

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama

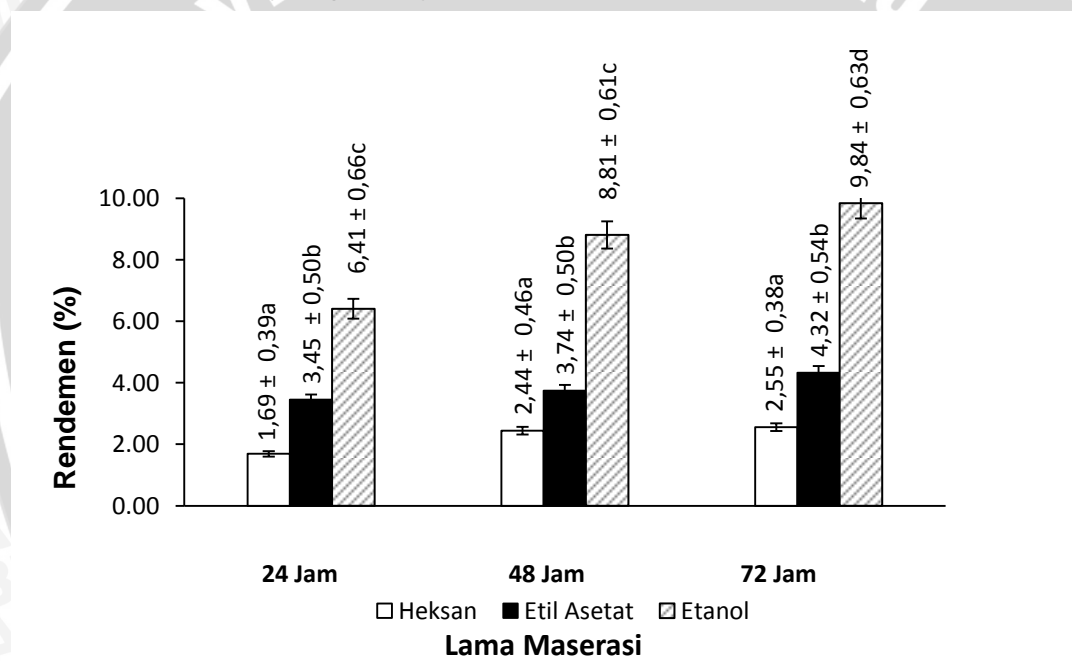
Penelitian tahap pertama dilakukan terhadap mikroalga *S. costatum* sebagai sampel bahan baku, dimana menggunakan 3 jenis pelarut dengan sifat kepolaran yang berbeda yaitu heksan (non polar), etil asetat (semi polar), dan etanol (polar). Kemudian dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi yang bertujuan untuk melarutkan senyawa bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Ketiga pelarut tersebut digunakan untuk mendapatkan hasil ekstrak *S. costatum* yang terbaik berdasarkan daya hambat tertinggi. Selanjutnya dihitung nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*). Tahap selanjutnya adalah diuji fitokimia dan LCMS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) yang bertujuan untuk mengetahui senyawa yang diduga dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*.

4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar Mikroalga *S. costatum*

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

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, presentase rendemen pada sampel (ekstrak kasar mikroalga *S. costatum*) dengan pelarut dan waktu

berbeda didapatkan hasil 1,69% hingga 9,84%. Hasil analisis ANOVA (Lampiran 8) menunjukkan penggunaan jenis pelarut dan lama maserasi memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap rendemen ekstrak kasar *S. costatum*. Interaksi yang ditimbulkan oleh kedua faktor tersebut berpengaruh berbeda nyata terhadap presentase hasil rendemen ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$). Untuk mengetahui pengaruh pemberian pelarut dan lama maserasi yang berbeda terhadap rendemen, maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) secara ringkas pada grafik diameter hambatan Gambar 5 (Lampiran 7).



Gambar 5. Rendemen ekstrak kasar mikroalga *S. costatum*
Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 5 menunjukkan bahwa hasil uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) didapatkan pada jenis pelarut etanol dengan lama waktu ekstraksi 72 jam sebesar 9,84%. Dapat dilihat presentase hasil sampel lebih tinggi, disimpulkan bahwa semakin lama ekstraksi maka jumlah rendemen yang dihasilkan juga semakin banyak. Menurut (Widayanti, 2012), lama ekstraksi 72

jam dapat mempengaruhi rendemen sebab semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka bahan yang terekstrak semakin meningkat pula. Namun dengan rasio tertentu antara bahan dan pelarut yang digunakan. Hal ini dapat dilihat pada ketiga pelarut mengalami kenaikan rendemen disetiap penambahan lama ekstraksi. Salah satu pelarut terbaik adalah pelarut etanol dimana dapat mengekstrak sebagian besar komponen sel mikroalga termasuk komponen gula, asam amino, garam, protein hidrofobik, dan pigmen (Grima *et al.*, 2004). Oleh sebab itu, ekstraksi menggunakan pelarut polar dapat menghasilkan rendemen ekstrak yang lebih tinggi. Diduga asam amino, gula, dan klorofil terlarut dalam pelarut yang digunakan sehingga meningkatkan nilai rendemen ekstrak.

Dalam ekstraksi senyawa antibakteri ekstrak *S. costatum* diperlukan waktu ekstraksi yang tepat agar diperoleh zat aktif dengan rendemen yang besar dan mempunyai aktivitas yang baik untuk menghentikan pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri penyebab kerusakan pangan (Wenno *et al.*, 2010). Hasil ini didukung dengan penelitian oleh (Yu dan Goktepe, 2005), menyatakan bahwa semakin tinggi kandungan bahan yang memiliki tingkat kepolaran sama, maka rendemen yang dihasilkan akan semakin meningkat karena bahan dapat terekstrak maksimal.

4.1.2 Uji Fitokimia

Pada penelitian ini uji fitokimia yang digunakan adalah alkaloid, flavanoid, fenol, tanin, steroid/triterpenoid dan saponin. Berikut adalah hasil pengujian fitokimia terhadap ekstrak kasar mikroalga *S.costatum*, ditunjukkan pada Tabel 3. (Lampiran 5).

Tabel 3. Hasil uji fitokimia ekstrak kasar *S. costatum* pelarut etanol

Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
Alkaloid :		
Mayer	+	Positif dengan adanya warna Putih
Wagner	+	Positif dengan adanya warna Coklat
Dragendroff	+	Positif dengan adanya warna Jingga
Flavonoid	-	Tidak menunjukkan perubahan warna
Fenol	+	Positif dengan adanya warna Hijau kebiruan
Tanin	+	Positif dengan adanya warna Jingga
Steroid	+	Positif dengan adanya warna Hijau Bening
Saponin	-	Tidak menunjukkan perubahan warna

Ket: (+) = mengandung senyawa uji

(-) = tidak mengandung senyawa uji

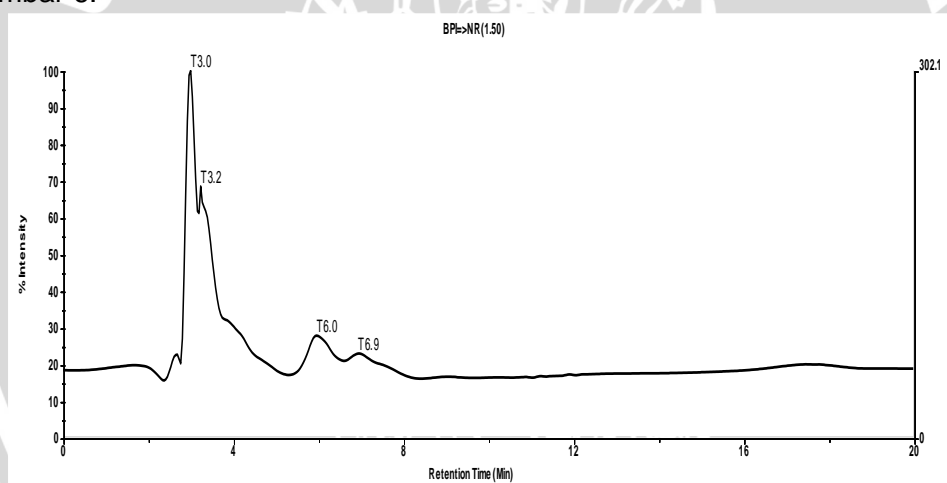
Tabel 3 menunjukkan hasil dari uji fitokimia ini hanya diperoleh berdasarkan golongan senyawa yang diujikan. Golongan senyawa yang diuji meliputi uji alkaloid, fenolik, steroid dan triterpenoid, flavonoid, tanin, dan saponin. Berdasarkan uji fitokimia dari ekstrak kasar mikroalga *S. costatum*, menunjukkan hasil positif pada uji senyawa alkaloid (pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendorf), fenolik, tanin, dan steroid. Menurut (Widyawati, 2011), kandungan dan kadar senyawa fitokimia yang berbeda akan mempengaruhi aktivitas bioaktifnya. Senyawa fitokimia dapat diekstrak dengan pelarut yang sesuai. Tingkat kepolaran pelarut menentukan komponen senyawa fitokimia yang terekstrak.

Pengujian fitokimia ekstrak etanol *Skeletonema costatum* menunjukkan hasil positif mengandung senyawa fenol, senyawa ini dapat berfungsi sebagai antibakteri. Menurut (Saksony, 2012), etanol merupakan senyawa alkohol dengan formula C_2H_5OH . Gugus hidroksi (OH) pada alkohol yang bersifat polar. Etanol juga mampu mengekstrak senyawa fenolik. Ditambahkan (Naufalin *et al.*, 2005), komponen fenolik umumnya larut dalam pelarut organik yang sifatnya polar, oleh karena itu hanya ekstrak etanol yang dapat mengekstrak

fenolik. Senyawa fenolik merupakan substansi yang mempunyai cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil sehingga sifatnya mudah larut dalam pelarut polar. Sekali lagi terbukti bahwa *Skeletonema costatum* memiliki aktivitas senyawa sebagai antibakteri terutama pada senyawa fenol.

4.1.3 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LC-MS

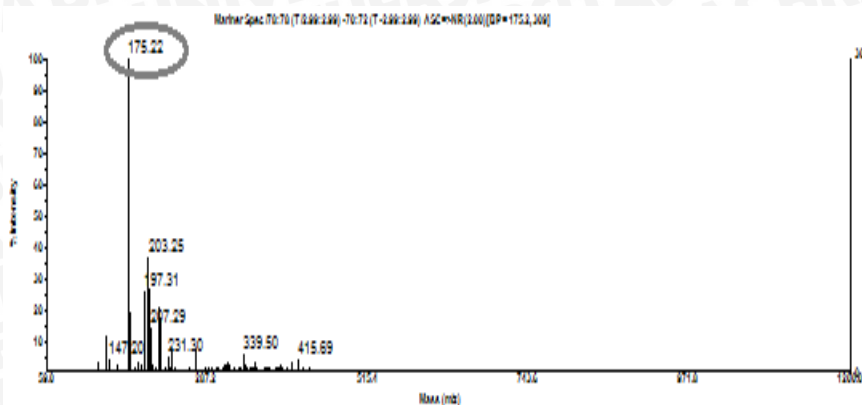
Uji LCMS – ESI (*Electrospray Ionisation*) ekstrak kasar *S. costatum* dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang Selatan. Pengujian LCMS – ESI bertujuan untuk mengidentifikasi berat molekul dari bioaktif pada *S. costatum*. Berikut ini adalah kromatogram waktu retensi ekstrak kasar *S. costatum* dengan uji LC-MS dapat dilihat pada Gambar 6.



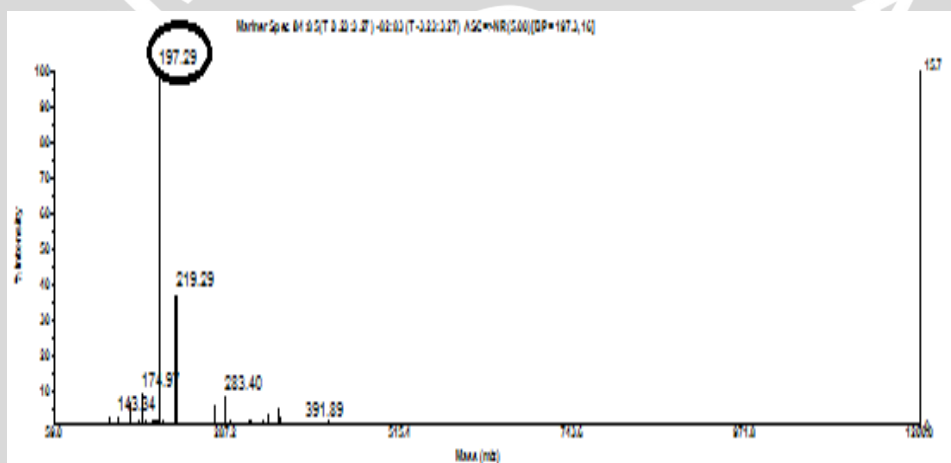
Gambar 6. Kromatogram LC (*Liquid Chromatography*) pada ekstrak kasar *Skeletonema costatum* pelarut etanol

Berdasarkan hasil kromatogram diatas, dapat diketahui bahwa senyawa-senyawa yang berhasil terekstrak terlihat pada menit ke 2.994817, 3.229983, 5.957567 dan 6.930634. Senyawa yang teridentifikasi dari empat retensi waktu tersebut menghasilkan empat puncak tertinggi. Berikut adalah puncak-puncak yang dihasilkan dari keempat waktu retensi ekstrak kasar *S. costatum* dengan uji LC-MS ditampilkan pada Gambar 7 dan Lampiran 20.

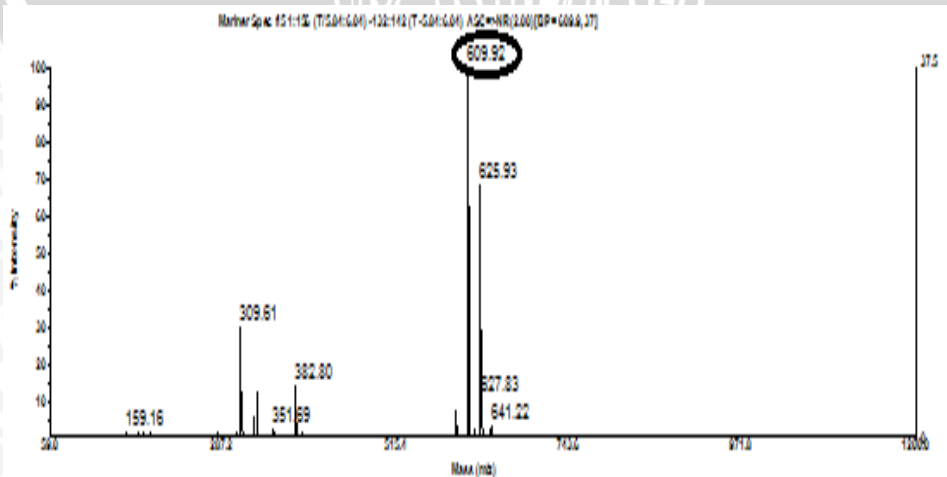
Rt 2.99



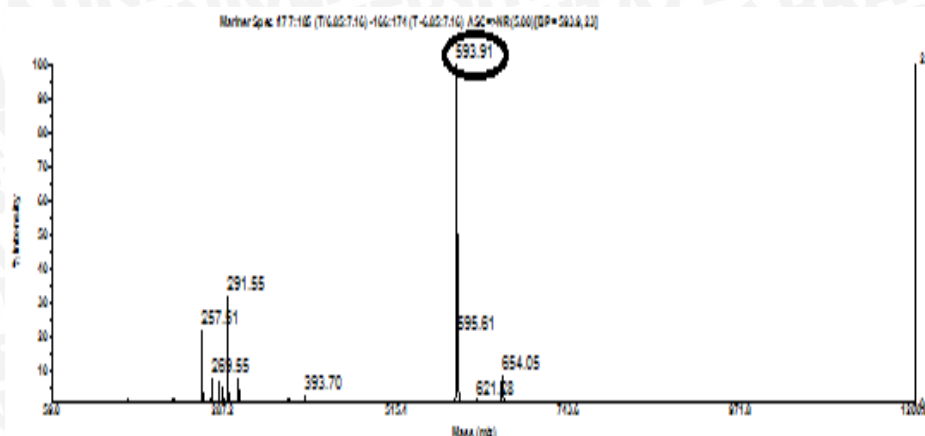
Rt 3.23



Rt 5.95



Rt 6.9



Gambar 7. Kromatogram Mass ekstrak kasar *S. costatum* pelarut etanol

Uji LC-MS ini menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (MeOH). Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^{n+}$. Hasil analisa MS pada Rt 2,99 seperti pada Lampiran 20 menunjukkan beberapa puncak tertinggi yang menandakan fragmentasi berdasarkan berat molekulnya. Pada Rt 2,99 dengan pucak MS tertinggi diduga memiliki berat molekul 176,22 m/z. Berdasarkan penelusuran database spektra melalui website (www.massbank.jp) dan klik halaman *quick search*. Berikut adalah dugaan senyawa terekstrak yang berfungsi sebagai antimikroba dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Dugaan identitas senyawa bioaktif pada ekstrak kasar *S. costatum*

Waktu Retensi	Massa Senyawa	Dugaan Senyawa	Rumus Molekul
2,99	176,22	Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$
3.23	198,29	Artemisinin	$C_{15}H_{22}O_5$
5.95	610,92	Mitomycin	$C_{15}H_{18}N_4O_5$
6.9	594,91	<i>Acacetin</i>	$C_{28}H_{32}O_{14}$

Senyawa yang terdeteksi menggunakan LC-MS dari ekstrak kasar *Skeletonema costatum* pada keempat waktu retensi yang dihasilkan adalah

Menurut (Widyasari *et al.*, 2015), *kanamycin* merupakan antibiotik yang termasuk dalam golongan aminoglikosida yang bekerja menghambat proses sintesis protein mikroorganisme. Sifatnya sebagai antibiotika berspektrum luas memungkinkannya dapat berikatan dengan bakteri Gram negatif maupun Gram positif. *Kanamycin* digunakan untuk pengobatan infeksi, jika penisilin ataupun obat yang kurang toksik lainnya tidak dapat digunakan. Adapun infeksi yang biasanya diobati menggunakan *kanamycin* adalah infeksi pada tulang saluran pernafasan, kulit, jaringan lunak, perut, dan infeksi pada saluran kemih. Lebih lanjut (Pratiwi, 2013), menambahkan *kanamycin* adalah turunan *aminoglicosides* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram-positif (antara lain : *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermis*).

Artemisinin merupakan senyawa induk yang aktif sebagai antimalaria dan saat ini telah diproduksi derivat artemisinin secara semi sintesis, diantaranya adalah *artemether*, *arteether*, dan *artesunat*. *Artemether* dan *arteether* bersifat lebih non polar daripada turunan lain dan larut dalam eter, sementara itu, *artesunat* bersifat lebih polar dapat larut dalam air. *Artemisinin* dan ketiga derivatnya tersebut akan termetabolisme di dalam tubuh menjadi derivat aktif yang bertanggung jawab sebagai antimalaria, yaitu dihidroartemisinin (Purwanto, 2011). Ditambahkan oleh (Karimy *et al.*, 2013), antioksidan turunan artemisinin telah digunakan untuk parasit Plasmodium penyebab malaria melalui mekanisme peningkatan stres oksidatif.

Mitomycin adalah antitumor yang digunakan secara khusus dalam pengobatan kanker. *Mitomycin* memperlambat atau menghentikan pertumbuhan dan penyebaran sel kanker dalam tubuh. *Mytomycin* merupakan obat antitumor yang efektif. Hal ini digunakan untuk beberapa jenis kanker, termasuk kanker

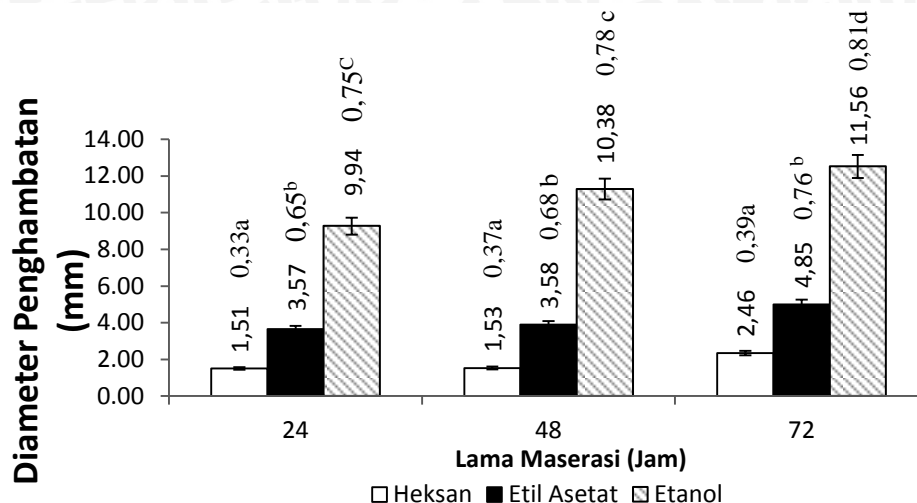
kandung kemih, anus, dan leher rahim (Antari, 2010). Senyawa bioaktif *mitomycin* belum banyak digunakan dalam penelitian tentang bakteri Gram-positif.

Acacetin merupakan senyawa yang memiliki kemampuan antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *L. monocytogenes*, dan *Candida albicans*. Senyawa acacetin hasil isolasi akan dapat digunakan pada berbagai sumber bioaktif yang dapat digunakan pada sebagai bahan aktif obat-obatan, proses pengawetan makanan, maupun berbagai aplikasi lainnya. Selain sebagai antimikroba, *acacetin* juga berpotensi sebagai anti HIV. *Acacetin* merupakan senyawa kelas flavon yang memiliki aktivitas antimikroba dan juga berpotensi sebagai anti HIV (Pambudi *et al.*, 2013).

Korelasi LC-MS dengan uji fitokimia dalam penelitian ini menunjukkan hubungan yang positif. Hasil LC-MS ditunjukkan dengan adanya dugaan senyawa aktif yang mengandung antibakteri seperti *kanamycin* dari golongan fenol seperti steroid. Dimana terpenoid, termasuk triterpenoid dan steroid merupakan senyawa bioaktif yang memiliki fungsi sebagai antibakteri. Senyawa-senyawa ini dapat menghambat pertumbuhan bakteri, baik melalui membran sitoplasma maupun mengganggu pertumbuhan dan perkembangan bakteri. Ditambahkan (Hamdiyanti *et al.*, 2010), mengungkapkan bahwa mekanisme penghambatan oleh senyawa terpenoid masih belum diketahui dengan jelas. Namun dengan adanya sifat hidrofobik atau lipofilik pada senyawa terpenoid kemungkinan menyebabkan kerusakan sitoplasmik membran, koagulasi sel, dan terjadinya gangguan proton pada sel bakteri.

4.1.4 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Mikroalga *Skeletonema costatum* terhadap *Staphylococcus aureus*

Aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada cawan berisi *Staphylococcus aureus*. Mikroba tersebut dipilih karena bersifat patogen pada manusia. Setiap ekstrak dari masing-masing perlakuan menunjukkan diameter hambat yang berbeda. Ekstrak yang ditambahkan pada lubang sumuran adalah 10 μ L untuk bakteri. Selain itu, mikroorganisme akan menunjukkan tingkat sensitivitas yang berbeda terhadap ekstrak yang diberikan. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rerata diameter penghambatan ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* berkisar antara 1,51 – 11,56 mm. Hasil analisa ANOVA (Lampiran 8) menunjukkan penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap besarnya diameter hambat. Interaksi yang ditimbulkan oleh kedua faktor tersebut berpengaruh berbeda nyata terhadap diameter hambat ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$). Untuk mengetahui pengaruh pemberian pelarut dan lama maserasi yang berbeda terhadap diameter hambat, maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) secara ringkas pada grafik diameter hambat Gambar 8 (Lampiran 8).



Gambar 8. Pengaruh jenis pelarut dengan lama maserasi berbeda terhadap diameter hambat ekstrak kasar *Skeletonema costatum*

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Berdasarkan data diatas ekstrak antibakteri dari *Skeletonema costatum* dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* ditandai dengan adanya diameter hambat pada cawan. Kemudian diukur diameternya untuk mengetahui keefektifitasan terhadap masing-masing perlakuan pada bakteri uji. Secara garis besar dapat dilihat bahwa ekstrak terbesar untuk antibakteri adalah pelarut etanol lebih optimal dan efektif dalam menghambat *Staphylococcus aureus* dengan lama maserasi 72 jam sebesar 11,56 mm. Menurut (Widayanti, 2012), lama ekstraksi 72 jam terhadap diameter hambat yang digunakan dapat mempengaruhi konsentrasi senyawa bioaktif yang berperan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme juga akan semakin meningkat.

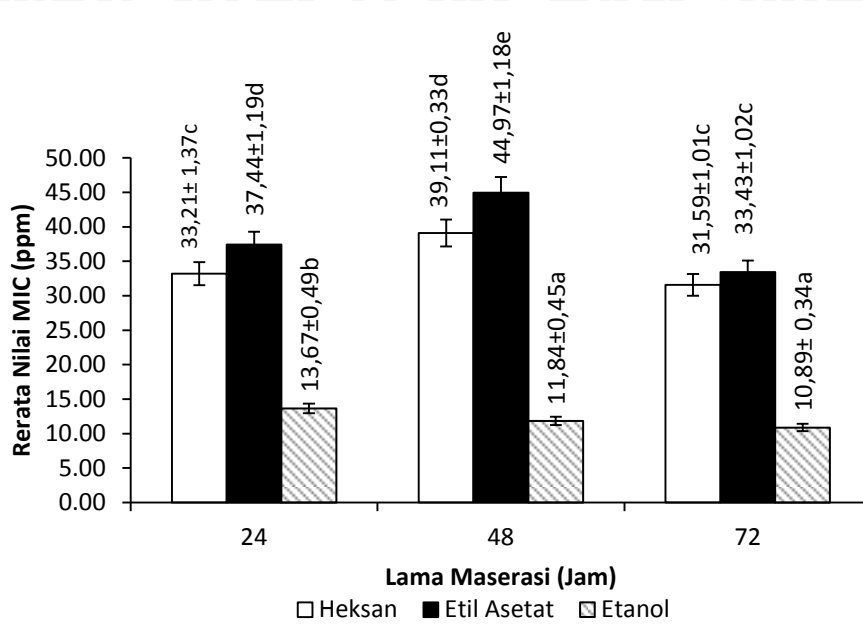
4.1.5 Analisa Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) pada Tahap Pertama

Berikut ini adalah hasil konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bunuh minimum (KBM) ekstrak kasar *Skeletonema costatum*. Untuk menentukan nilai MIC dan MBC dilakukan pengujian dengan pemberian

konsentrasi yaitu 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ppm pada ekstrak kasar *S. costatum* bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terbaik dalam menghambat atau membunuh *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Lampiran 9 dan 10.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada ekstrak non-polar (heksan) dan semi polar (etil asetat) menunjukkan tidak adanya penghambatan terhadap *S. aureus*, sedangkan pada pelarut polar (etanol) menunjukkan adanya penghambatan terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi sebesar 5000 ppm pada perlakuan MBC dan MIC. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan nilai MBC adalah konsentrasi minimum pertumbuhan dalam arti konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri uji (Rinawati, 2007).

Hasil uji MIC ekstrak kasar mikroalga *Skeletonema costatum* dengan jenis pelarut dan lama waktu berbeda berkisar antara 10,89 ppm hingga 44,97 ppm. Hasil ANOVA (*Analysis of Variance*) menunjukkan penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai MIC ekstrak kasar *S. costatum*. Interaksi yang ditimbulkan oleh kedua faktor tersebut berpengaruh berbeda nyata terhadap parameter MIC ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$). Untuk mengetahui pengaruh pemberian pelarut dan lama maserasi yang berbeda terhadap nilai MIC, maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) secara ringkas pada grafik nilai MIC Gambar 9 (Lampiran 10).



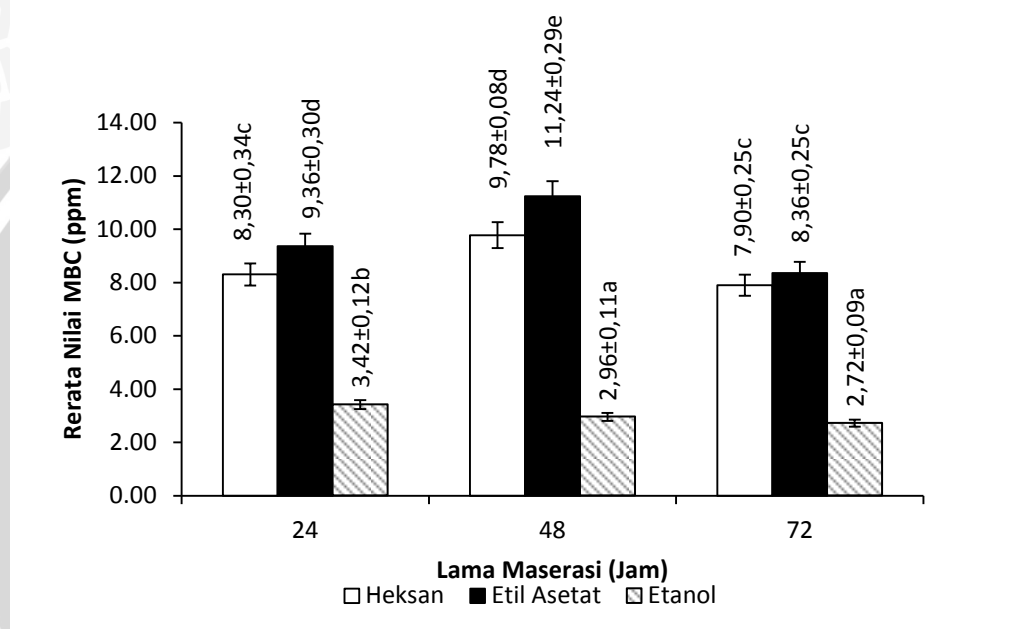
Gambar 9. Pengaruh jenis pelarut dengan lama maserasi berbeda terhadap nilai MIC ekstrak kasar *Skeletonema costatum*

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 9 menunjukkan hasil uji MIC ekstrak kasar *S. costatum* terbaik didapat pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 10,89 ppm. Menurut (Dewi *et al.*, 2010), dalam penelitiannya menunjukkan nilai MIC itu sendiri adalah konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dalam suatu medium. Jadi, semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan mikroba semakin baik, namun jika nilai MIC semakin tinggi maka konsentrasi untuk menghambat pertumbuhan mikroba semakin rendah. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki potensi untuk digunakan sebagai sumber senyawa antibakteri.

Hasil uji MBC ekstrak kasar *S. costatum* dengan jenis pelarut dan lama waktu berbeda berkisar antara 2,27 ppm hingga 11,24 ppm. Hasil ANOVA (*Analysis of Variance*) menunjukkan penggunaan jenis pelarut dan lama ekstraksi yang berbeda memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0,05$)

terhadap nilai MBC ekstrak kasar *S. costatum*. Interaksi yang ditimbulkan oleh kedua faktor tersebut berpengaruh berbeda nyata terhadap parameter MBC ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$). Untuk mengetahui pengaruh pemberian pelarut dan lama maserasi yang berbeda terhadap nilai MBC, maka dilakukan uji lanjut dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) secara ringkas pada grafik nilai MBC pada Gambar 10. (Lampiran 9).



Gambar 10. Pengaruh jenis pelarut dengan lama maserasi berbeda terhadap nilai MBC ekstrak kasar *Skeletonema costatum*

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 10 menunjukkan hasil MBC ekstrak kasar *S. costatum* terbaik didapat pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 2,72 ppm. Ekstrak etanol yang digunakan sangat berpengaruh dengan aktivitas antibakteri yang dihasilkan, ekstrak etanol menghasilkan aktivitas penghambatan bakteri yang lebih besar daripada pelarut etil asetat dan heksan. Menurut (Ramadanti, 2008), MBC ditentukan pada konsentrasi terendah dimana pada media tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Ekstrak etanol memiliki

kandungan senyawa yang terdiri dari alkaloid dan tanin. Menurut (Nychas,1995), tanin merupakan tergolong kelompok fenolik yang memiliki sifat antibakteri.

4.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua

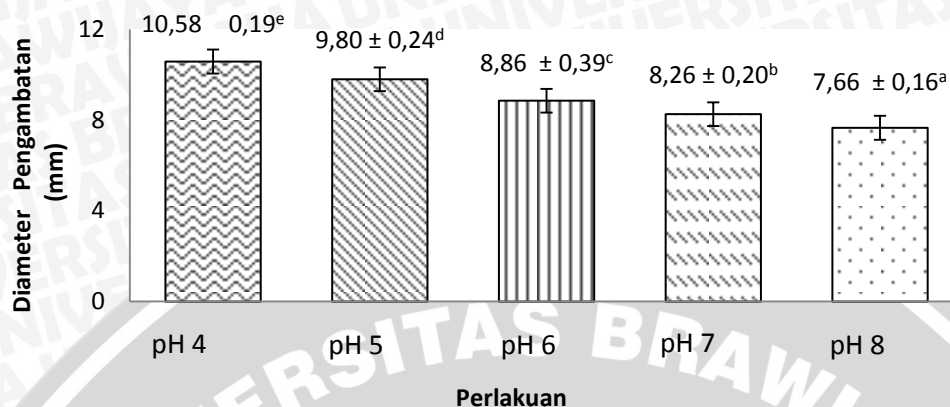
Penelitian tahap kedua ini merupakan tahap penelitian yang dilakukan berdasarkan hasil yang terbaik dari penelitian tahap pertama. Pada penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap diameter hambat antibakteri ekstrak kasar *S. costatum*, mengetahui nilai MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*).

4.2.1 Aktivitas Ekstrak Kasar *Skeletonema costatum* pada pH

Penelitian tahap kedua ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pH terhadap antibakteri ekstrak kasar *S. costatum*. pH awal dari ekstrak kasar *S. costatum* adalah 4,37. Kemudian untuk meningkatkan nilai pH ditambahkan larutan basa yakni NaOH 0,1 N sedangkan untuk menurunkan pH ditambahkan larutan asam yakni HCl 0,1 N. Penambahan larutan buffer dilakukan sedikit demi sedikit hingga mendapatkan pH yang diinginkan. Dalam proses ini perlu dilakukan pengecekan pH secara berkala hingga mendapatkan pH yang sesuai (Widyawati *et al.*, 2007).

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rata-rata diameter hambat ekstrak kasar *S. costatum* dengan perlakuan pH didapatkan hasil sebesar 7,66 – 10,58 mm. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa penggunaan pelarut etanol dan pH yang berbeda memberikan pengaruh berbeda sangat nyata ($p < 0,05$) terhadap diameter penghambatan ekstrak kasar *S. costatum* pelarut etanol. Interaksi pada kedua faktor yang ditimbulkan berpengaruh berbeda sangat nyata terhadap diameter hambat ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$). Untuk mengetahui pengaruh pelarut etanol dan pemberian pH yang berbeda terhadap diameter hambat, maka dilakukan uji lanjut dengan

Beda Nyata Terkecil (BNT) secara ringkas pada grafik diameter hambat Gambar 11 (Lampiran 11).



Gambar 11. Pengaruh ekstrak kasar *Skeletonema costatum* pelarut etanol dengan pH berbeda terhadap diameter hambat

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda sangat nyata ($p < 0,05$)

Gambar 11 menunjukkan hasil uji *Beda Nyata Terkecil* (BNT) didapatkan pada perlakuan pH 4 terlihat berbeda sangat nyata dengan pH 5, 6, 7 dan pH 8. Hasil penelitian didapatkan diameter hambat tertinggi ekstrak kasar *Skeletonema costatum* dalam menghambat *Staphylococcus aureus* adalah pH 4. pH memiliki peran penting dalam kelangsungan hidup bakteri *Staphylococcus aureus*. Menurut (Sukardi *et al.*, 2007), bakteri non patogen umumnya membutuhkan medium pertumbuhan dengan nilai relatif pH lebih rendah yaitu 3,4 – 6,0.

Berdasarkan gambar di atas, pengaruh ekstrak kasar *Skeletonema costatum* pelarut etanol dengan pH berbeda terhadap diameter penghambatan *Staphylococcus aureus* pada perlakuan pH 4 memiliki diameter hambat yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan pH yang lain dengan nilai rerata 10,58 mm. Hal ini menandakan bahwa pH 4 adalah pH yang efektif dan stabil untuk menghambat pertumbuhan *S. aureus* sesuai dengan hasil penelitian dari

(Pendit *et al.*, 2015), menerangkan bahwa perlakuan pH terbaik sebesar 4,46 dan nilai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* sebesar 13,13 mm.

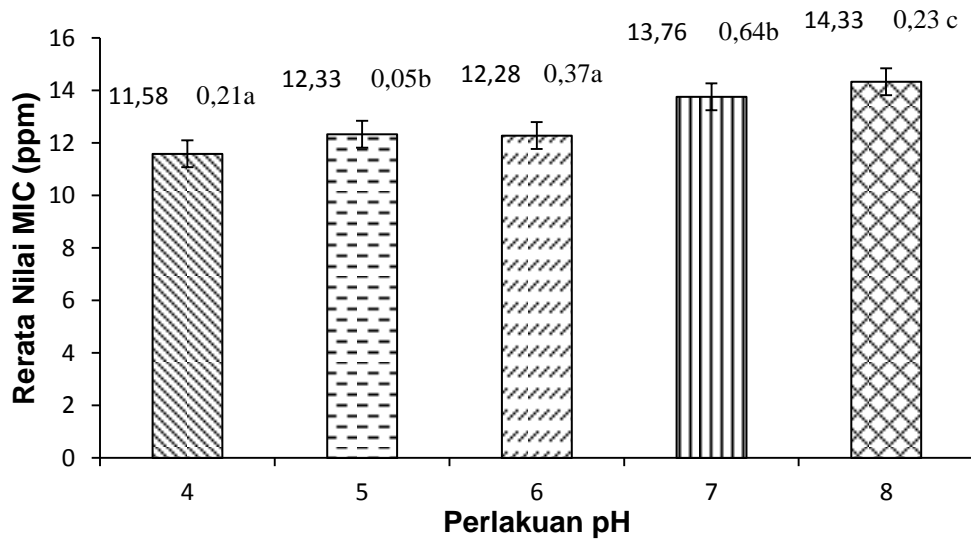
4.2.2 Analisa Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) pada pH

Pada tahap kedua dari berbagai perlakuan sebelumnya (pH 4,5,6,7, dan 8) didapatkan ekstrak etanol dengan pH 4 adalah hasil terbaik untuk diameter penghambatan. Untuk menentukan nilai MIC dan MBC dilakukan menggunakan ekstrak terbaik (etanol) dengan berbagai macam konsentrasi ppm yaitu 1000, 2000, 3000, 4000 dan 5000 ppm, perhitungan nilai konsentrasi (Lampiran 15). Hal ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terbaik dalam menghambat atau membunuh *Staphylococcus aureus*.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada pada pelarut polar (etanol) menunjukkan adanya penghambatan terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi sebesar 5000 ppm pada perlakuan MBC dan MIC. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan nilai MBC adalah konsentrasi minimum pertumbuhan dalam arti konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri uji (Rinawati, 2007).

Hasil uji MIC ekstrak kasar mikroalga *Skeletonema costatum* dengan pH dan konsentrasi berbeda berkisar antara 11,58 ppm hingga 14,33 ppm. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa penggunaan pH dan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai MIC ekstrak etanol *S. costatum*. Interaksi pada kedua faktor yang ditimbulkan berpengaruh berbeda nyata terhadap nilai MIC ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$) ditunjukkan adanya penghambatan terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi sebesar 5000 ppm pada semua perlakuan pH Dimana. Untuk mengetahui pengaruh pH dan pemberian konsentrasi yang berbeda terhadap nilai MIC, maka

dilakukan Hasil uji lanjut dengan *Beda Nyata Terkecil (BNT)* secara ringkas disajikan pada Gambar 12 (Lampiran 12).



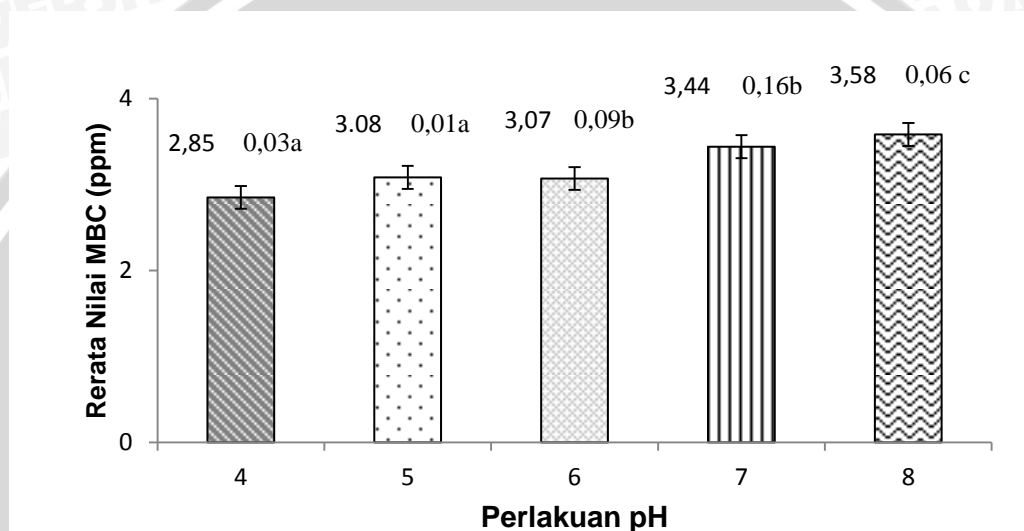
Gambar 12. Pengaruh ekstrak etanol *Skeletonema costatum* pada pH berbeda terhadap nilai MIC dengan konsentrasi 5000 ppm

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 12 dapat dilihat hasil MIC ekstrak kasar *S. costatum* tertinggi didapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 14,33 ppm dan MIC terendah terdapat pada perlakuan pH 4 yaitu sebesar 11,58 ppm. Adapun yang dimaksud dari MIC itu sendiri adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba. Jadi, semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan mikroba semakin baik.

Selanjutnya, hasil uji MBC ekstrak kasar *Skeletonema costatum* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH pada tahap kedua ini berkisar antara 2,85 ppm hingga 3,58 ppm. Hasil ANOVA menunjukkan bahwa penggunaan pH dan konsentrasi yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata ($p < 0,05$) terhadap nilai MBC ekstrak etanol *S. costatum*. Interaksi pada kedua faktor yang ditimbulkan berpengaruh berbeda nyata terhadap nilai MBC

ekstrak kasar mikroalga *S. costatum* ($p < 0,05$) ditunjukkan adanya penghambatan terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi sebesar 5000 ppm pada semua perlakuan pH. Dimana. Untuk mengetahui pengaruh pH dan pemberian konsentrasi yang berbeda terhadap nilai MBC, maka dilakukan Hasil uji lanjut dengan *Beda Nyata Terkecil* (BNT) secara ringkas disajikan pada Gambar 13 (Lampiran 13).



Gambar 13. Pengaruh ekstrak etanol *Skeletonema costatum* pada pH berbeda terhadap nilai MBC dengan konsentrasi 5000 ppm

Keterangan: Notasi huruf yang berbeda menunjukkan beda nyata ($p < 0,05$)

Gambar 13 menunjukkan hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Nilai MBC ekstrak kasar *S. costatum* tertinggi didapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 3,58 ppm dan MBC terendah terdapat pada perlakuan pH 4 yaitu sebesar 2,85 ppm. Nilai MBC yaitu konsentrasi minimum bunuh (MBC = *Minimum Bactericidal Concentration*) merupakan konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri uji (Ramadanti, 2008).

Berdasarkan hasilnya bahwa korelasi antara ekstrak etanol dari *S. costatum* pada pH dalam penelitian ini menunjukkan hubungan yang positif, dimana tingkat keasaman (pH) yang rendah, memiliki dampak sinergis terhadap

daya antibakteri ekstrak etanol. Asam dapat menurunkan pH sitoplasma sel bakteri dan berdampak pada terganggunya kerja enzim-enzim di dalam sel dan aktivitas transportasi melalui membran termasuk transport nutrisi ke dalam sel (Ray, 2001) serta dapat menyebabkan kerusakan membran luar sel dan menyebabkan senyawa-senyawa antibakteri yang bersifat hidrofobik lebih mudah masuk dalam sel (Alakomi *et al.*, 2000).

