktivitas antibakteri pada bakteri gram negatif. Hampir semua kumarin mempunyai oksigen pada C-7, pada posisi lain dapat teroksidasi dan terdapat rantai samping alkil (Robinson, 1995). Asam pantotenat merupakan salah satu nutrisi yang sangat penting dalam aktivitas biologi bakteri probiotik hasil fermentasi produk (Isolauri *et al.*, 2001). Munasir (2001) menyatakan bahwa asam pantotenat (vitamin B₅) berperan dalam menstimulasi sistem kekebalan (*imune*) tubuh.

4.2. Penelitian Tahap Dua

Penelitian tahap dua ini merupakan penelitian lanjutan, dimana hasil terbaik yang telah didapatkan dari penelitian tahap satu dilakukan pengujian kembali dengan memberikan pengaruh suhu dan waktu pada ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*. Adapun parameter pengujian pada tahap dua ini diantaranya

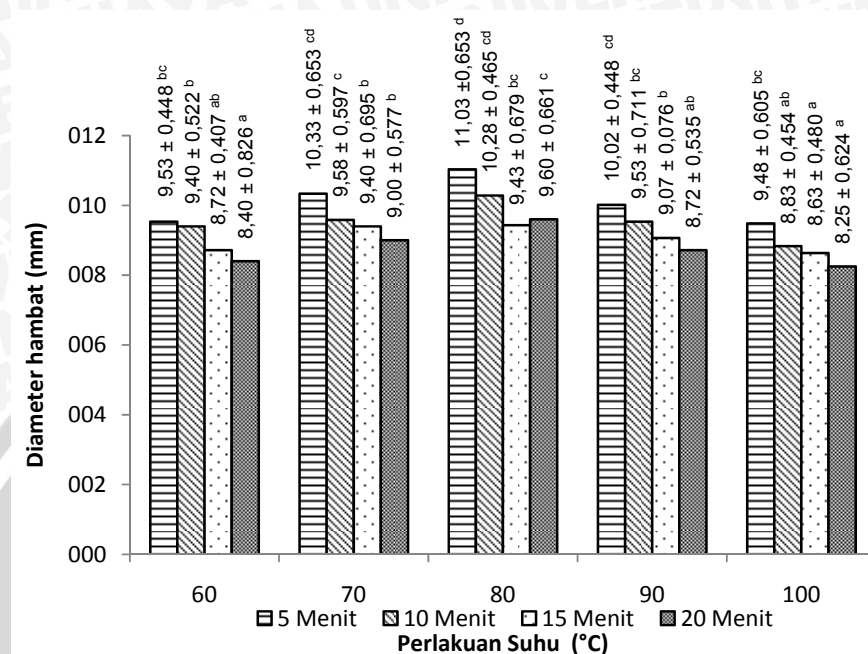
yaitu, pengujian daya hambat dengan pemberian suhu dan waktu pada ekstrak. Parameter uji yang dilakukan yaitu, penentuan konsentrasi ekstrak sehingga dapat diketahui MIC dan MBC ekstrak terhadap *Morganella morganii*.

4.2.1. Uji Stabilitas Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* terhadap Daya Hambat *Morganella morganii*

Hasil uji daya hambat bakteri dari ekstrak kasar yang telah dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa ekstrak yang dimaserasi dengan pelarut etanol memiliki daya hambat yang lebih efektif terhadap *Morganella morganii* dibandingkan dengan ekstrak yang dimaserasi menggunakan pelarut heksan dan etil asetat. Setelah didapat ekstrak terbaik, uji selanjutnya yaitu dengan diberikan perlakuan suhu dan waktu berbeda. Suhu dan waktu yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, pemberian suhu 60°C, 70°C, 80°C, 90°C dan 100°C dengan waktu pemanasan selama 5, 10, 15 dan 20 menit.

Pengujian kemampuan hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii* dengan diberikan perlakuan suhu dan waktu yang berbeda dapat membentuk diameter hambat yang berbeda pula. Hasil perhitungan analisa keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan pada perlakuan pemberian suhu dan waktu terbaik dari ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 8. Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA) dari diameter hambat, terlihat bahwa suhu 60°, 70°, 80°, 90° dan 100°C memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter hambat dan juga pemberian waktu pemanasan 5, 10, 15 dan 20 menit memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$). Interaksi antara pemberian suhu dan waktu pemanasan terhadap diameter hambat ekstrak memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap kemampuan hambat ekstrak terhadap bakteri. Akibat adanya pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) pada

perlakuan sehingga dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil uji lanjut Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Grafik rerata daya hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii*

Hasil lanjut uji Duncan seperti yang terlihat pada Lampiran 8 menunjukkan bahwa pemanasan ekstrak *Tetraselmis chuii* pada suhu 60°C selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit. Pada pemanasan ekstrak dengan suhu 70°C dengan waktu pemanasan 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10, 15 dan 20 menit, namun pemanasan selama 10 dan 15 menit tidak berbeda nyata. Pemanasan ekstrak *Tetraselmis chuii* dengan suhu 80°C selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit. Pemberian suhu 90°C dengan waktu pemanasan ekstrak selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan ekstrak selama 10, 15 dan 20 menit, Pada pemberian suhu sebesar 100°C dengan pemanasan selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan ekstrak selama 10 menit, 15 menit, dan 20 menit, namun pemanasan ekstrak selama 15 dan 20 menit tidak berbeda nyata.

Pemanasan pada suhu 80°C selama 5 menit didapat diameter hambat yang lebih besar, diduga karena pada suhu 80°C senyawa pada ekstrak *Tetraselmis chunii* belum rusak akibat pemanasan. Dari notasi grafik di atas, diduga bahwa semakin tinggi pemberian suhu maka semakin rendah pula diameter hambat yang terbentuk pada permukaan media tumbuh bakteri. Dalam penelitian Parhusip *et al.*, (2005) bahwa ekstrak etanol dapat menghambat dengan lebih efektif karena suhu didih etanol yang mampu mencapai 78°C. Data penghambatan terendah diperoleh pada pemanasan dengan suhu 100°C selama 20 menit, hal ini diduga akibat suhu yang terlalu tinggi dengan waktu yang lama. Cornelia (2005) menyatakan bahwa, ekstrak yang dipanaskan hingga mendidih menunjukkan terjadinya penurunan diameter hambat, hal ini diakibatkan karena rusaknya senyawa antimikroba sampel uji akibat pemanasan yang berlebihan. Dalam penelitian Nugroho dan Rahayu (2003), bahwa terjadi penurunan aktivitas antibakteri akibat suhu yang tinggi.

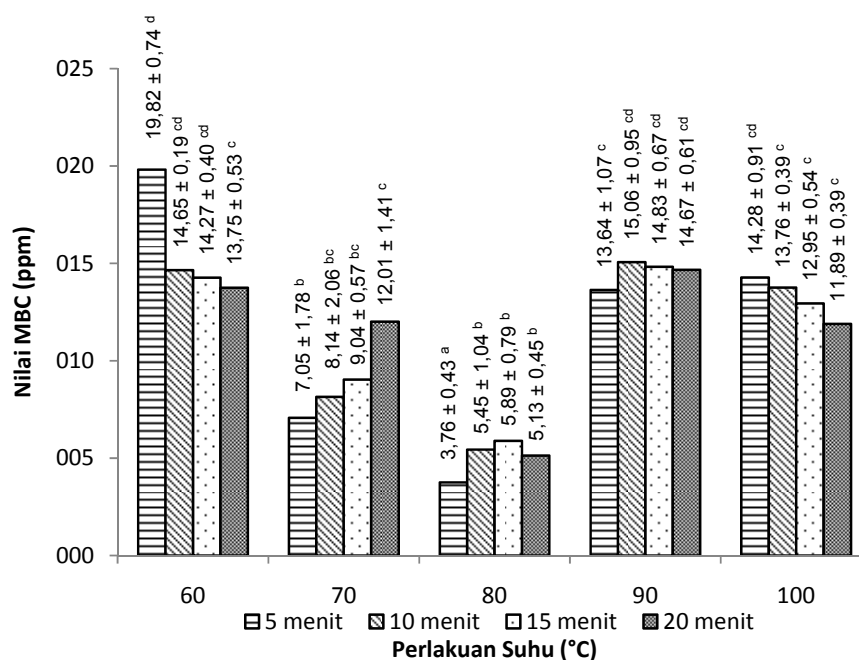
Dari Gambar 14 dapat diketahui bahwa rata-rata diameter hambat yang terbentuk memiliki nilai tertinggi sebesar $11,03 \pm 0,653$ mm. Nilai terendah yang diperoleh dari diameter hambat ekstrak kasar *Tetraselmis chunii* sebesar $8,25 \pm 0,624$ mm. Semakin tinggi suhu dan semakin lama waktu pemanasan diduga dapat menyebabkan kerusakan pada senyawa yang terkandung dalam ekstrak uji. Namun, pada suhu 80°C pemanasan selama 5 menit, ekstrak *Tetraselmis chunii* diduga mampu menghambat dengan efektif Hal ini sesuai dengan penelitian Parhusip *et al.*, (2005), bahwa aktivitas penghambatan pada suhu 80°C dengan pelarut etanol memiliki pengaruh yang cukup baik terhadap daya hambat bakteri.

4.2.2. Uji Stabilitas MBC (*Minimum Bacterial Concentration*) dan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) *Morganella morganii*

Pengujian lebih lanjut ekstrak *Tetraselmis chuii* setelah dilakukan uji daya hambat dengan pemberian suhu adalah penentuan besarnya nilai MBC dan MIC dari ekstrak sampel uji. Nilai MIC dan MBC ini bertujuan untuk mengetahui seberapa kuat sampel *Tetraselmis chuii* mampu dijadikan sebagai bakterisidal dan bakteristatik. Ibrahim (2013) dalam penelitiannya menyatakan bahwa dengan diketahui besarnya diameter hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak yang diberikan maka dapat diketahui bahwa ekstrak sampel uji mampu bersifat bakterisidal maupun bakteristatik.

4.2.2.1. Uji Stabilitas Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* terhadap MBC (*Minimum Bacterial Concentration*)

Perhitungan besarnya nilai MBC yang didapat dari uji stabilitas ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* dilakukan melalui pengukuran daya hambat dari konsentrasi ekstrak yang telah ditentukan. Adapun konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu, 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm dan 5000 ppm. Metode uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi agar lubang. Hasil analisis keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan terhadap perhitungan MBC dengan pengaruh pemberian suhu dan waktu dapat dilihat pada Lampiran 9. Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA) dari diameter hambat, terlihat bahwa suhu 60°, 70°, 80°, 90° dan 100°C memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap MBC dan juga pemberian waktu pemanasan 5, 10, 15 dan 20 menit memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada besarnya MBC. Interaksi antara pemberian suhu dan waktu pemanasan serta konsentrasi terhadap besarnya nilai MBC memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap hasil MBC. Akibat adanya pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) pada perlakuan, kemudian dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil uji lanjut Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Grafik nilai MBC ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii*.

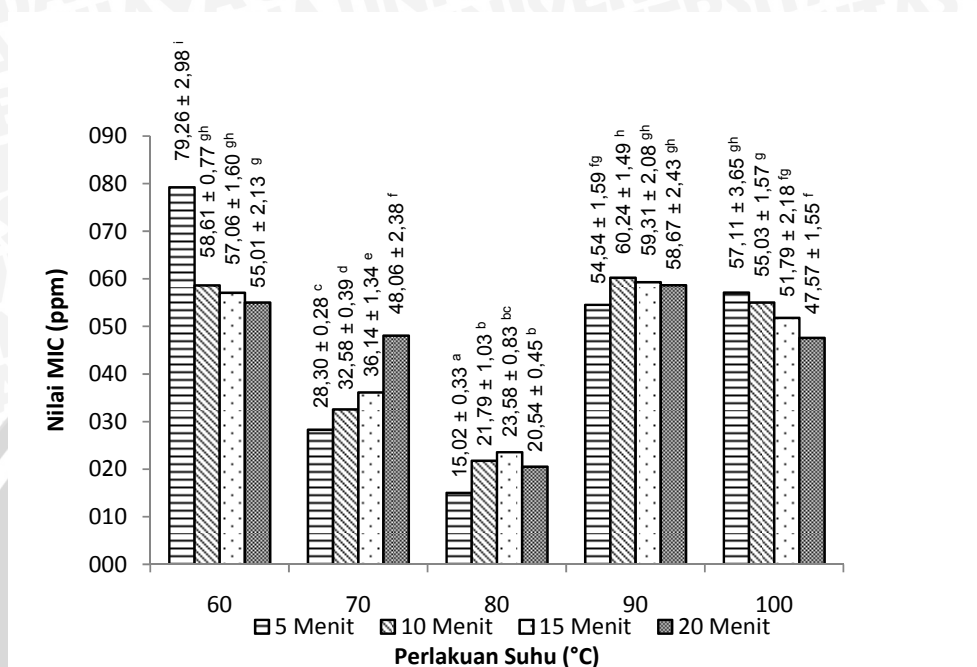
Hasil uji lanjut Duncan menunjukkan bahwa perlakuan dengan notasi sama menyatakan perlakuan tidak berbeda nyata, sedangkan perlakuan dengan notasi berbeda menandakan perlakuan berbeda nyata. Hasil uji Duncan menunjukkan bahwa suhu 60°C pemanasan selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan selama 10 dan 15 menit tidak berbeda nyata. Pada suhu 70°C dengan pemanasan selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan ekstrak selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan ekstrak selama 10 menit dan 15 menit tidak berbeda nyata. Pemberian suhu 80°C dengan pemanasan selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10 menit, 15 menit, dan 20 menit, namun pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit tidak memiliki beda yang nyata. Pemanasan ekstrak *Tetraselmis chuii* dengan suhu 90°C selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan ekstrak selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan

20 menit tidak ada beda nyata. Pemberian suhu sebesar 100°C pada ekstrak *Tetraselmis chuii* selama 5 menit dan 10 menit ada beda nyata, sedangkan pada pemanasan selama 15 menit dan 20 menit tidak ada beda nyata. Berdasarkan grafik di atas, diperoleh nilai MBC tertinggi sebesar $19,82 \pm 0,74$ ppm, sedangkan nilai MBC terendah yang diperoleh sebesar $3,76 \pm 0,43$ ppm. Pemberian suhu tinggi pada ekstrak diduga mampu mengurangi kemampuan senyawa antibakteri dalam menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Parhusip (2005), bahwa aktivitas penghambatan sampel uji cenderung semakin menurun dengan dengan semakin tingginya suhu yang diberikan dan lamanya waktu pemanasan.

4.2.2.2. Uji Stabilitas Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* terhadap nilai MIC (Minimum Inhibitory Concentration)

Penentuan besarnya nilai MIC didapat dari hasil penghitungan nilai MBC dibagi 0,25. Parhusip *et al.*, (2005) menyatakan bahwa, besarnya nilai MIC dan MBC didapat dengan menggambarkan kurva dengan sumbu X (ln konsentrasi ekstrak) dan sumbu Y (diameter penghambatan dikuadratkan) sehingga diperoleh Mt, anti ln dari Mt merupakan nilai MBC dan nilai MIC diperoleh dari nilai MBC dibagi 0,25. Hasil analisis keragaman (ANOVA) dan uji lanjut Duncan terhadap perhitungan MIC dengan pengaruh pemberian suhu dan waktu dapat dilihat pada Lampiran 10. Berdasarkan analisis keragaman (ANOVA) dari diameter hambat, terlihat bahwa suhu 60°, 70°, 80°, 90° dan 100°C memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap besarnya MIC begitu juga dengan pemberian waktu pemanasan 5, 10, 15 dan 20 menit memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) pada besarnya MIC. Interaksi antara pemberian suhu dan waktu pemanasan serta pemberian konsentrasi ekstrak terhadap besarnya nilai MIC memiliki pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap besarnya nilai MIC yang dihasilkan. Akibat adanya pengaruh berbeda nyata

($p < 0,05$) pada perlakuan, kemudian dilakukan uji lanjut Duncan. Hasil uji lanjut Duncan secara ringkas dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 16. Grafik nilai MIC ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* terhadap *Morganella morganii*.

Dari hasil uji lanjut Duncan, tampak bahwa pemberian suhu 60°C dengan waktu pemanasan ekstrak selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan ekstrak selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan ekstrak selama 10 menit dan 15 menit tidak berbeda nyata. Pemanasan ekstrak dengan suhu 70°C dengan waktu pemanasan selama 5 menit berbeda nyata dengan pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit. Dengan pemanasan ekstrak pada suhu 80°C dengan waktu pemanasan 5 menit berbeda nyata dengan waktu pemanasan 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan selama 10 menit dan 20 menit tidak berbeda nyata. Pemberian suhu 90°C dengan waktu pemanasan selama 5 menit ada beda nyata pada pemanasan selama 10 menit, 15 menit dan 20 menit, namun pemanasan pada suhu 15 dan 20 menit tidak ada beda nyata. Dari hasil penentuan MIC tampak bahwa pada suhu 80°C dengan waktu pemanasan selama 5 menit memiliki nilai terkecil, hal

ini diduga karena pada suhu 80°C merupakan suhu efektif dalam menghambat bakteri. Pada suhu 80°C ini juga diduga bahwa ekstrak dapat dijadikan sebagai bakterisidal. Noer dan Nurhayati (2006) menyatakan bahwa nilai MIC terkecil merupakan nilai yang efektif dari ekstrak dalam menghambat bakteri (bakterisidal).

Dari hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak *Tetraselmis chuii* mampu menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*. Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya daya hambat pada media biakan. Selain itu, suhu dan waktu juga memiliki pengaruh yang cukup baik dalam menghambat pertumbuhan *Morganella morganii*. Adanya kandungan senyawa bioaktif yang teridentifikasi melalui uji fitokimia diantaranya yaitu alkaloid, tanin, steroid dan terpenoid. Hasil analisis LC-MS, senyawa dugaan yang diidentifikasi berupa senyawa turunan kumarin dan asam pantotenat. Senyawa-senyawa bioaktif ini diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu dan merusak ikatan hidrofobik dari membran sel bakteri.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

1. Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah, rendemen tertinggi yang dihasilkan dari maserasi bertingkat yaitu pada perlakuan pemberian pelarut etanol dengan lama maserasi selama 24 jam yang menghasilkan rendemen sebesar $6,78 \pm 0,28\%$. Adapun senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang diuji melalui uji fitokimia diantaranya yaitu alkaloid, tanin, steroid dan triterpenoid. Dari uji LC-MS senyawa dugaan yang teranalisis yaitu *7-Hydroxy-4-methylcoumarin* dan *D-Pantothenic acid*.
2. Kesimpulan yang diperoleh dari pengukuran daya hambat bakteri dengan perlakuan maserasi menggunakan pelarut dan waktu berbeda mampu menghambat bakteri *Morganella morganii*, pada penelitian ini besarnya daya hambat yang diperoleh berkisar antara $3,37 \pm 0,19$ mm hingga $10,88 \pm 0,47$ mm. Diameter hambat tertinggi diperoleh pada perlakuan lama maserasi 24 jam dengan pemberian pelarut etanol. Hal ini ditunjukkan dengan zona hambat yang terbentuk sebesar $10,88 \pm 0,47$ mm.
3. Dengan pemberian suhu dan waktu yang berbeda pada ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* dapat ditarik kesimpulan bahwa, suhu dan waktu yang diberikan pada ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* stabil dalam menghambat bakteri *Morganella morganii*. Daya hambat yang diperoleh berkisar antara $11,03 \pm 0,65$ mm hingga $8,25 \pm 0,62$ mm. Nilai MIC dan MBC yang diperoleh yaitu, untuk MBC berkisar antara $3,76 \pm 0,08$ ppm hingga $19,82 \pm 0,76$ ppm dan nilai MIC berkisar antara $15,02 \pm 0,33$ ppm hingga $79,26 \pm 2,98$.

5.2. Saran

Untuk penelitian lebih lanjut disarankan untuk menggunakan senyawa ekstrak *Tetraselmis chuii* yang lebih murni sehingga dapat benar-benar diidentifikasi senyawa antibakteri dan senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam *Tetraselmis chuii* sehingga mampu menghambat pertumbuhan mikroba. Disarankan pula untuk dilakukan penelitian dengan mengaplikasikan ekstrak *Tetraselmis chuii* dalam bahan pangan yang teridentifikasi adanya pertumbuhan *Morganella morganii*.



DAFTAR PUSTAKA

- Adhianata, H. 2012. Produksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Mikroalga *Tetraselmis chuii* dengan Metode *Ultrasound Assisted Extraction* (Kajian Jenis Pelarut dan Jumlah Siklus Ekstraksi). Fakultas Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya Malang. 106 hlm.
- Agustini, N W S dan Kusmiati. 2012. Identifikasi Dan Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Secara Maserasi dan Digesti dalam Berbagai Pelarut dari Mikroalga *Dunaliella salina*. Prosiding Seminar Nasional Biologi. Volume 9 (1): 544 – 551.
- Anggana, M R. 2013. Daya Hambat Ekstrak *Eucheuma spinosum* dengan Konsentrasi Berbeda terhadap *Bacillus cereus*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang. 71 hlm.
- Anggara, A P. 2015. Isolasi, Identifikasi dan Uji Antibakteri Fraksi Metanol Teripang Hitam (*Holothuria atra*) terhadap Bakteri *Vibrio cholerae*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya Malang. 92 hlm.
- Ardiansyah., L Nuraida dan N Andarwulan. 2003. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (*Plucea indica* L.) dan Stabilitas Aktivitasnya pada berbagai Konsentrasi Garam dan pH. Jurnal Teknologi dan Industri Pangan. Volume 14 (2): 90-97.
- Arindah, D. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Golongan Senyawa pada Daging Buah Pepino (*Solanum muricatum Aiton*) yang Berpotensi sebagai Antioksidan. Fakultas Sains dan Teknologi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. 82 hlm.
- Aryadnyani, N P. 2012. Peningkatan Waktu Fermentasi *Kombucha Tea* Meningkatkan Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBL) secara In Vitro. Program Pasca Sarjana. Universitas Udayana. Denpasar. 123 hlm.
- Athukorara Y, Ki-Wan Lee, Se-Kwon K, You_Jin J. 2006. Anticoagulant Activity of Marine Green and Brown Algae Collected from Jeju Island in Korea. Bioresour. Technol. 98 (9): 1711-1716.
- Bernasconi, G. 1995. Teknologi Kimia Jilid 2 Edisi Pertama. PT. Pradaya Paramita. Jakarta. 56 hlm.
- Borowitzka, M A. 1994. Microalgae as Sources of Pharmaceuticals and Other Biologically Active Compounds, Algal Biotechnology Laboratory. Journal of Applied Phycology. Volume 7 (1): 3-15.
- Bowo, E T. Juliantina F R. D A Citra. B Nirwani dan T Nurmasitoh. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) sebagai Agen Antibakterial terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia. Volume 1 (1): 12-20.
- Brooks, G F., J S Butel., L N Ornato., E J Jawetz., J L Metrick dan E A Adelberg. 2005. Mikrobiologi Kedokteran Edisi 20. EGC. Jakarta. 89 hlm.

- Brown, M R., S W Jeffrey., J K Volkman dan G A Dunstan 1997. Nutritional Properties Of Microalgae For Marine Culture. Aquaculture. 151 hlm
- Brown, R G dan T Burns. 2005. Infeksi Jamur: Lecture Notes Dermatologi. Volume 8. Jakarta: Erlangga: 38- 40.
- Brunton, LL. 2006. Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. USA: McGraw Hill. Volume 1: 75-84.
- Cornelia, M. 2005. Peranan Ekstrak Kasar Daun Salam (*Zyzygium polyanthum*, Wight) dalam Menghambat Pertumbuhan Total Mikroba dan *Escherchia coli* pada Daging Ayam Segar. Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan. Volume 3 (2): 35-43.
- Cushnie, T P T dan A J Lamb. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents. Volume 26: 343-356
- Cuthbertson, B J. E E Bullesbach. J Fievet. E Bachere and P S Gross. 2004. A New Class of Antimicrobial Peptides From The Atlantic White Shrimp (*Litopenaeus Setiferus*) Exhibits Target Specificity and an Independent Proline-Richdomain Function. Journal Biochem. Volume 1 (81): 79-86.
- Dahuri, R. 2003. Keanekaragaman Hayati Laut, Aset Pembangunan Berkelanjutan Indonesia. Jakarta. PT. Gramedia Pustaka Utama. 412 hlm.
- Daintith, J. 2004. The Facts on File Dictionary of Organic Chemistry. Facts on File, inc. New York. Volume 1. 247 hlm.
- Dao, V H. P T Lim. P X Ky. Y Takata. S T Teng. T Omura. Y Fukuya dan M Kodama. 2009. Diatom *Pseudo-nitzschia cf. caciathia* (Bacillariophyceae), the Most Likely Source Of Domoic Acid Contamination in the Thorny Oyster *Spandylus versicolor* Schreibers 1793 in Nha Phu Bay, Khanh Hoa Province, Vietnam. Asian Fisheries Science. Volume 27: 16 – 29.
- Darjono, U N A. 2011. Analisis Minyak Atsiri Serai (*Cymbopogon citratus*) sebagai Alternatif Bahan Irigasi Saluran Akar Gigi dengan Menghambat Pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Majalah Sultan Agung. World Class Islamic Cyber University. Sultan Agung Islamic University. 10 hlm.
- Dianursanti. 2012. Pengembangan Sistem Produksi Biomassa *Chlorella vulgaris* dalam Reaktor Plat Datar melalui Optimasi Pencahayaan Menggunakan Teknik Filtrasi pada Aliran Kultur Media. Program Studi Teknik Kimia. Universitas Indonesia. Depok. 186 hlm.
- Fardiaz, S. 1989. Penuntun Praktek Mikrobiologi Pangan. Institut Pertanian Bogor. 142 hlm.
- Fitrial, Y. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai (*Nymphaea pubescens Willd*) Akibat Pemanasan. Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia. Volume 14 (1): 43-48.
- Fogg, L., A P Kay., P A Blackwell. 1975. Algal toxocoty of antibacterial agents used in intensive fish farming. Environ Science Technology. Volume 36: 286 – 294.

- Fulton, M. 1943. The Identity of *Bacterium columbensis* Castellani. University of Windsor. 183 hlm.
- Gandjar, I G dan A Rohman. 2008. Kimia Farmasi Analisis. Pustaka Pelajar. Yogyakarta. 490 hlm.
- Ganiswara, I. 1995. Farmakologi dan Terapi, Edisi 4. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 53 hlm.
- Glynn, A A. 1972. In Microbial Patogenicity in Man and Animals. Cambridge University Press. 93 hlm.
- Guenther, E. 1987. Minyak Atsiri I. Jakarta. Universitas Indonesia Press. 55 hlm.
- Haliza, W. Endang Y dan Thahir R. 2007. Pemanfaatan Kacang-Kacangan sebagai Substitusi Bahan Baku Tahu dan Tempe. Buletin Teknologi Pascapanen Pertanian. Volume 3 (1): 1-8
- Harborne, J B. 2006. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. ITB. Bandung. 63 hlm.
- Haryati, S. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder pada Fraksi Heksan dari Batang Tanaman *Etlingera sp.* dan Uji Aktivitasnya sebagai Antibakteri dan Antifungi. Program Studi Kimia, FMIPA. Universitas Haluoleo. Kendari. 76 hlm.
- Heat H B dan G Reineccius. 1996. Flavor Chemistry and Technology. CBS Publisher and Distributors. USA. 442 hlm.
- Hill, M G. 2003. Dictionary of Chemistry Second Edition. McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America. 431 hlm.
- Ibrahim, K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Antibakteri Senyawa Triterpenoid dari Ekstrak N-Heksan Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis L.*). Journal of Chemistry Info. Volume 1 (1): 156-164.
- Indhira TA. 2004. Prospek Bioteknologi Sumberdaya Akuatik dalam Industri Farmasi. Jurnal Perikanan Fakultas Teknologi Kelautan dan Perikanan Universitas Hang Tuah Surabaya. Volume 1 (1): 27-30.
- Isnansetyo, A. dan Kurniastuty. 1995. Teknik Kultur Phytoplankton Zooplankton : Pakan Alami untuk Pembenihan Organisme Laut. Kanisius. Yogyakarta. 74 hlm.
- Isolauri, E. Y sutas. P Kakaanpaa. H Arvilommi. dan S Salminen. 2001. Probiotocs: Effect of Immunity. J. Clinical Nutrition. Volume 73 (2): 444-450.
- Jaryatin. 2009. Efektivitas Antibakterial Asap Cair Tempurung Kelapa Terhadap Pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Morganella morganii* Dengan Metode Sumur (*Well Diffusion*) dan Metode Pengenceran Tabung (*Tube Dillution*). Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. 97 hlm.

- Kakazhu, Y. H Horai. Y Ohashi. A Hirayama. T Ishikawa. S Nakamura, K Shimizu dan Y Ueno. 2008. Depiction of Metabolome Changes in Histidine-starved *Escherichia coli* by CE-TOFMS. *Molecular Biosystem*. Volume 2 (4): 135-147.
- Kalemba, D dan A Kunicka. 2003. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils from Aromatic and Madical Plants Againts Growth of Phytopatogenis Bacteria. A Institute Of General Chemistry. Technical University Of Lodz. Poland. Volume 6: 54-66.
- Kang, J. 2012. Principles and Aplication of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. *Tandem Mass Spectrometry-Aplication and Principles*. In Tech. Sanghai. China. 794 hlm.
- Kazakevich, Y dan R Lubrutto. 2007. *HPLC For Pharmaceutical Scientists*. Wiley. New Jersey. 9 hlm.
- Komara 1991. Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsium frutesces*). IPB. Bogor. 82 hlm.
- Kristanti, A N., N S Aminah, M Tanjung dan B Kurniadi. 2008. Buku Ajar Fitokimia. FMIPA Universitas Airlangga. Surabaya. 63 hlm.
- Kumalasari, A R. 2011. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* dengan Metode Ekstraksi dan Jenis Pelarut yang Berbeda. Skripsi. Universitas Brawijaya Malang. 71 hlm.
- Kusmarwati, A dan N Indriati. 2008. Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium edule Reinw.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Volume 3 (1): 29-35.
- Kusmiyati dan N W R Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Jurnal Biodiversitas* 8 (1): 48-53.
- Kusuma, D A. 2012. Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Antimikroba pada Mikroalga *Tetraselmis chuii* menggunakan Metode *Microwave Assisted Extraction* (Kajian Jenis Pelarut dan Lama Ekstraksi). Skripsi. Fakultas Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya Malang. 80 hlm.
- Lenny, S. 2006. Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida dan Alkaloida. Departemen Kimia. FMIPA. Universitas Sumatera Utara. Medan. 25 hlm.
- Lide, D R. 2005. *Physical Constants of Organic Compounds in CRC Handbook of Chemistry and Physics*. CRC press. 43 hlm.
- Lorimer, L T. 1995. *Encyclopedia of Knowledge*. Grolier Inc. USA. 93 hlm.
- Mahanani, S R. D Praharani dan Purwanto. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Pare (*Mommordica charantia*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus viridans*. Artikel Ilmiah. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember. Jember. 7 hlm.

- Makridis P., R A Costa dan M T Dinis. 2006. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima* and effect on bacterial load of enriched *artemia metanauplii*. *Journal Aquaculture*. Volume **255**: 76 – 81.
- Maligan, J M., H Adhianata dan E Zubaedah. 2014. Production and Identification of Antimicrobial Compounds from Marine Microalgae *Tetraselmis chuii* Using Ultrasound Assisted Extraction Method. *International Conference of Food Engineering and Biotechnology*. Volume **7** (1): 1 – 5.
- Martono, L Y. 2014. Pengaruh Penambahan Ekstrak *Gracilaria* sp. terhadap Pertumbuhan Bakteri Pembentuk Histamin pada Ikan Kembung. *Teknologi Hasil Pertanian*. Fakultas Pertanian. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta. 45 hlm.
- Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. *Jurnal Mikologi Kedokteran Indonesia*. Volume **7** (12): 12-24.
- Maulida, D dan Z Naufal. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran n-heksan, Aseton, dan Etanol. *Fakultas Teknik*. Universitas Diponegoro. Semarang. 83 hlm.
- Metting B dan J W Pyne. 1986. Biologically Active Compound from Microalgae. *Enzyme and Microbial Technology* **8** (7): 386-394.
- Miranda, G., A Amri dan S P Utami. 2014. Hidrolisis Mikroalga *Tetraselmis chuii* dengan Variasi Konsentrasi Asam Sulfat dan Temperatur. *JOM FTeknik*. Volume **1** (2): 1-5.
- Mudjiman, A. 2004. Makanan Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 189 hlm.
- Munasir, Z. 2010. Respon Imun terhadap Infeksi Bakteri. *Sari Pediatri*. Volume **2** (4): 193-197.
- Nagarajan, Arun, Arivalagan, Udhaya, Rajaguru P. 2011. In Vitro Root Induction and Studies on Antibacterial Activity of Root Extract of *Costus Igneus* on Clinically Important Human Pathogens. *Jurnal Microbiol. Biotech*. **1** (4): 46-76.
- Nagele, E. 2006. Analysis of a Complex Natural Product Extract from Ginseng, Part III: Species Differentiation of Ginseng Plants and Authentication of Ginseng Products by LC/MS. *Agilent Technologies*. 7 hlm.
- Nikham dan T E Basjir. 2012. Uji Bahan Baku Antibakteri dari Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl.) Hasil Iridiasi Gamma dan Antibiotik terhadap Bakteri Patogen. *Prosiding Pertemuan Ilmiah Ilmu Pengetahuan dan Teknologi Bahan*. ISSN 1441-2213: 168-174.
- Ningrum, A O. 2011. Proses Pembuatan Biooil dari Limbah Kelapa Sawit (Tandan, Cangkang, dan Serat) untuk Bahan Bakar Alternatif dengan Metode *Fast Pyrolysis*. Program Studi Teknik Kimia, Fakultas Teknik Universitas Indonesia, Depok. 79 hlm.

- Noer, I S dan L Nurhayati. 2006. Bioaktivitas *Ulva reticulata* Forsskal. Asal Gili Kondo Lombok Timur terhadap Bakteri. Jurnal Biotika. Volume 5 (1): 45-60.
- Nugroho, E dan T Rahayu. 2003. Pengolahan Propolis sebagai Bahan Pangan Fungsional Antimikroba untuk Kesehatan Masyarakat. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. 8 hlm.
- Nuri, M C. A Faizatul dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. Mediagro. Volume 5 (2): 26-37.
- Nychas, G., dan E C Tassou. 1995. Inhibition of *Salmonella enteritidis* and *Staphylococcus aureus* in Nutrient Broth by Mint Essential Oil. National Agricultural Research Foundation. Institute Technology of Agricultural Product. Volume 3: 16 – 25.
- Ortuno, C., P Irianda., I Paniagua., J Bon., E Corona dan J Benedito. 2010. Effect of Supercritical Extraction Time on the Antimicrobial Activity of Thyme (*Thymus zygiz*) Extract. International Conference on Food Innovation. Volume 6: 28-39.
- Pandiangan, M. 2009. Stabilitas Antimikrobia Ekstrak Temulawak (*Curcuma xanthoriza* Roxb) Terhadap Mikroba Patogen. Medika Unika 4 (73): 365-373.
- Parhusip, A J N. 2006 Kajian Mekanisme Antibakteri Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) terhadap Bakteri Patogen. Program Studi Ilmu Pangan Sekolah Pasca Sarjana. IPB. Bogor. 177 hlm.
- Parhusip, A J N., E Friska dan R D Saputra. 2010. Potensi Aktivitas Antimikroba Ekstrak Putri Malu (*Mimosa pudica* L.) terhadap Mikroba Patogen Pangan. Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan. Volume 8 (1): 45-54.
- Parubak, A S. 2013. Senyawa Flavonoid yang Bersifat Antibakteri dari Akway (*Drimys becariana*. Gibbs). Chemistry Program. Volume 6 (1): 34-37.
- Pelczar, M J dan E C S Chan. 1988. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid 2. Jakarta. UI Press. 88 hlm.
- Polapa, F S. 2015. Potensi Antibakteri dari Ekstrak Kasar Bakteri Asosiasi Karang Batu yang Terinfeksi Penyakit *Brown Band* (BrB) terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Jurusan Ilmu Kelautan. Universitas Hasanuddin. Makassar. 50 hlm.
- Prameswari, O dan B Simon. 2014. Uji Efek Ekstrak Daun Pandan Wangi terhadap Penurunan Kadar Glukosa Darah dan Histopatologi Tikus Diabetes Melitus. Jurnal Pangan dan Agroindustri. Volume 2 (2): 16-27.
- Prasetyo, S S., H Sunjaya dan Y N Yanuar. 2012. Pengaruh Rasio Massa Daun Suji atau Pelarut, Temperatur dan Jenis Pelarut pada Ekstraksi Klorofil Daun Suji secara Batch dengan Pengkontakan Dispersi. Lembaga Penelitian dan Pengabdian Masyarakat. Universitas Katolik Prahayangan. 63 hlm.

- Pratiwi, D A N. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pacar Kuku (*Lawsonia inermis* L.) dan Bioautografi terhadap *Bacillus subtilis* dan *Shigella sonnei*. Naskah Publikasi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. 16 hlm.
- Prihanto, A A., M Firdaus dan R Nurdiani. 2011. Penapisan Fitokimia dan Antibakteri Ekstrak Metanol Mangrove (*Excoecaria agallocha*) dari Muara Sungai Porong. Journal Of Biological Research. Volume **17** (1): 69-72.
- Pujiono, A E. 2013. Pertumbuhan *Tetraselmis chuii* pada Medium Air Laut dengan Intensitas Cahaya, Lama Penyinaran dan Jumlah Inokulan Yang Berbeda pada Skala Laboratorium. Jurusan Biologi, Fakultas MIPA. Universitas Jember. 57 hlm.
- Reapina, E M. 2007. Kajian Kativitas Antimikroba Ekstrak Kulit Kayu Mesoyi (*Cryptocaria massoja*) terhadap Bakteri Patogen dan Pembusuk Pangan. Fakultas Teknologi Pertanian. Institut Pertanian Bogor. 78 hlm.
- Rinawati, N D. 2011. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujute* L.) terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS). 12 hlm.
- Riyanto, E I. I Widowati dan A Sabdono. 2013. Skrining Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak *Sargassum polycystum* terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* dan *micrococcus luteus* di Pulau Panjang Jepara. Journal Of Marine Research. Volume **1** (1): 115-121.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi Edisi Ke-6. Terjemahan Padmawinata, K. Penerbit ITB. Bandung. 202 hlm.
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada Skala Laboratorium. Karya Ilmiah. Universitas Padjadjaran Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Jatinangor. 87 hlm.
- Saksony, A K. 2011. Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* dengan Metode Ekstraksi dan Jenis Pelarut yang Berbeda. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. 97 hlm.
- Salisbury, F B dan C W Ross. 1995. Fisiologi Tumbuhan. Jilid 3. ITB. Bandung. 335 hlm.
- Sani, R N. 2013. Skrining Fitokimia dan Uji Toksisitas (LD₅₀) Ekstrak Mikroalga (*Tetraselmis chuii*) terhadap Hati Tikus Wistar secara In Vivo. Fakultas Teknologi Pertanian. Universitas Brawijaya. Malang. 73 hlm.
- Santoso, S H. 2014. Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Batang Kayu Secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebagai Antimikroba terhadap Bakteri *Klebsiella pneumonia* secara In Vitro. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang. 69 hlm.
- Sjahid. 2008. Jenis-jenis Rumput Laut yang Berpotensi sebagai Obat yang Tumbuh pada berbagai Substrat di Pantai Ranababakan Nusa Kambangan, Cilacap. 76 hlm.

- Spigno, G dan D M DeFaveri. 2007. Effect of Extraction Time, Temperature and Solvent on Concentration and Antioxidant Activity of Grape Marc Phenolics. *Journal of Food Engineering* **81**: 200- 208.
- Sri, M. F A Yudistira dan P Trisunuwati. 2005. Potensi Atimikroba Ekstrak Air Daun Kelor (*Moringa oelfera*) terhadap *Salmonella enteritidis* (SP-1-PKH) secara In Vitro. Program Studi Pendidikan Kedokteran Hewan. Program Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya. Malang. 7 hlm.
- Studiawan, H. 2009. Petunjuk Praktikum Fitokimia. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga. Surabaya. 27 hlm.
- Sudarmadji, S., B Haryono dan Suhardi. 2007. Prosedur Analisa untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Liberty. Yogyakarta. 43 hlm.
- Sugiasuti S. 2002. Kajian Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle L*) pada Daging Sapi Giling. Program Pasca Sarjana. IPB. Bogor. 80 hlm.
- Suharto, M A P. H J Edy, J M Dumanauw. 2012. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisica* var. *sapientum L.*). FMIPA. Unsrat. Manado: 86-92.
- Sukardi. 2011. Metodologi Penelitian Pendidikan Kompetensi dan Praktiknya. Jakarta: PT Bumi Aksara. 180 hlm.
- Sulastri, S. 2011. Karakterisasi, Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Daru Dua Varietas Sirih (*Piper betle L.*) terhadap *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi. Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara. Medan. 86 hlm.
- Sulastrianah, Imran dan E S Fitria. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) dan Daun Sirih (*Piper betle L.*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. Fakultas Kedokteran. Universitas Haluoleo. Kendari. Sulawesi Utara. 9 hlm.
- Supardi, N 2007. Pengembangan Model Pengawet Alami dari Ekstrak Lengkuas (*Languas galanga*), Kunyit (*Curcuma domestica*) dan Jahe (*Zingiber officinale*) sebagai Pengganti Formalin pada Daging Segar. Seminar Nasional IX. Pendidikan Biologi FKIP UNS. Surakarta: 629-634.
- Suryaningrum, E R. 2011. Efek Antifungi Perasan Kulit Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Pertumbuhan *Tricholyton mentagrophytes* secara In Vivo. FK. UNS. Surakarta. 78 hlm.
- Suryati., T Wikanta dan N Indriati. 2003. Kandungan Histamin pada Beberapa Produk Hasil Perikanan. Pusat Riset Pengolahan Produk dan Sosial Ekonomi. Kelautan dan Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. Jakarta. 23 hlm.
- Susiana. 2014. Isolasi dan Identifikasi klorofil a dengan *Liquid Chromatography Mass Spectroscopy* (LC-MS) pada Alga Coklat (*Sargassum filipendula*). Skripsi. FPIK. Universitas Brawijaya. 79 hlm.

- Uju dan Wahyuni M. 2007. Pengembangan Marine Biodiesel dari Mikroalga sebagai Sumber Energi Alternatif Potensial Masa Depan. 21 hlm.
- Voight, R. 1994. Buku pelajaran Teknologi Farmasi Edisi ke-5. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 68 hlm.
- Wahyuni, E. 2010. Pembuatan Film Layak Makan Protein whey: Kajian Rasio dan Gliserol terhadap Sifat Fisika dan Kimia. Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak. Volume 2: 45-56.
- Waliyansyah, R. 2014. Pengaruh Perbedaan Pemberian KNO_3 terhadap Kandungan Lipid Mikroalga Laut *Tetraselmis chuii* dalam Pembuatan Bahan Baku Biodiesel. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya, Malang. 55 hlm.
- Wardakhan, M D dan H D Nadia. 2007. Skrining Aktivitas Antibakteri beberapa Biota Laut dari Perairan Pantai Painan. Fakultas Farmasi. Universitas Andalas. Padang. 67 hlm.
- Weldy, C S dan M Huesemann. 2007. Lipid production by *Dunaliella salina* in Batch Culture: Effects of Nitrogen Limitation and Light Intensity. Department of Energy Journal of Undergraduate Research. Volume 7 (1): 115-22.
- Wenno, M R., N Purbosari dan J L Thenu. 2010. Ekstraksi Senyawa Antibakteri dari *Chlorella Sp.*. Jurnal Penelitian Pertanian Terapan. Volume 10 (2): 131-137.
- Wibowo, A E. 2010. Aktivitas Sitotoksik Ekstrak Etanol Daun *Aglaia Elliptica* Blume terhadap Galur Sel Kanker Serviks (HeLa). Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia. Volume 8 (1): 19-23
- Widayanti, V T. 2012. Produksi Identifikasi Senyawa Antimikroba dari Mikroalga (*Tetraselmis chuii*) dengan Metode Ekstraksi Maserasi (Kajian Jenis Pelarut dan Waktu Ekstraksi). Fakultas Teknologi Hasil Pertanian. Universitas Brawijaya Malang. 101 hlm.
- Widiana, R. 2010. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis* L) pada *Escherichia coli* dan Salmonella sp. STKIP PGRI Padang. Sumatra Barat. 12 hlm.
- Widjaja, A. 2009. Lipid Production From Microalgae As A Promising Candidate For Biodiesel Production. Makara Teknologi. Volume 13 (1): 47-51.
- Widodo, N. 2007. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Fitokimia yang terkandung dalam Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). Jurusan Kimia FMIPA. Universitas Negeri Semarang. Semarang. 72 hlm.
- Wijaksono, B. 2008. Komposisi Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) *Chaetoceros Gracilis* yang Dikultivasi pada Suhu Berbeda. Program Studi Teknologi Hasil Perikanan. FPIK. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 64 hlm.

Yasita, D dan I D Rachmawati. 2013. Optimasi Proses Ekstraksi pada Pembuatan Karaginan dari Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) untuk Mencapai *Food Grade*. Makalah Penelitian. Fakultas Teknik Universitas Diponegoro. Semarang. 46 hlm.

Yudha, A P. 2008. Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Dunaliella sp.* pada Umur Panen yang Berbeda. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor. 77 hlm.

Yudiati, E., S Sedjati dan Agustian R. 2011. Aktivitas Antioksidan dan Toksisitas Ekstrak Metanol Pigmen Kasar *Spirulina sp.* Ilmu Kelautan. Volume **16** (4): 187 – 192.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA





LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Rendemen Ekstrak Kasar Tetraselmis chuii

Berat sampel serbuk kering = 50 gram

Berat akhir sampel = 7,74 gram

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{berat akhir}}{\text{berat awal}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{7,74 \text{ gram}}{50 \text{ gram}} \times 100 \%$$

$$\% \text{ Rendemen} = 15,48 \%$$



Lampiran 2. Data Rendemen Ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii*

Perlakuan		Rendemen (ulangan)			Total	Rata-rata	Std.Dev
Pelarut (A)	Waktu (B)	U1	U2	U3			
Heksan	B1	1,30	1,34	1,26	3,90	1,30	0,0400
	B2	0,84	0,86	0,90	2,60	0,87	0,0306
	B3	0,86	0,80	0,82	2,48	0,83	0,0306
Etil asetat	B1	2,70	2,77	2,58	8,05	2,68	0,0926
	B2	2,34	2,38	2,56	7,28	2,43	0,1140
	B3	2,39	2,57	2,37	7,32	2,44	0,1090
Etanol	B1	6,48	7,03	6,82	20,33	6,78	0,2796
	B2	5,20	5,56	5,52	16,28	5,43	0,1953
	B3	5,22	5,43	5,57	16,22	5,41	0,1730
Total		27,33	28,74	28,39	84,45	-	-

- Analysis of Variance (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	sig
Ulangan	2	0,12	0,06				
Perlakuan	8	116,09	14,51	2,972	0,41	0,59	**
Pelarut	2	111,86	55,93	3,55	0,559	0,794	**
Waktu	2	2,83	1,42	1,96	0,559	0,794	**
PW	4	1,40	0,35	1,35	0,48	0,68	**
Galat	16	0,25	0,02	-	-	-	-
Total	26	116,46	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, rendemen dengan perlakuan waktu dan pelarut berbeda diketahui bahwa interaksi ekstrak dengan pelarut dan waktu memiliki pengaruh berbeda nyata. Dari interaksi pelarut dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$S_x 5\% = \sqrt{\frac{KT_{Galat}}{\text{ulangan}}} = \sqrt{\frac{0,02}{3}} = 0,071$$

Perlakuan		Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
pelarut	waktu				
Heksan	1 hari	0,83		-	a
	2 hari	0,87	0,215	3	a
	3 hari	1,30	0,226	3,15	ab
Etil asetat	1 hari	2,43	0,232	3,23	b
	2 hari	2,44	0,237	3,3	b
	3 hari	2,68	0,240	3,34	bc
Etanol	3 hari	5,41	0,242	3,37	c
	2 hari	5,43	0,243	3,39	c
	1 hari	6,78	0,244	3,41	d

Lampiran 3. Prosedur Pembuatan Konsentrasi

- Konsentrasi 1000 ppm

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ = \frac{10 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

Jadi, sebanyak 10 mg ekstrak sampel uji dilarutkan dalam 10 ml pelarut uji

- Konsentrasi 3000 ppm

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{3000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ = \frac{30 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

Jadi, sebanyak 30 mg ekstrak sampel uji dilarutkan dalam 10 ml pelarut uji

- Konsentrasi 2000 ppm

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{2000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ = \frac{20 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

Jadi, sebanyak 20 mg ekstrak sampel uji dilarutkan dalam 10 ml pelarut uji

- Konsentrasi 4000 ppm

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{4000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ = \frac{40 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

Jadi, sebanyak 40 mg ekstrak sampel uji dilarutkan dalam 10 ml pelarut uji

- Konsentrasi 5000 ppm

$$1 \text{ ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$1000 \text{ ppm} = \frac{5000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}} \\ = \frac{50 \text{ mg}}{10 \text{ ml}}$$

Jadi, sebanyak 50 mg ekstrak sampel uji dilarutkan dalam 10 ml pelarut uji

Lampiran 4. Analisis Keragaman (ANOVA) Penelitian Tahap Satu

- Data Hasil Diameter Daya Hambat

Pelarut	Hari	Daya Hambat			Total	Rata-rata	Std.Dev
		U1	U2	U3			
Heksan	1 hari	3,50	3,15	3,45	10,10	3,37	0,19
	2 hari	3,30	3,20	4,05	10,55	3,52	0,46
	3 hari	3,75	4,00	3,40	11,15	3,72	0,30
Etil Asetat	1 hari	5,25	5,40	6,20	16,85	5,62	0,51
	2 hari	7,30	7,05	7,15	21,50	7,17	0,13
	3 hari	7,80	7,25	7,00	22,05	7,35	0,41
Etanol	1 hari	10,35	11,25	11,05	32,65	10,88	0,47
	2 hari	10,50	10,50	11,20	32,20	10,73	0,40
	3 hari	10,25	10,35	10,05	30,65	10,22	0,15
Total		62,00	62,15	63,55	187,70	-	-

- Analysis of Variance (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	Sig
Ulangan	2	0,16	0,08		3,24	5,29	
Perlakuan	8	232,57	29,07	208,50	2,59	3,89	**
Pelarut	2	226,21	113,10	811,18	3,63	6,23	**
Waktu	2	1,48	0,74	5,29	3,63	6,23	**
PW	4	7,28	1,82	13,05	3,01	4,77	**
Galat	16	2,23	0,14	-	-	-	-
Total	26	234,96	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, daya hambatan (waktu dan pelarut) diketahui bahwa interaksi ekstrak dengan pelarut dan waktu memiliki pengaruh beda nyata. Dari interaksi pelarut dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

Lanjutan Lampiran 4

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD\ 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{0,14}{3}} = 0,216$$

Perlakuan		Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
Pelarut	Waktu				
Heksan	1 hari	3,37			a
	2 hari	3,52	0,64676	3	a
	3 hari	3,72	0,679098	3,15	a
Etil asetat	1 hari	5,62	0,696345	3,23	b
	2 hari	7,17	0,711436	3,3	c
	3 hari	7,35	0,72006	3,34	c
Etanol	3 hari	10,22	0,726527	3,37	d
	2 hari	10,73	0,730839	3,39	d
	1 hari	10,88	0,735151	3,41	d



Lampiran 5. Penentuan Nilai Mt

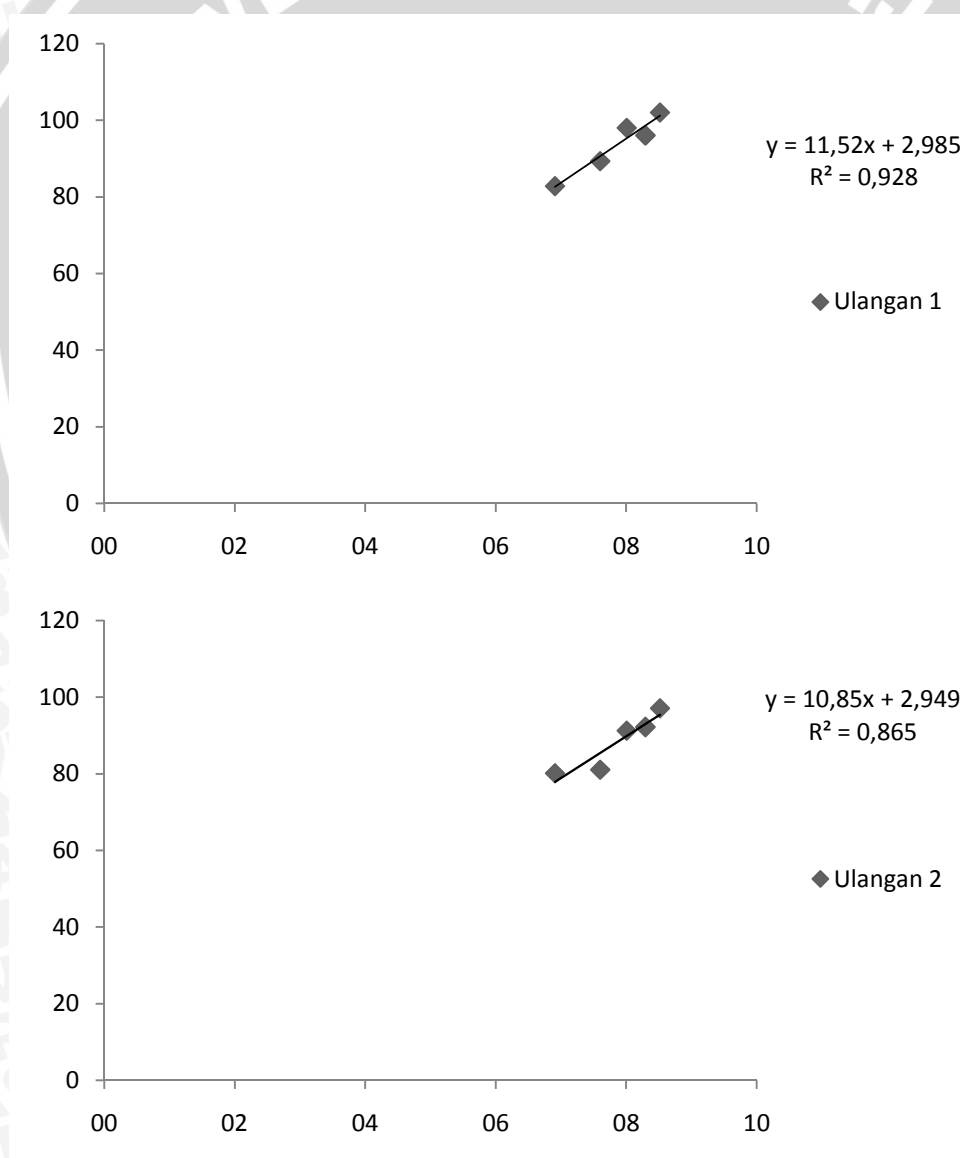
Konsentrasi (ppm)	Zona Hambat			Nilai X	Nilai Y		
	U1	U2	U3		U1	U2	U3
1000	9,10	8,95	9,05	6,908	82,810	80,102	81,902
2000	9,45	9,00	9,10	7,601	89,302	81,000	82,810
3000	9,90	9,55	9,55	8,006	98,010	91,202	91,202
4000	9,80	9,60	9,75	8,294	96,040	92,160	95,062
5000	10,10	9,85	9,95	8,517	102,010	97,022	99,002
Nilai MBC (ppm)	19,79	19,09	20,57	-	-	-	-
Nilai MIC (ppm)	79,14	76,34	82,29	-	-	-	-

Ket: Nilai X (ln konsentrasi)

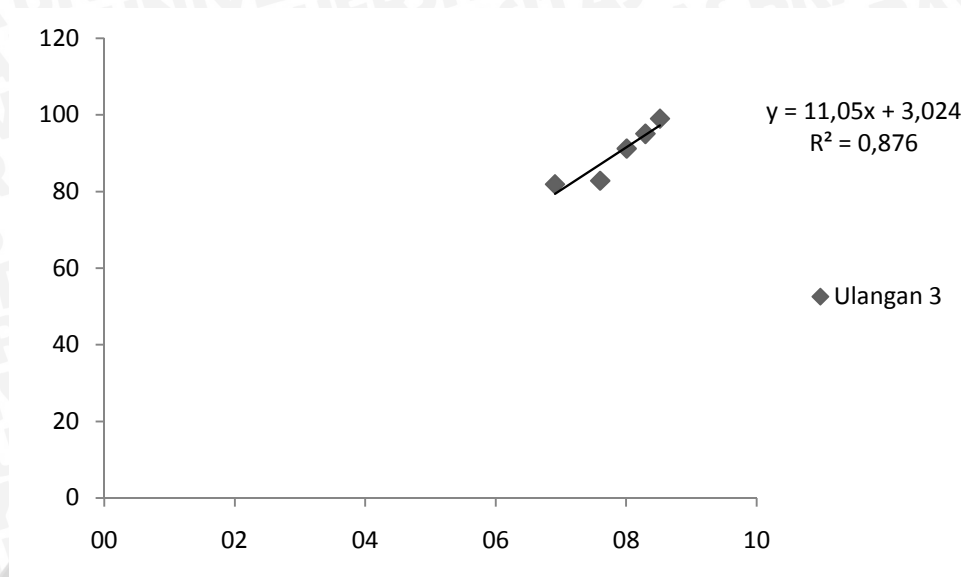
Nilai Y (kuadrat zona hambat)

Nilai MBC (anti ln dari perpotongan Y)

Nilai MIC (nilai MBC ÷ 0,25)



Lanjutan Lampiran 5. Penentuan nilai Mt



Lampiran 6. Analisis Keragaman nilai MBC

- Data Hasil Perhitungan MBC

Pelarut	Hari	Daya Hambat			Total	Rata-rata	Std.Dev
		U1	U2	U3			
Heksan	1 hari	9,34	9,67	9,28	28,29	9,43	0,209
	2 hari	9,20	9,27	8,71	27,18	9,06	0,308
	3 hari	11,79	11,39	12,48	35,66	11,89	0,549
Etil Asetat	1 hari	9,97	9,51	9,53	29,01	9,67	0,265
	2 hari	12,91	13,00	12,87	38,78	12,93	0,066
	3 hari	7,60	7,73	7,98	23,31	7,77	0,194
Etanol	1 hari	3,26	3,04	3,09	9,40	3,13	0,113
	2 hari	4,38	4,71	4,61	13,70	4,57	0,168
	3 hari	3,56	3,60	3,74	10,90	3,63	0,096
Total		72,00	71,91	72,29	216,20	-	-

- Analisis Keragaman (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	Sig
ulangan	2	0,0085	0,0042	2,699	0,413	0,590	
perlakuan	8	299,80	37,47	3,208	0,560	0,794	**
Pelarut	2	241,62	120,81	1,831	0,560	0,794	**
Waktu	2	10,15	5,07	2,205	0,479	0,679	**
PW	4	48,03	12,01	2,699	0,413	0,590	**
Galat	16	1,199	0,075	-	-	-	-
Total	26	301,01	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, nilai MBC (waktu dan pelarut) diketahui bahwa interaksi ekstrak dengan pemberian pelarut dan waktu berbeda memiliki pengaruh beda nyata. Dari interaksi pelarut dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{0,075}{3}} = 0,158$$

Perlakuan	Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
A3B1	3,13	-	-	a
A3B3	3,63	0,474	3	a
A3B2	4,57	0,498	3,15	ab
A2B3	7,77	0,510	3,23	b
A1B2	9,06	0,521	3,3	b
A1B1	9,43	0,527	3,34	c
A2B1	9,67	0,532	3,37	cd
A1B3	11,89	0,535	3,39	d
A2B2	12,93	0,538	3,41	e

Lampiran 7. Analisis Keragaman nilai MIC

- Data Hasil Perhitungan MIC

Pelarut	Hari	Daya Hambat			Total	Rata-rata	Std.Dev
		U1	U2	U3			
N-Heksan	1 hari	37,35	38,68	37,12	113,15	37,72	0,84
	2 hari	36,79	37,09	34,82	108,70	36,23	1,23
	3 hari	47,15	45,57	49,91	142,63	47,54	2,20
Etil Asetat	1 hari	39,90	38,02	38,10	116,02	38,67	1,06
	2 hari	51,64	52,00	51,48	155,12	51,71	0,27
	3 hari	30,39	30,92	31,92	93,23	31,08	0,78
Etanol	1 hari	13,04	12,17	12,37	37,58	12,53	0,46
	2 hari	17,52	18,82	18,45	54,79	18,26	0,67
	3 hari	14,24	14,39	14,97	43,60	14,53	0,39
Total		288,01	287,66	289,15	864,82	-	-

- Analisis Keragaman (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	Sig
Ulangan	2	0,14	0,07	-	-	-	-
perlakuan	8	4796,80	599,60	500,20	2,59	3,89	**
Pelarut	2	3866,00	1933,00	1612,55	3,63	6,23	**
Waktu	2	162,39	81,19	67,73	3,63	6,23	**
PW	4	768,41	192,10	160,26	3,01	4,77	**
Galat	16	19,18	1,20	-	-	-	-
Total	26	4816,11	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, nilai MIC (waktu dan pelarut) diketahui bahwa interaksi ekstrak dengan pelarut dan waktu berbeda memiliki pengaruh yang berbeda nyata. Dari interaksi pelarut dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{1,20}{3}} = 0,63$$

Perlakuan	Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
A3B1	12,53	-	-	a
A3B3	14,53	1,90	3,00	ab
A3B2	18,26	1,99	3,15	b
A2B3	31,08	2,04	3,23	c
A1B2	36,23	2,09	3,30	d
A1B1	37,72	2,11	3,34	d
A2B1	38,67	2,13	3,37	de
A1B3	47,54	2,14	3,39	e
A2B2	51,71	2,16	3,41	f

Lampiran 8. Pengujian Stabilitas Ekstrak dengan Pemberian Suhu dan Waktu

- Data hasil pengujian daya hambat untuk uji stabilitas

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	Std.Dev
	1	2	3			
C1D1	10,05	9,25	9,30	28,60	9,53	0,448
C1D2	9,65	9,75	8,80	28,20	9,40	0,522
C1D3	8,25	8,90	9,00	26,15	8,72	0,407
C1D4	7,85	8,00	9,35	25,20	8,40	0,826
C2D1	10,55	9,60	10,85	31,00	10,33	0,653
C2D2	10,00	9,85	8,90	28,75	9,58	0,597
C2D3	9,75	9,85	8,60	28,20	9,40	0,695
C2D4	8,35	9,20	9,45	27,00	9,00	0,577
C3D1	10,35	11,10	11,65	33,10	11,03	0,653
C3D2	9,75	10,60	10,50	30,85	10,28	0,465
C3D3	10,15	9,35	8,80	28,30	9,43	0,679
C3D4	8,85	10,10	9,85	28,80	9,60	0,661
C4D1	10,30	10,25	9,50	30,05	10,02	0,448
C4D2	9,05	10,35	9,20	28,60	9,53	0,711
C4D3	9,15	9,05	9,00	27,20	9,07	0,076
C4D4	9,00	8,10	9,05	26,15	8,72	0,535
C5D1	9,95	8,80	9,70	28,45	9,48	0,605
C5D2	8,50	9,35	8,65	26,50	8,83	0,454
C5D3	8,20	8,55	9,15	25,90	8,63	0,480
C5D4	7,75	8,05	8,95	24,75	8,25	0,624
TOTAL	185,45	188,05	188,25	561,75	-	-

Ket: Simbol huruf C menyatakan perlakuan suhu (60, 70, 80, 90 dan 100°C)

Simbol huruf D menyatakan perlakuan waktu pemanasan (5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit)

- Analisa Keragaman (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	sig
Ulangan	2	0,24	0,12				
Perlakuan	19	27,67	1,46	4,24	1,85	2,40	**
Suhu	4	12,15	3,04	8,84	2,62	3,86	**
Waktu	3	14,45	4,82	14,02	2,85	4,34	**
SW	7	1,08	0,15	0,45	2,26	3,15	-
Galat	38	13,05	0,34	-	-	-	-
Total	59	40,97	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, uji stabilitas (waktu dan suhu) diketahui bahwa interaksi suhu dan waktu berbeda nyata. Dari interaksi suhu dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

Lanjutan Lampiran 8

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD\ 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{0,34}{3}} = 0,33$$

Karena yang akan dibandingkan ada 20 perlakuan maka banyaknya UJD adalah $(20 - 2 = 18)$

Perlakuan	Rata-rata	UJD 0,05	Notasi
C5D4	8,25		a
C1D4	8,40	0,968	a
C5D3	8,63	1,019	a
C1D3	8,72	1,049	ab
C4D4	8,72	1,073	ab
C5D2	8,83	1,090	ab
C2D4	9,00	1,107	ab
C4D3	9,07	1,117	b
C2D3	9,40	1,127	c
C1D2	9,40	1,134	c
C3D3	9,43		cd
C5D1	9,48	1,147	cd
C1D1	9,53		cd
C4D2	9,53	1,157	cd
C2D2	9,58		cd
C3D4	9,60	1,164	cd
C4D1	10,02		d
C3D2	10,28	1,171	e
C2D1	10,33		ef
C3D1	11,03	1,174	f

Lampiran 9. Nilai MBC Uji Stabilitas Ekstrak dengan Pemberian Suhu dan Waktu

- Data Hasil Perhitungan Mt untuk penentuan MBC

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata	Std.Dev
	1	2	3			
C1D1	19,79	19,09	20,57	59,45	19,82	0,74
C1D2	14,61	14,86	14,48	43,96	14,65	0,19
C1D3	14,25	13,87	14,67	42,80	14,27	0,40
C1D4	14,35	13,34	13,56	41,25	13,75	0,53
C2D1	6,99	7,12	7,11	21,22	7,07	0,07
C2D2	8,10	8,26	8,08	24,43	8,14	0,10
C2D3	9,37	9,04	8,70	27,11	9,04	0,33
C2D4	11,83	11,53	12,68	36,04	12,01	0,60
C3D1	3,74	3,85	3,68	11,27	3,76	0,08
C3D2	5,73	5,38	5,23	16,34	5,45	0,26
C3D3	5,70	5,88	6,11	17,68	5,89	0,21
C3D4	5,10	5,04	5,26	15,40	5,13	0,11
C4D1	13,50	14,08	13,32	40,91	13,64	0,40
C4D2	15,18	14,64	15,36	45,18	15,06	0,37
C4D3	14,94	14,26	15,28	44,48	14,83	0,52
C4D4	14,04	14,70	15,26	44,00	14,67	0,61
C5D1	14,82	14,79	13,22	42,83	14,28	0,91
C5D2	14,21	13,53	13,53	41,27	13,76	0,39
C5D3	13,40	13,11	12,34	38,84	12,95	0,54
C5D4	11,48	11,94	12,26	35,68	11,89	0,39
Total	231,15	228,31	230,69	690,15	-	-

Ket: Simbol huruf C menyatakan perlakuan suhu (60, 70, 80, 90 dan 100°C)

Simbol huruf D menyatakan perlakuan waktu pemanasan (5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit)

- Analisa Keragaman (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	sig
Ulangan	2	0,53	2,60				
Perlakuan	19	20377,45	1072,50	3,082	1,85	2,40	**
Suhu	4	14667,68	3666,92	3,616	2,62	3,86	**
Waktu	3	2999,19	999,73	3,051	2,85	4,34	**
SW	7	2710,58	387,23	2,639	2,26	3,15	**
Galat	38	33,75	0,89	-	-	-	-
Total	59	39326,75	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, MBC dari uji stabilitas (waktu dan suhu) dapat diketahui bahwa interaksi suhu dan waktu berbeda nyata. Dari interaksi suhu dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

Lanjutan Lampiran 9.

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD\ 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{0,89}{3}} = 0,544$$

Karena yang akan dibandingkan ada 20 perlakuan maka banyaknya UJD adalah $(20 - 2 = 18)$

Perlakuan	Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
C3D1	3,76			a
C3D4	5,13	1,56	2,86	b
C3D2	5,45	1,64	3,01	b
C3D3	5,89	1,69	3,1	b
C2D1	7,07	1,72	3,17	b
C2D2	8,14	1,75	3,22	bc
C2D3	9,04	1,78	3,27	bc
C5D4	11,89	1,80	3,3	c
C2D4	12,01	1,81	3,33	c
C5D3	12,95	1,82	3,35	c
C4D1	13,64			c
C1D4	13,75	1,84	3,39	cd
C5D2	13,76			cd
C1D3	14,27	1,86	3,42	d
C5D1	14,28			d
C1D2	14,65	1,87	3,44	d
C4D4	14,67			d
C4D3	14,83	1,88	3,46	de
C4D2	15,06		3,46	de
C1D1	19,82	1,89	3,47	e

Lampiran 10. Nilai MIC Uji Stabilitas Ekstrak dengan Pemberian Suhu dan Waktu

- Data Hasil Perhitungan Mt untuk Penentuan MIC

Perlakuan	Ulangan			Total	rata-rata	Std.Dev
	1	2	3			
C1D1	79,14	76,34	82,29	237,78	79,26	2,98
C1D2	58,46	59,46	57,93	175,84	58,61	0,77
C1D3	57,01	55,49	58,69	171,19	57,06	1,60
C1D4	57,41	53,37	54,23	165,02	55,01	2,13
C2D1	27,97	28,48	28,44	84,89	28,30	0,28
C2D2	32,40	33,02	32,30	97,73	32,58	0,39
C2D3	37,46	36,17	34,79	108,42	36,14	1,34
C2D4	47,34	46,12	50,72	144,17	48,06	2,38
C3D1	14,97	15,38	14,72	45,07	15,02	0,33
C3D2	22,92	21,52	20,92	65,36	21,79	1,03
C3D3	22,79	23,50	24,44	70,73	23,58	0,83
C3D4	20,41	20,17	21,04	61,62	20,54	0,45
C4D1	54,02	56,33	53,28	163,63	54,54	1,59
C4D2	60,72	58,57	61,44	180,73	60,24	1,49
C4D3	59,76	57,04	61,12	177,92	59,31	2,08
C4D4	56,16	58,81	61,02	176,00	58,67	2,43
C5D1	59,28	59,16	52,89	171,33	57,11	3,65
C5D2	56,84	54,12	54,12	165,09	55,03	1,57
C5D3	53,58	52,42	49,36	155,37	51,79	2,18
C5D4	45,94	47,76	49,02	142,72	47,57	1,55
Total	924,58	913,25	922,77	2760,61	-	-

Ket: Simbol huruf C menyatakan perlakuan suhu (60, 70, 80, 90 dan 100°C)

Simbol huruf D menyatakan perlakuan waktu pemanasan (5 menit, 10 menit, 15 menit dan 20 menit)

- Analisa Keragaman (ANOVA)

SK	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%	sig
Ulangan	2	3,71	0,569	-	-	-	-
Perlakuan	19	16845,00	4,226	2,016	0,267	0,380	*
Suhu	4	234683,80	5,370	2,562	0,418	0,586	**
Waktu	3	15,31	1,185	0,565	0,454	0,637	*
SW	7	2241,84	3,351	1,598	0,354	0,498	**
Galat	38	124,78	2,096	-	-	-	-
Total	59	16973,48	-	-	-	-	-

Kesimpulan: Dari analisa ragam, MBC dari uji stabilitas (waktu dan suhu) dapat diketahui bahwa interaksi suhu dan waktu berbeda nyata. Dari interaksi suhu dan waktu tersebut dapat dicari kombinasi perlakuan yang memberikan pengaruh paling tinggi.

Lanjutan Lampiran 10.

- Perhitungan dan Notasi Duncan 5%

$$UJD\ 5\% = \sqrt{\frac{KTGalat}{ulangan}} = \sqrt{\frac{2,096}{3}} = 0,698$$

Karena yang akan dibandingkan ada 20 perlakuan maka banyaknya UJD adalah $(20 - 2 = 18)$

Perlakuan	Rata-rata	UJD 0,05	rp	Notasi
C3D1	15,02			a
C3D4	20,54	2,00	2,86	b
C3D2	21,79	2,10	3,01	b
C3D3	23,58	2,17	3,1	bc
C2D1	28,30	2,21	3,17	c
C2D2	32,58	2,25	3,22	d
C2D3	36,14	2,28	3,27	e
C5D4	47,57	2,31	3,3	f
C2D4	48,06	2,33	3,33	f
C5D3	51,79	2,34	3,35	fg
C4D1	54,54			fg
C1D4	55,01	2,37	3,39	g
C5D2	55,03			g
C1D3	57,06	2,39	3,42	gh
C5D1	57,11			gh
C1D2	58,61	2,40	3,44	gh
C4D4	58,67			gh
C4D3	59,31	2,42	3,46	gh
C4D2	60,24		3,46	h
C1D1	79,26		3,47	i

Lampiran 11. Hasil Analisa LC-MS

LC MS –ESI pos ion

Sample : *Tetraselmis chuii*

Vol injection 5 ul

Flow rate 0.5 ml/min

Eluent Methanol

LC-MS : Mariner Biospectrometry

LC : Hitachi L 6200

System ESI (Electrospray Ionisation)

Positive ion mode

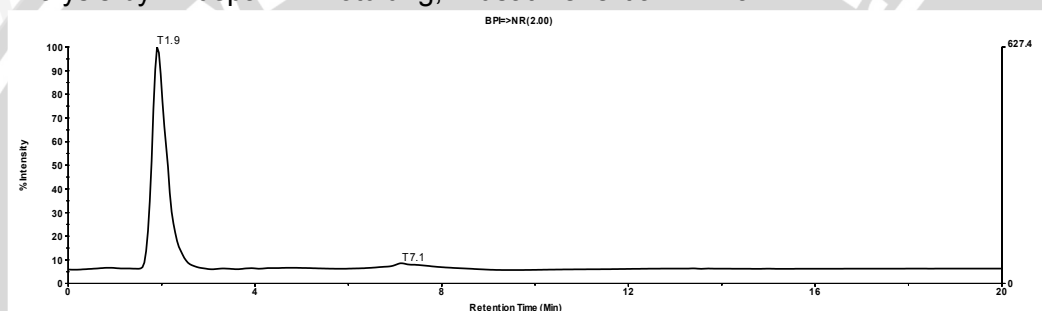
Kolom C18 (RP 18) Supelco Asentis 581324-U

Column length : 150 mm

ID : 4.6 mm

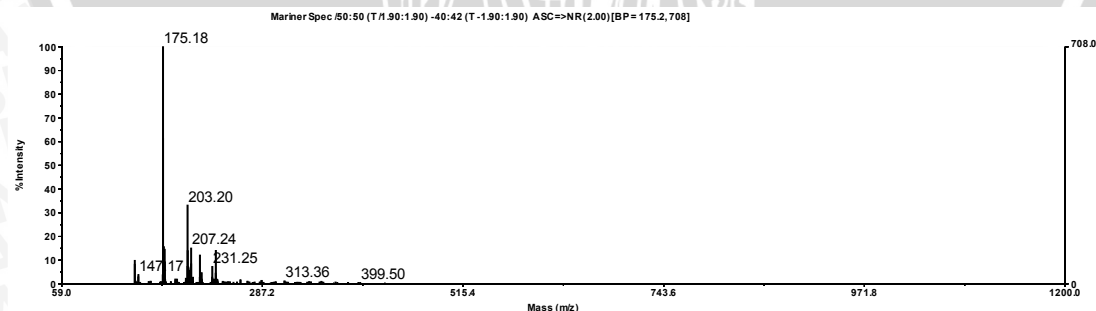
Particle size : 5 µm

Analysis by : Puspa .D. Lotulung, Pusat Penelitian Kimia – LIPI

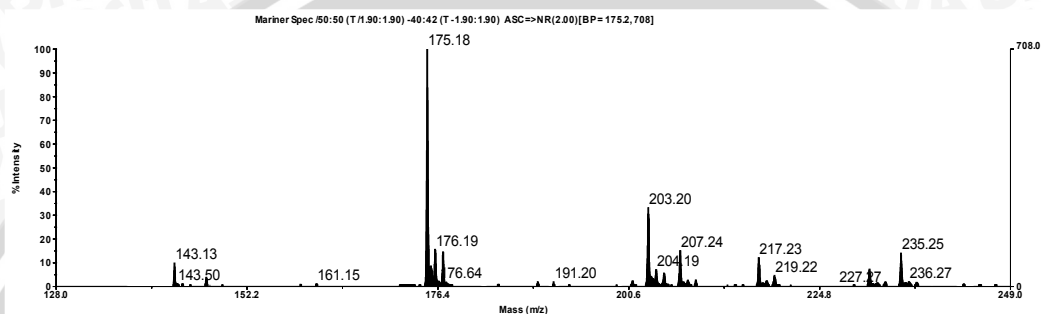
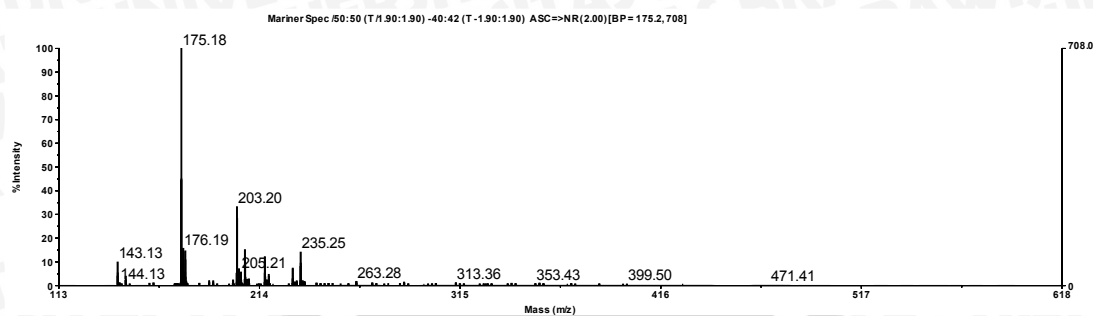


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	1.902067	1.512833	3.029350	627	5626.44
2	7.149783	6.062550	9.053517	53	547.98

Rt 1.90 min



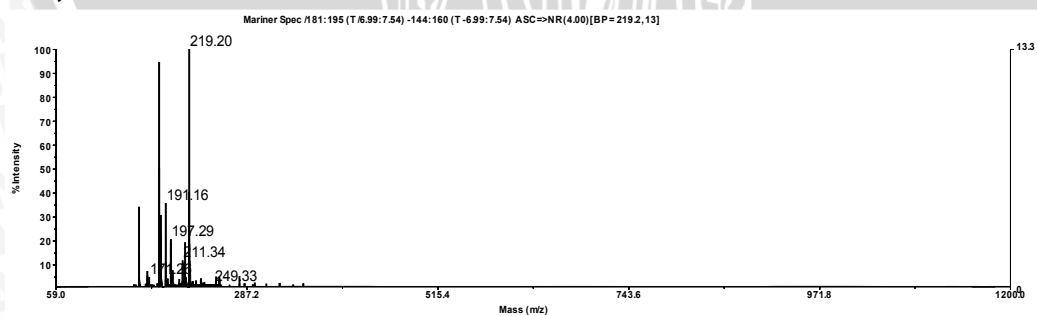
Lanjutan Lampiran 11. Spektra LC-MS Rt 1,90 min



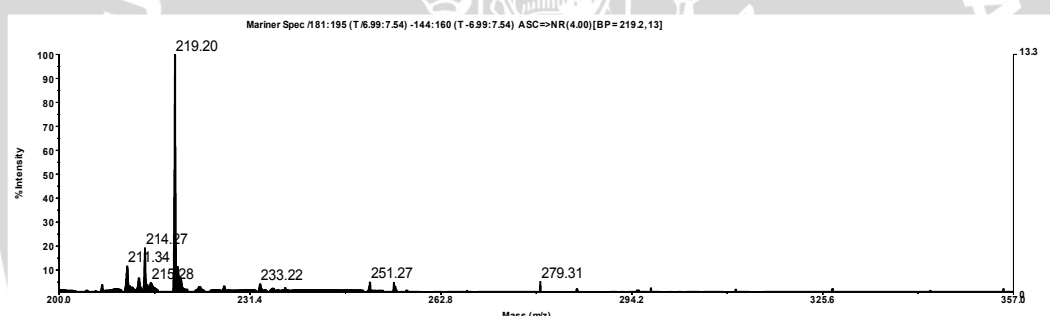
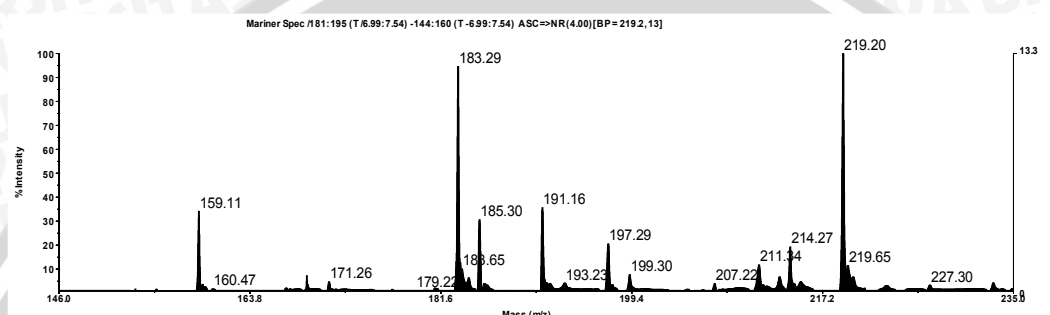
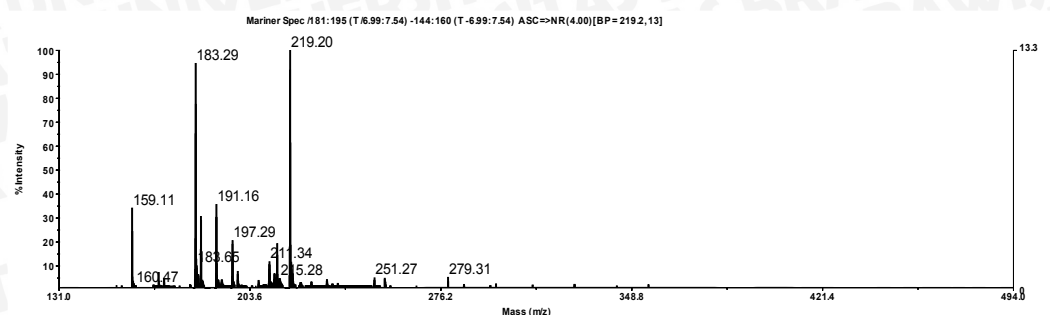
Index	Centroid Mass	Relative Intensity	Area
1	143.126172	9.89	492.76
2	143.499827	1.14	53.29
3	144.129413	1.07	55.75
4	147.169207	3.84	220.39
5	161.146866	1.07	67.08
6	174.22275	0.54	56.81
7	175.176386	100	5036.36
8	175.555776	8.46	62.38
9	175.649478	8.61	73.88
10	176.185138	15.61	811.87
11	177.176106	14.6	780.24
12	177.534951	1.78	52.71
13	181.569372	0.17	50.97
14	184.190241	0.91	63.77
15	190.192131	0.35	48.86
16	201.203456	2.34	120.55
17	203.198852	33.2	2006.94
18	203.566382	4.29	45.43
19	204.192979	7.07	343.98
20	205.212317	5.7	293.13
21	207.235926	15.07	871.5
22	208.226372	2.63	114.89
23	209.223583	2.74	120.08
24	215.179134	0.54	45.38

25	217.231446	12.08	699.44
26	218.215096	2.29	143.92
27	219.215004	4.67	188.93
28	231.250833	7.3	394.75
29	232.243386	1.43	81
30	233.257315	1.97	126.55
31	235.249885	14.07	748.02
32	236.268009	1.98	101.26
33	245.269099	0.82	74.31
34	247.259701	0.79	47.65
35	249.271526	0.89	73.79
36	259.300959	0.73	51.94
37	263.283016	1.67	124.57
38	265.249389	0.42	43.56
39	271.281632	1.08	73.09
40	273.312846	0.77	56.3
41	285.266431	0.78	40.36
42	287.315706	1.45	55.74
43	289.38228	0.6	50.47
44	301.33631	0.64	41.15
45	303.302452	0.85	57.91
46	313.355438	1.1	75.64
47	317.361247	0.63	42.01
48	329.373081	0.61	41.03
49	331.347601	0.6	44.31
50	339.481875	0.64	42.37
51	341.368194	0.93	67.4
52	343.419011	0.74	42.6

Rt 7,15 min



Lanjutan Lampiran 11. Spektra LC-MS Rt 7,15 min



Index	Centroid Mass	Relative Intensity	Area
1	128.081065	0.45	3.79
2	159.113033	34.14	34.05
3	160.467336	1.67	2.72
4	171.261717	4.69	4.31
5	179.217095	1.24	2.32
6	183.290029	94.5	83.06
7	183.645779	10.09	2.24
8	184.281907	6.41	5.51
9	185.29588	30.65	35.56
10	185.878745	4.02	26.93
11	191.1574	35.65	41.02
12	191.866274	4.02	2.53
13	193.234617	4.14	6.03
14	196.21024	1.81	3.89
15	197.292107	20.54	27.73
16	199.300689	7.71	11.07

17	207.219802	3.95	4.19
18	209.581805	2.11	5.8
19	211.344951	11.7	17.21
20	213.281061	6.8	12.07
21	214.266016	19.31	19.74
22	215.277958	4.7	10.51
23	218.072592	0.03	2.52
24	219.197076	100	110.16
25	219.653465	11.56	6.92
26	220.133007	6.78	2.46
27	223.258447	3.14	14.49
28	227.301324	3.35	3.05
29	231.333586	1.76	6.08
30	233.221228	4.26	5.54
31	235.294448	2.43	3.18
32	249.334596	1.68	3.62
33	251.268452	5.06	6.34
34	255.232204	4.86	2.45
35	279.307069	5.25	2.21



Lampiran 12. Dokumentasi Penelitian

Proses Ekstraksi *Tetraselmis chuii*



1. Penimbangan serbuk *Tetraselmis chuii* sebanyak 50 g



2. Sampel dalam wadah beaker glass (perlakuan 24 jam, 48 jam dan 72 jam)



3. Pemberian pelarut heksan sebanyak 250 ml (1:5)



4. Maserasi sampel dengan alat pengaduk



5. Penyaringan hasil maserasi dengan pelarut heksan



6. Pemisahan pelarut dengan *vaccum rotary evaporator*



7. Ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*



8. Penimbangan residu pelarut heksan



9. Pemberian pelarut etil asetat perbandingan 1:5



10. Maserasi sampel dengan alat pengaduk



11. Penyaringan hasil maserasi pelarut etil asetat (24 jam, 48 jam, dan 72 jam)



12. Hasil Penyaringan sampel *Tetraselmis chuii*, pelarut etil asetat

Lanjutan Lampiran 12. Proses Ekstraksi *Tetraselmis chuii*



13. Pemisahan pelarut dengan *vaccum rotary evaporator*



14. Ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* pelarut etil asetat



15. Penimbangan residu pelarut n-heksan



16. Pemberian pelarut etanol (1:5)



17. Maserasi sampel dengan alat pengaduk



18. Penyaringan sampel *Tetraselmis chuii* pelarut etanol



19. Hasil penyaringan serbuk *Tetraselmis chuii* pelarut etanol



20. Pemisahan pelarut dengan *vaccum rotary evaporator*



21. Ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* pelarut etanol

Lanjutan Lampiran 12. Proses Penanaman Bakteri

a. Pembuatan inokulum bakteri



1. Penimbangan media NB



2. Pelarutan media NB dengan aquadest



3. Proses sterilisasi suhu 121°C selama 15 menit



4. Media NB setelah sterilisasi dimasukkan dalam tabung reaksi



5. Bakteri *Morganella morganii* dimasukkan sebanyak 1 ose



6. Pengadukan media dan bakteri hingga homogen



7. Disimpan dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam

b. Uji daya hambat, MBC dan uji stabilitas



8. Penimbangan media NA sesuai kebutuhan cawan



9. Media NA yang telah dilarutkan dengan aquades



10. Proses sterilisasi suhu 121°C selama 15 menit

Lanjutan Lampiran 12. Uji daya hambat, MBC dan uji stabilitas



11. Penghomogenan media NA dan koloni bakteri dari media cair NB (20:1)



12. Media NA dituang dalam cawan petri dan ditunggu hingga padat



13. Pembuatan sumuran (lubang) pada media NA padat



14. Perlakuan suhu untuk uji stabilitas ekstrak pada tahap 2



15. Pembuatan konsentrasi pada ekstrak kasar *Tetraselmis chuii* untuk uji MBC



16. Pemberian 30 μ l ekstrak Kasar *Tetraselmis chuii* dalam media sumuran (lubang)



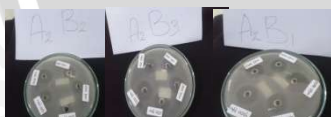
17. Penyimpanan media dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam



18. Zona hambat *Tetraselmis chuii* dengan pelarut ekstrak berbeda



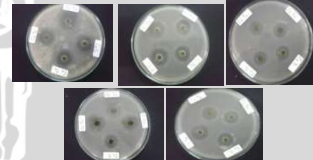
19. Zona hambat bakteri *Morganella morganii* untuk penghitungan nilai MBC, sampel uji ekstrak dengan pelarut heksan



20. Zona hambat bakteri *Morganella morganii* untuk penghitungan nilai MBC, sampel uji ekstrak dengan pelarut etil asetat



21. Zona hambat bakteri *Morganella morganii* untuk penghitungan nilai MBC, sampel uji ekstrak dengan pelarut etanol



22. Zona hambat dengan pemberian suhu pada ekstrak



23. Zona hambat penentuan nilai MBC dengan pemberian konsentrasi (ppm) pada ekstrak



24. Uji Fitokimia ekstrak kasar *Tetraselmis chuii*