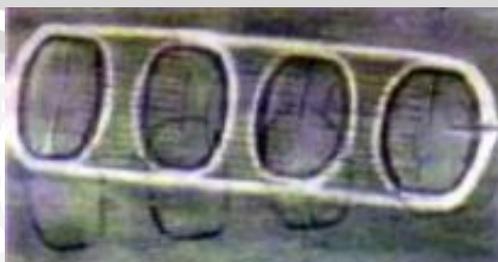


2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Skeletonema costatum*

2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi *S. costatum*

S. costatum merupakan *phytoplankton* yang mana alga bersel tunggal, dengan ukuran sel berkisar antara 4 – 15 mikron. Akan tetapi alga ini dapat membentuk untaian rantai yang terdiri dari beberapa sel. Sel berbentuk kotak yang terdiri atas epiteka pada bagian atas dan hipoteka pada bagian bawah. Bagian hipoteka mempunyai lubang-lubang yang berpola khas dan indah yang terbuat dari silikon oksida. Pada setiap sel dipenuhi oleh sitoplasma. Warna sel coklat dan pada setiap sel mempunyai frustula yang dapat menghasilkan skeletal eksternal. *S. costatum* adalah diatom yang merupakan alga unisel filamentik yang selnya berbentuk kotak yang terdiri atas *epitheca* (bagian yang lebih besar) dan *hypotheca* (bagian yang lebih kecil) yang bertangkup menjadi satu. Spesies ini tergolong pennate diatom yang berkembang biak secara isogami. Bagian *hypotheca*-nya berlubang-lubang yang polanya khas dan indah yang tersusun atas silikon oksida (SiO_2) dengan diameter sel 4 – 15 mikron. Setiap sel diatom dipenuhi sitoplasma. Warna sel hijau kecoklatan dan pada setiap sel memiliki frustula yang menghasilkan skeletal eksternal. Karotenoid dan diatomin merupakan pigmen yang dominan pada jenis ini (Armanda, 2013). *S. costatum* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Skeletonema costatum*
(Sumber : Armanda, 2013)

Klasifikasi *Skeletonema costatum* menurut Arif (2014), adalah sebagai berikut:

Phylum : Bacillariophyta
Class : Bacillariophyceae
Order : Bacillariales
Subordo : *Coscinodiscinae*
Genus : *Skeletonema*
Species : *Skeletonema costatum*

2.2 Pelarut

Pemilihan larutan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Larutan pengestraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan (Yuswantina, 2009).

Metode Ekstraksi tergantung pada polaritas senyawa yang akan diekstrak. Suatu senyawa menunjukkan kelarutan yang berbeda pada pelarut yang berbeda kepolarannya. Terdapat tiga golongan pelarut yaitu pelarut polar, pelarut semi polar, dan pelarut non polar (Pranoto *et al.*, 2012).

2.2.1 Pelarut Polar

Pelarut polar memiliki tingkat kepolaran yang tinggi, cocok untuk mengekstrak senyawa-senyawa yang polar dari tanaman seperti senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, dan tanin. Pelarut polar cenderung universal digunakan karena biasanya walaupun polar, tetap dapat menyari senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran lebih rendah. Contoh pelarut polar adalah air, metanol, etanol, dan asam asetat (Pranoto *et al.*, 2012).

2.2.2 Pelarut Semi Polar

Pelarut semi polar memiliki tingkat kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan pelarut polar. Pelarut ini baik untuk mendapatkan senyawa-senyawa semipolar dari tumbuhan seperti senyawa fenol dan terpenoid. Contoh pelarut ini adalah aseton, etil asetat, dan kloroform (Pranoto *et al.*, 2012).

2.2.3 Pelarut Non-Polar

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

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu cara pemisahan senyawa organik dari tumbuhan atau mikroorganisme. Ekstrak adalah sediaan yang dapat berupa kering, kental dan cair, dibuat dengan menyari simplisia nabati atau hewani menurut cara yang sesuai, yaitu maserasi, perkolasi atau penyeduhan dengan air mendidih. Sebagai cairan penyari digunakan air, eter atau campuran etanol dan air (Mazni, 2008).

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi (*macerate* = mengairi, melunakkan) adalah cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope (umumnya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengekstraksi. Selanjutnya rendaman tersebut disimpan terlindung dari cahaya

langsung (mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali (Mazni, 2008).

2.4 Antibakteri

2.4.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Senyawa antibakteri bekerja dengan merusak dinding sel bakteri, jika dinding sel ini dirusak maka akan menyebabkan kematian bagi sel tersebut. Gunawan (2009), pertumbuhan bakteri yang terhambat atau kematian bakteri akibat suatu zat antibakteri yang dapat disebabkan oleh penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein atau penghambatan terhadap sintesis asam nukleat. Masuknya senyawa antibakteri kedalam 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).

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

2.4.2 Uji Aktivitas Antibakteri

Menurut (Jawetz *et al.*, 1995), semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi antara lain: (1) konsentrasi mikroba uji, (2)

konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium.

Prosedur difusi-kertas cakram-agar yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antibakteri diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran. prinsipnya sama dengan Kirby Bauer, tetapi disk antibiotik diganti dengan larutan antibiotik yang ditetaskan pada sumuran yang dibuat dengan diameter tertentu pada media agar (Mazni, 2008).

2.5 Bakteri Uji *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus berbentuk kokus dengan diameter 0,5-1,5 μm , terdapat dalam bentuk tunggal, berpasangan atau berkelompok membentuk anggur. Selain itu, *S. aureus* bersifat non motil, tidak memiliki kapsul dan tidak berspora (Fardiaz,1992). Bakteri ini dapat tumbuh dan berkembang biak pada kisaran suhu 6,7-45,5°C dan kisaran pH 4,0-9,8 sedangkan suhu optimum pertumbuhan bakteri ini adalah 35-37°C dengan kisaran pH optimumnya 7,0-7,5 (Pelczar dan Chan, 2005). *S. aureus* biasanya terdapat di berbagai bagian tubuh manusia termasuk hidung, tenggorokan, dan kulit sehingga mudah memasuki makanan. Bila kita memakan makanan yang tercemar bakteri ini maka dapat menyebabkan rasa mual, muntah, pusing, dan diare. Bakteri ini bersifat patogen

yang dapat menyebabkan keracunan dan penyakit pada hewan peliharaan. Bakteri ini banyak mencemari pangan karena tindakan yang tidak higienis dalam penanganan pangan (Adam dan Moss, 1995). *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.

S. aureus merupakan bakteri gram positif anaerob fakultatif dan termasuk famili *Micrococcaceae*. *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 2. Klasifikasi *S. aureus* menurut (Mazni, 2008), adalah sebagai berikut:

Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteryales
Suku	: Mycrococcaceae
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2. *Staphylococcus aureus*

(Sumber : Mazni, 2008)

Menurut (Sari *et al.*, 2009), bakteri gram positif seperti *S. aureus* memiliki dinding sel yang sederhana sehingga sensitif terhadap antibakteri yang mempunyai target penghambatan dinding sebagai antibakteri akan mengganggu sintesa peptidoglikan sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Keadaan ini akan menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri menjadi mati. Lebih lanjut (Fahriya, 2009), menjelaskan mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba berhubungan dengan kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesin sel

mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel. Tanin yang mempunyai target pada polipeptida dinding sel akan menyebabkan kerusakan pada dinding sel, karena tanin merupakan senyawa fenol. Pada perusakan membran sel, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipid akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel, akibatnya membran bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan kematian.

2.6 Identifikasi Senyawa Bioaktif

2.6.1 Uji *Well Diffusion* (Difusi Sumuran)

Prosedur difusi sumuran yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Metode sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Menurut (Kusmayati *et al.*, 2007), setelah diinkubasi pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang.

2.6.2 *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Penentuan konsentrasi minimum penghambatan (MIC = *Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan metode (Kubo, 1992 dalam Ramadanti, 2008) pada konsentrasi 0-1,55 mg/mL. Ekstrak dicampur dengan kultur bakteri uji dalam inkubator goyang dengan kecepatan 150 rpm selama 24

jam. Total mikroba dihitung dengan metode hitungan cawan. Nilai MIC yaitu konsentrasi minimum ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji sebanyak 90% selama 24 jam, sedangkan konsentrasi minimum bunuh (MBC = *Minimum Bactericidal Concentration*) merupakan konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri uji (Ramadanti, 2008).

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

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

2.6.3 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

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

jumlah pertumbuhan koloninya sebesar 342 (>44 koloni) atau dengan kata lain pertumbuhan koloninya >0,1% dari jumlah inokulum awal (Ayuningtyas, 2009).

Untuk menentukan nilai KBM dilakukan uji lanjutan, yaitu terhadap semua tabung yang digunakan dalam KHM yang tidak menunjukkan kekeruhan apapun terhadap bakteri, dengan cara mengambil 0,2 mL dari suspensi yang menunjukkan KHM tersebut, lalu ditambahkan kedalam tabung reaksi berisi 5 ml media NB steril. Tabung reaksi diinkubasi selama 12-18 jam pada suhu 37°C dalam inkubator, selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi (OD) dengan spektrofotometer UV-Vis ($\lambda = 480 \text{ nm}$). Apabila hasil pengukuran menunjukkan konsentrasi terendah ekstrak mempunyai OD adalah 0 (tidak ada kekeruhan), maka didapatkan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) atau *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Rinawati, 2007).

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

2.6.4 Uji Fitokimia

Senyawa fitokimia memberikan aroma khas, rasa dan warna tertentu bagi tanaman dalam berintegrasi dengan lingkungan. Fitokimia mempunyai pengaruh biologis sebagai antioksidan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, menurunkan kolesterol, menurunkan kadar glukosa darah, bersifat antibiotik dan menimbulkan pengaruh peningkatan kekebalan tubuh. Fitokimia yang telah diketahui adalah sekitar 30.000 jenis dan sebanyak 5.000-10.000 jenis terdapat dalam bahan pangan serta hampir 400.000 jenis tanaman mengandung fitokimia (Andriana, 2009).

Fitokimia yang merupakan hasil metabolit sekunder tumbuhan digolongkan menjadi alkaloid, antrakuinon, kumarin, minyak esensial (sebagian terpenoid dan fenilpropanoid), flavonoid, steroid dan terpenoid (Ciptaningsih, 2012). Menurut (Peoleongan *et al.*, 2006), senyawa bioaktif seperti fenol merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antimikroba, dengan mekanisme penghambatan mikroba sebagai berikut: (1) merusak dinding sel sehingga mengakibatkan lisis atau menghambat proses pembentukan dinding sel pada sel yang sedang tumbuh; (2) mengubah permeabilitas membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran nutrisi dari dalam sel; (3) mendenaturasi protein sel; (4) merusak sistem metabolisme di dalam sel dengan cara menghambat kerja enzim intraseluler. Menurut (Anam *et al.*, 2014), senyawa fitokimia yang digunakan untuk skrining senyawa fitokimia dalam mikroalga adalah uji alkaloid, fenolik, steroid dan triterpenoid, flavonoid, dan saponin. Di bawah ini akan dijelaskan lebih lanjut mengenai senyawa-senyawa fitokimia tersebut.

2.6.5 Uji LC - MS

Metode LC-MS telah banyak digunakan sebagai metode pemisahan dan identifikasi bagi kebanyakan senyawa obat/organik. Metode ini sangat sensitif dan selektif dibandingkan metode deteksi dengan sinar UV biasa. Setelah pemisahan analit pada kolom HPLC, analit akan masuk ke detektor massa. Didalam detektor ini, analit akan mengalami ionisasi menjadi ion dalam fase gas. Ion-ion tersebut akan terpisah berdasarkan rasio *mass to charge* (m/z) dan akan terdeteksi berdasarkan kelimpahan masing-masing ion (Purwanto, 2011).

Salah satu metode ionisasi dalam spektrometer massa adalah *electrospray* (ESI). Prinsip kerja metode ini adalah terbentuknya droplet campuran pelarut (fase gerak HPLC) dan analit yang bermuatan listrik karena dilewatkan melalui celah sempit yang berpotensi listrik tinggi (4-5 kV). Metode

pengionan dengan ESI adalah metode yang lunak karena hanya menghasilkan sedikit fragmentasi analit dan proses dapat dilakukan pada tekanan atmosfer. Metode ESI dapat menggunakan pilihan pengionan positif atau negatif. Pengionan positif akan membuat analit menjadi terprotonasi atau menjadi kation, sedangkan pengionan negatif akan membuat analit menjadi anion atau mengalami deprotonasi. Kation-kation yang sering terbentuk dalam metode ESI adalah ion pseudomolekul hasil adisi antara analit dengan proton (H^+). Oleh karena itu, nilai m/z dalam spektra akan sering bernilai $(M+H)^+$ atau $(2M+H)^+$, dengan M adalah bobot molekul analit (Purwanto, 2011).

Menurut (Purwanto, 2011), cara menganalisis suatu ekstrak aktif dengan menggunakan alat LC-MS yaitu dibuat ekstrak etil asetat miselia fungi *E* dengan kadar 1 mg/mL dalam pelarut metanol p.a. Injeksikan 20 μ L larutan tersebut ke dalam LC-MS dengan sistem fase gerak metanol : akuades (9:1); kolom RP-18, laju alir fase gerak 1 mL/menit, detektor ESI-MS positive ion mode. Sistem elusi yang digunakan adalah isokratik pada suhu ruangan. Menurut (Ginting, 2012), menambahkan bahwa analisis kinerja alat LC-MS ada dua komponen kunci dalam proses ini yaitu sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion, dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan.