

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

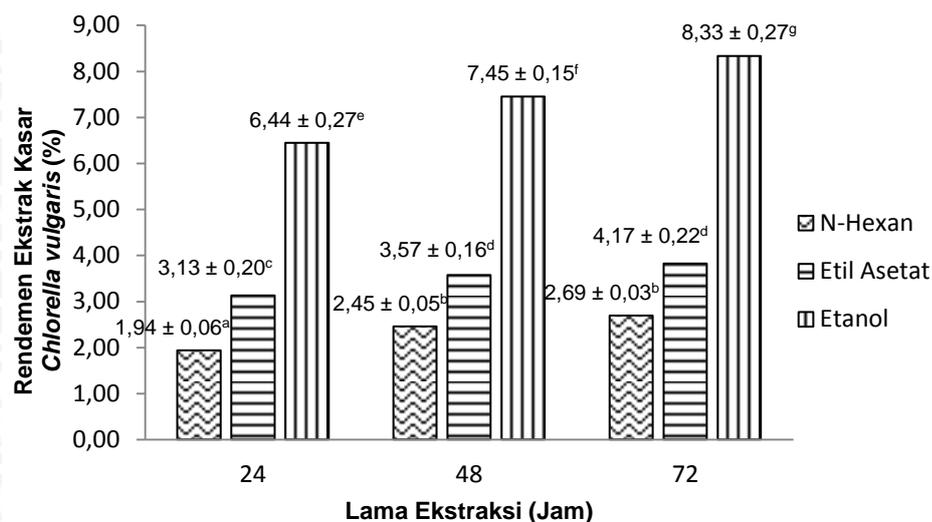
4.1 Hasil Penelitian Tahap Pertama

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

4.1.1 Rendemen Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Rendemen merupakan persentase total ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dihasilkan dibandingkan dengan jumlah bahan baku serbuk mikroalga *Chlorella vulgaris* yang digunakan. Tujuan perhitungan rendemen yaitu untuk mengetahui persentase ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* yang dihasilkan. Menurut Gasemzadeh (2011), rendemen suatu ekstrak dipengaruhi oleh beberapa hal seperti metode ekstraksi yang dipilih, pelarut yang digunakan, rasio pelarut, lama ekstraksi, suhu, dan berbagai faktor lainnya.

Hasil ANOVA (Lampiran 1) menyatakan bahwa jenis pelarut, lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rendemen ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut (Lampiran 1) dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Rendemen ekstrak kasar *Chlorella vulgaris*

Berdasarkan Gambar 7. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata terhadap pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 24 jam dan berbeda nyata pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam. Pada perlakuan pelarut N-Heksan 48 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam dan berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam. Pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam, serta berbeda nyata pada perlakuan pelarut etanol dengan lama waktu 72 jam.

Rendemen ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terendah didapat pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 Jam yaitu sebesar 1,94% dan rendemen tertinggi terdapat pada perlakuan menggunakan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 jam sebesar 8,33%. Pada pelarut etanol terjadi peningkatan nilai rendemen secara signifikan dibanding pelarut lainnya, hal ini disebabkan karena etanol merupakan jenis pelarut polar yang memungkinkan memiliki nilai polaritas yang tinggi dan mampu mengekstrak komponen senyawa

didalam sel mikroalga *Chlorella vulgaris* secara optimal dibandingkan dengan pelarut N-heksan dan etil asetat.

Menurut Fidrianny *et al.*, (2012), ekstraksi simplisia umbi ubi jalar ungu dilakukan dengan metode refluks menggunakan tiga pelarut yang kepolarannya berbeda yaitu n-heksana, etil asetat, dan etanol. Bobot jenis ekstrak n-heksana adalah 1,18 g/mL, ekstrak etil asetat 1,36 g/mL, dan ekstrak etanol 1,59 g/mL. Ditambahkan oleh Fitriani (2008), ekstrak polar yang merupakan ekstraksi dengan pelarut etanol memberikan rendemen yang paling tinggi (etanol 7,34%) dibandingkan ekstrak nonpolar (heksana 0,84%) dan ekstrak semipolar (etil asetat 0,95%). Tingginya rendemen pada ekstrak etanol selain karena adanya komponen fitokimia yang bersifat polar yang larut pada etanol.

Pelarut etanol 96% merupakan salah satu pelarut terbaik dalam ekstraksi yang dapat mengekstrak sebagian besar komponen sel mikroalga termasuk komponen gula, asam amino, garam, protein hidrofobik, dan pigmen (Belarbi *et al.*, 2003). Selain itu etanol memiliki nilai polaritas yang sesuai untuk mengekstrak sebagian besar komponen dalam sel mikroalga *Chlorella vulgaris*.

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

dengan komponen lain, seperti asam-asam lemak, pigmen, dan vitamin (Sa'id, 1987).

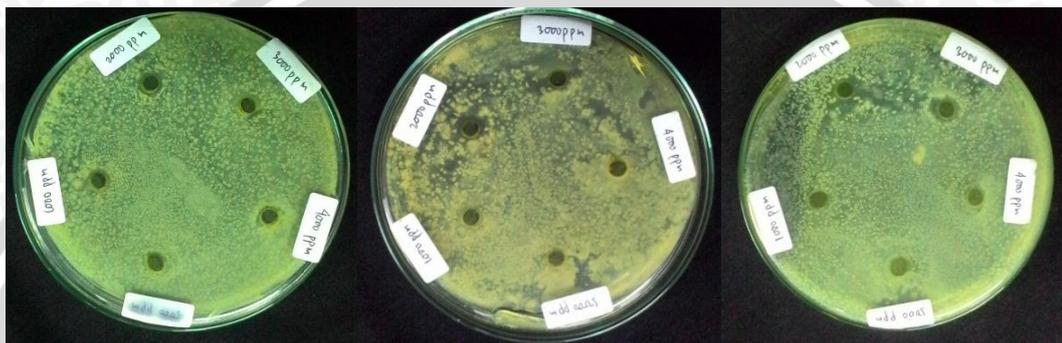
Pelarut N-heksan merupakan salah satu pelarut yang baik untuk mengekstraksi senyawa-senyawa yang bersifat non-polar karena memiliki beberapa keunggulan, diantaranya karena pelarut ini bersifat relatif stabil, mudah menguap serta selektif dalam melarutkan zat (Deky, 2013). Pelarut non polar misalnya heksana mampu mengekstrak hidrokarbon, asam lemak, asetogenin, dan terpen. Pelarut semi polar misalnya etil asetat mampu mengekstrak senyawa fenol dan terpenoid. Pelarut polar misalnya metanol mampu mengekstrak senyawa alkaloid kuartener, komponen fenolik, karotenoid, dan tanin (Harborne, 1987). Ditambahkan oleh Nuryoto (2008), etil asetat merupakan senyawa yang dihasilkan dari pertukaran gugus hidroksil pada asam karboksilat dengan gugus hidrokarbon yang terdapat pada etanol.

Waktu mempengaruhi rendemen sebab semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka bahan yang terekstrak semakin meningkat pula, namun dengan rasio tertentu antara bahan dan pelarut yang digunakan dapat menciptakan kondisi larutan yang jenuh sehingga penambahan waktu ekstraksi juga tidak memberikan efek peningkatan rendemen (Spigno dan Favero, 2007).

4.1.2 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar Mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

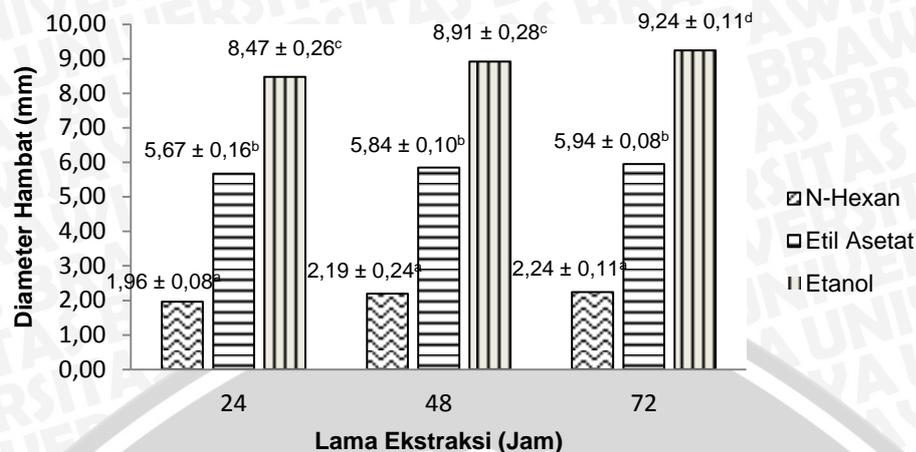
Aktivitas antimikroba ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening pada cawan yang telah ditumbuhi bakteri *Staphylococcus aureus*. Setiap ekstrak dari masing-masing perlakuan menunjukkan diameter hambat yang berbeda. Ekstrak yang ditambahkan pada lubang sumuran adalah 20 μL untuk bakteri. Hasil diameter hambat dari ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan pelarut yang sama menunjukkan peningkatan seiring dengan pemberian perlakuan lama

ekstraksi berbeda. Semakin lama waktu ekstraksi yang diberikan maka senyawa bioaktif yang berperan dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* juga akan meningkat. Selain itu, tiap mikroorganisme juga menunjukkan respon antimikroba yang berbeda untuk tiap ekstrak dengan perlakuan yang sama. Hasil diameter hambat ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Hasil diameter hambat ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* konsentrasi 1000 ppm, 2000 ppm, 3000 ppm, 4000 ppm, dan 5000 ppm

Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan, nilai rata-rata diameter hambat ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* didapatkan hasil sebesar 1,96 mm – 9,24 mm. Hasil ANOVA (Lampiran 3) menyatakan bahwa jenis pelarut, lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata pada aktivitas antibakteri ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut (Lampiran 3) dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diameter hambatan ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 9. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata terhadap pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 48 jam dan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 48 jam berbeda nyata dengan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam dan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam. Pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam berbeda nyata dengan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam dan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 48 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam dan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam dan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 24 jam. Perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 24 jam dan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam. Pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etanol

dengan lama ekstraksi 48 jam dan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 jam. Perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam berbeda nyata dengan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 jam dan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam. Perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 jam berbeda nyata dengan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam dan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam.

Ekstrak kasar antimikroba dari mikroalga *Chlorella vulgaris* menunjukkan hasil yang positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak kasar antimikroba dengan pelarut N-Heksan, etil asetat, dan etanol memiliki diameter hambat yang berbeda-beda terhadap bakteri tersebut. Perlakuan tersebut pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 jam mendapatkan diameter hambat terbesar yaitu 9,24 mm. Aktivitas antibakteri diamati sebagai zona hambatan (mm) yang disebabkan oleh ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan pelarut N-heksan, etil asetat, dan etanol terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini dapat diamati dari timbulnya zona bening disekitar lubang sumuran. Zona bening disekitar lubang sumuran menandakan bahwa tidak adanya bakteri yang mampu tumbuh setelah diinkubasi dikarenakan adanya senyawa antibakteri pada daerah tersebut. Namun demikian, penggunaan pelarut yang berbeda untuk mengekstrak senyawa antibakteri pada mikroalga *Chlorella vulgaris* memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap diameter hambat yang timbul disekitar lubang sumuran.

Perbedaan diameter hambat yang dihasilkan dipengaruhi oleh kemampuan mikroorganisme dalam merespon senyawa antimikroba yang diberikan. Ketahanan tiap mikroorganisme yang berbeda ini disebabkan oleh morfologi atau sifat fisiologis dari masing-masing mikroorganisme tersebut

berbeda (Widayanti, 2012). Ekstraksi senyawa aktif dari mikroalga *Clorella* sp. dengan menggunakan pelarut bertujuan untuk memperoleh hasil yang optimal baik jumlah ekstrak maupun senyawa aktif yang dikandung ekstrak. Dalam ekstraksi senyawa antibakteri *Clorella* sp. diperlukan waktu ekstraksi yang tepat agar diperoleh zat aktif dengan rendemen yang besar dan mempunyai aktivitas yang baik untuk menghentikan pertumbuhan bakteri patogen maupun bakteri penyebab kerusakan pangan (Wenno *et al.*, 2010).

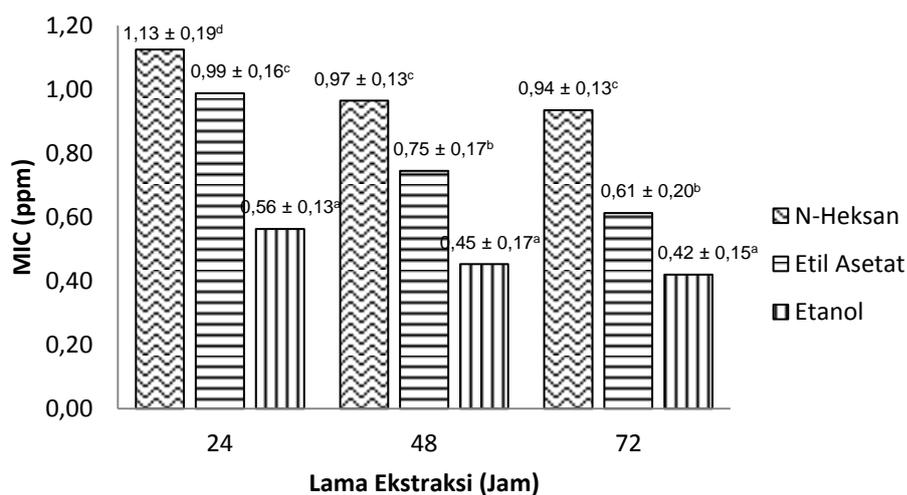
Menurut Adolf *et al.*, (2006), standar diameter zona hambat yang dapat dikatakan efektif menghambat adalah yang memiliki diameter > 11 mm, dikatakan intermediete jika memiliki diameter zona hambat 9-11 mm, dan dikatakan tidak efektif menghambat jika memiliki diameter zona hambat < 9 mm. Jika dibandingkan dengan standar tersebut maka ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan pelarut etanol dan perlakuan lama waktu 72 jam cukup efektif menghambat pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan untuk pelarut N-Heksan dan etil asetat dengan perlakuan 24, 48, dan 72 jam bisa dikatakan tidak efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* karena memiliki diameter zona hambat ≤ 9 mm. Dengan demikian dilakukan pencarian nilai MIC dan MBC untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat dan membunuh aktivitas pertumbuhan dari bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.1.3 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*) Tahap Pertama

Uji MIC dan MBC tahap pertama dilakukan dengan menggunakan berbagai macam dosis ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat atau membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. 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 (Fitrial *et al.*, 2008). Uji MIC dan MBC menggunakan konsentrasi 5000 ppm. Pemberian konsentrasi 5000 ppm ini dinilai tepat, karena dari berbagai konsentrasi yang telah diterapkan konsentrasi 5000 ppm adalah konsentrasi yang mampu mendapatkan nilai MIC dan MIB sesuai.

Hasil ANOVA (Lampiran 7) menyatakan bahwa jenis pelarut, lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata pada uji MIC ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut (Lampiran 7) dapat dilihat pada Gambar 10.



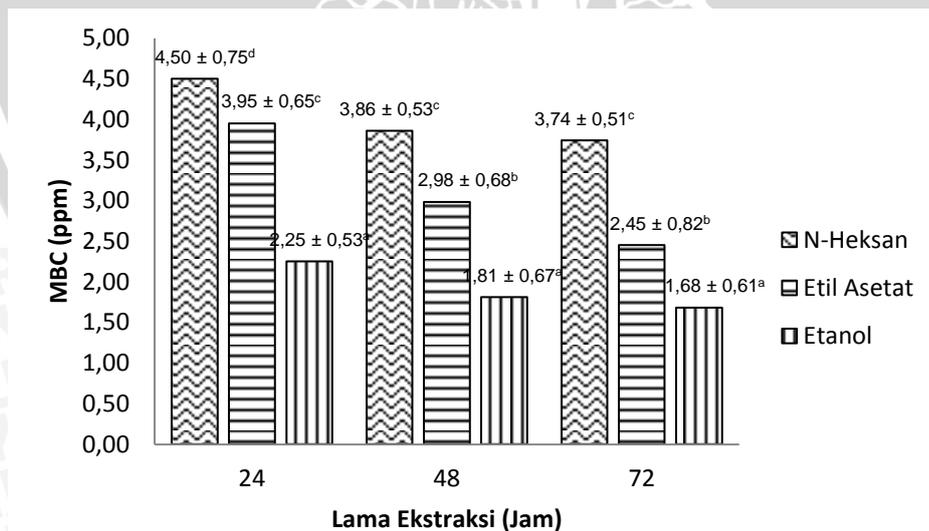
Gambar 10. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 10. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata terhadap pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat 24 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata dengan

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

MIC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terbaik didapat pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 0,42 ppm dan MIC terendah terdapat pada perlakuan menggunakan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 Jam yaitu sebesar 1,13 ppm. Adapun yang dimaksud dari MIC itu sendiri adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Jadi, semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri semakin baik, namun jika nilai MIC semakin tinggi maka konsentrasi untuk menghambat pertumbuhan bakteri semakin rendah.

Hasil ANOVA (Lampiran 8) menyatakan bahwa jenis pelarut, lama ekstraksi dan interaksi jenis pelarut dengan lama ekstraksi berpengaruh nyata pada uji MBC ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut (Lampiran 8) dapat dilihat pada Gambar 11.



Gambar 11. MBC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Staphylococcus aureus*

Berdasarkan Gambar 11. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 jam tidak berbeda nyata terhadap pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 48 jam, namun berbeda nyata pada perlakuan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etil asetat 24 jam berbeda nyata dengan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etil asetat dengan lama ekstraksi 72 jam. Pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 24 jam berbeda nyata dengan perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 48 jam, namun tidak berbeda nyata pada perlakuan lama ekstraksi 72 jam.

MBC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terbaik didapat pada perlakuan pelarut etanol dengan lama ekstraksi 72 Jam yaitu sebesar 1,68 ppm dan MBC terendah terdapat pada perlakuan menggunakan pelarut N-Heksan dengan lama ekstraksi 24 Jam yaitu sebesar 4,50 ppm. Dari hasil nilai MIC dan MBC tersebut memungkinkan karena mekanisme kerja dari kandungan ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dalam penghambatan pertumbuhan bakteri mungkin melalui merusak permeabilitas membran sel. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kebocoran sehingga komponen-komponen penting didalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain dapat mengalir keluar. Hal ini menyebabkan permeabilitas sel terganggu sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup dan pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Konsentrasi efektif adalah konsentrasi terendah yang mampu menghambat terhadap pertumbuhan bakteri sebesar 50% atau lebih dari jumlah koloni bakteri tersebut. Menurut Fatisa (2013), KHM yang menunjukkan senyawa bakteriostatik dari ekstrak etanol kulit buah pulasan melawan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 2,43 mg/mL, akan tetapi dibandingkan ekstrak lain, ekstrak ini memberikan nilai KBM terbesar yaitu 156,13 mg/mL. Ditambahkan oleh Setyarini

dan krisnansari (2011), MIC 50 adalah konsentrasi dari antimikroba $\geq 50\%$ yang dapat menghambat mikroorganisme. MIC merupakan kadar terendah obat-obat antibiotik dan obat-obat kimia yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bakteriostatik adalah kemampuan menghambat perkembangbiakan bakteri sedangkan bakterisidal memiliki sifat mematikan bakteri.

4.1.4 Uji Kualitatif Fitokimia

Uji kualitatif fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa bioaktif yang terdapat pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dengan pelarut etanol. Kandungan fitokimia yang diuji adalah alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, saponin, dan fenol. Hasil pengujian kandungan fitokimia yang terdapat pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kandungan fitokimia ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*

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

Sumber: Data Olahan

Keterangan:

- : Negatif
- + : Positif

Pada Tabel 3. memperlihatkan bahwa pada ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan fenol. Uji senyawa alkaloid ditunjukkan dengan pereaksi Mayer terbentuk warna putih, pereaksi Wagner terbentuk warna coklat dan pereaksi Dragendorf terbentuk warna jingga. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antimikroba diduga dengan cara mengganggu komponen penyusun

peptidoglikan pada sel mikroba, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Bowo *et al.*, 2009).

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

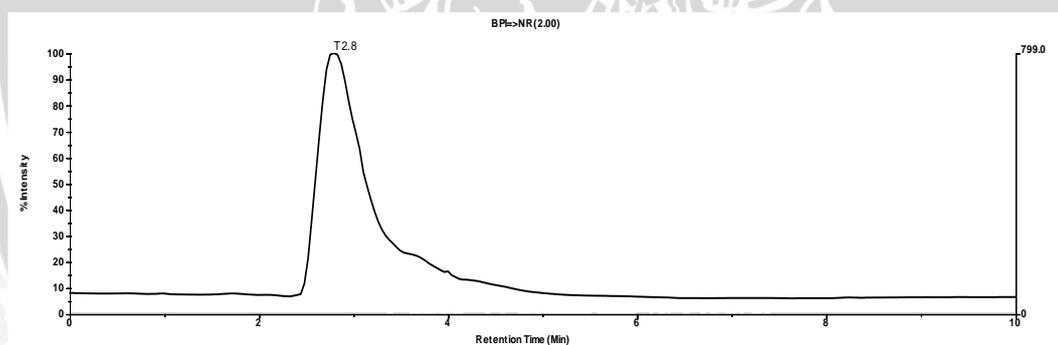
Uji steroid menunjukkan bahwa sampel ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa steroid dengan terbentuknya warna hijau bening. Menurut Morin dan Gorman (1995), senyawa steroid memiliki struktur lipofilik yaitu senyawa yang larut dalam lemak. Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel mikroba yang bersifat permeabel terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun, morfologi membran berubah, dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel mikroba rapuh dan lisis. Akibat lisis dari membran sel, senyawa yang terdapat dalam sitoplasma (seperti: inti sel, mesosom, protein dan lain-lain) akan keluar sehingga mengakibatkan kematian bakteri.

Uji fenol menunjukkan bahwa sampel ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* mengandung senyawa dengan terbentuknya warna hijau kebiruan. Fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau 2 gugus hidroksil. Fenol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida atau terdapat dalam vakuola sel. Senyawa fenol diduga mempunyai aktifitas antioksidan, antitumor, antirival, dan antibiotik (Harborne, 2006). Flavonoid berupa senyawa fenol, oleh karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau amoniak. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba adalah membentuk senyawa kompleks dengan

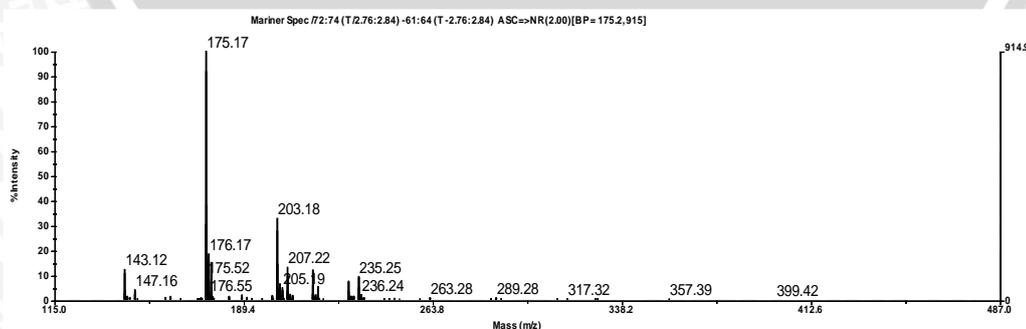
protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel mikroba dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria *et al.*, 2009).

4.1.5 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LC-MS

Uji LCMS – ESI (*Electrospray Ionization*) ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang Selatan. Pengujian LC-MS bertujuan untuk mengidentifikasi berat molekul senyawa bioaktif pada mikroalga *Chlorella vulgaris*. Hasil pengujian LC-MS menunjukkan retensi waktu yang diperoleh yaitu pada menit ke 2,8. Senyawa yang diidentifikasi dari retensi waktu tersebut menghasilkan satu puncak tertinggi yaitu pada *centroid mass* 175,17 dengan *relative intensity* 100. Analisis senyawa antibakteri dengan metode uji LC-MS (Lampiran 11) dapat dilihat pada Gambar 12 dan 13.



Gambar 12. Hasil kromatograf LC (*Liquid Chromatography*) ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*



Gambar 13. Hasil kromatograf MS (*Mass Spectrometry*) ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*

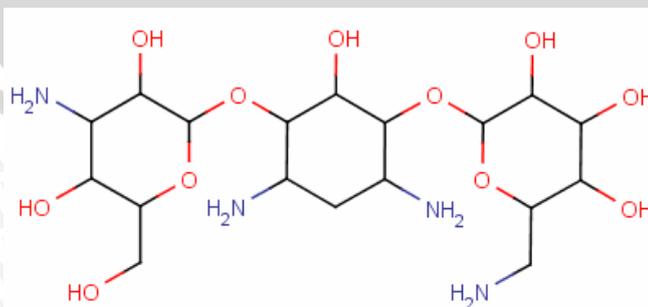
Uji LC-MS ini menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (MeOH). Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^{n+}$. Dugaan senyawa didapatkan dari massa ion ditambahkan muatan pelarut yang digunakan. Kemudian, dilihat pada web *mass bank* (www.massbank.jp) dan dimasukkan semua mass ion yang didapatkan sehingga akan muncul senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*. Hasil penambahan ion pada uji LC-MS ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang berfungsi sebagai senyawa antibakteri dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Dugaan pecahan ion molekul ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris*

Parameter Uji	Hasil Pengujian
Waktu Retensi	2,8
Massa Ion (m/z)	176,17
Dugaan Senyawa	Kanamycin
Rumus Molekul	$C_{18}H_{36}N_4O_{11}$

Sumber: Data Olahan

Dari Gambar 12 dan 13. hasil LC-MS tersebut terdapat satu puncak tertinggi yaitu pada *centroid mass* 175,17. Senyawa yang terdeteksi menggunakan LC-MS dari ekstrak kasar etanol 72 jam mikroalga *Chlorella vulgaris* pada *retensi time* 2,8 terdapat pecahan senyawa yang berfungsi sebagai antibakteri yaitu Kanamycin. Struktur molekul dari kanamycin dapat dilihat pada Gambar 14.



Gambar 14. Struktur molekul Kanamycin

Kanamycin merupakan antibiotik yang termasuk dalam golongan aminoglikosida yang bekerja menghambat proses sintesis protein mikroorganisme, dan termasuk golongan antibiotika berspektrum luas, sehingga dapat berinteraksi dengan bakteri Gram negatif maupun Gram positif. Kanamycin ditemukan pertama kali di Jepang pada tahun 1957 oleh Umezawa dkk, diperoleh dari filtrat kultur *Streptomyces kanamyceticus*. Kanamycin digunakan untuk pengobatan infeksi jika penisilin ataupun obat lain yang kurang kuat aktivitas antibakterinya tidak dapat digunakan. Adapun infeksi yang biasanya diobati menggunakan kanamycin adalah infeksi pada saluran pernafasan, kulit, jaringan lunak, perut, dan infeksi pada saluran kemih (Widyasari *et al.*, 2013).

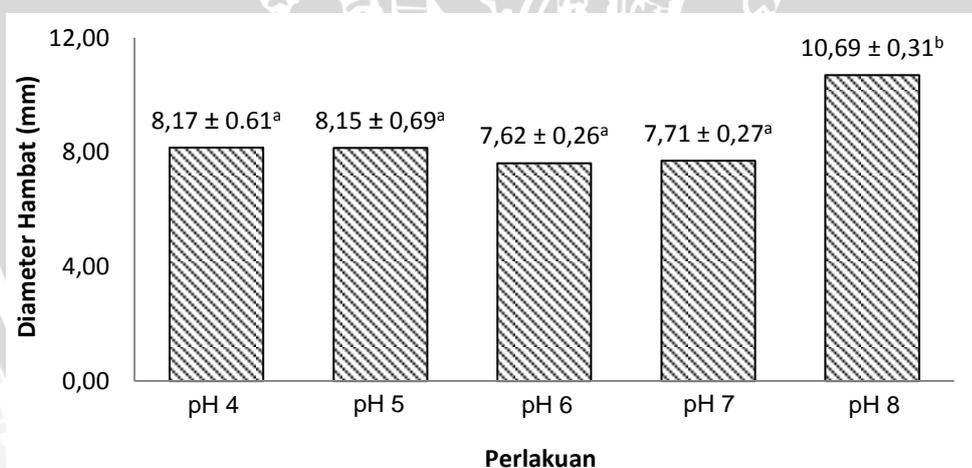
4.2 Hasil Penelitian Tahap Kedua

4.2.1 Uji Pengaruh pH terhadap Diameter Hambat

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

Uji pengaruh pH pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* dilakukan dengan rentang pH 4 sampai 8. Hal ini bertujuan untuk melihat pertumbuhan bakteri dalam menghasilkan senyawa antimikroba bakteriosin yang lebih banyak sehingga lebih efektif dalam menghambat bakteri patogen yang dapat dilihat dari luas zona bening yang dihasilkan, karena pH adalah salah satu faktor penting dalam mempengaruhi pertumbuhan bakteri dan kemampuannya dalam menghasilkan senyawa antibakteri.

Hasil ANOVA (Lampiran 12) menunjukkan bahwa perlakuan pH dan konsentrasi yang diberikan memberikan pengaruh nyata pada parameter diameter hambat ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* konsentrasi 5000 ppm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut pH dengan BNT (Lampiran 12) dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Diameter hambat ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* konsentrasi 5000 ppm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH

Berdasarkan Gambar 15. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pH 4 berbeda nyata terhadap pH 8 dan tidak berbeda nyata pada pH 5, 6, dan 7. Pada perlakuan pH 5 berbeda nyata dengan pH 8 dan tidak berbeda nyata pada pH 4, 6, dan 7. Pada perlakuan pH 6 berbeda

nyata dengan pH 8 dan tidak berbeda nyata pada pH 4, 5, dan 7. Pada perlakuan pH 7 berbeda nyata dengan pH 8 dan tidak berbeda nyata pada pH 4, 5, dan 6. Serta pada perlakuan pH 8 berbeda nyata terhadap pH 4, 5, 6, dan 7.

Ekstrak kasar antibakteri dari mikroalga *Chlorella vulgaris* menunjukkan hasil yang positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak kasar antibakteri dengan pelarut etanol memiliki diameter hambat yang berbeda-beda terhadap bakteri pada setiap pH. Dari perlakuan tersebut pelarut etanol pada pH 8 mendapatkan diameter hambat terbesar yaitu 10,69 mm. Dari hasil penelitian, diketahui bahwa ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini dapat diamati dari timbulnya zona bening disekitar lubang sumuran. Zona bening disekitar lubang sumuran menandakan bahwa tidak adanya bakteri yang mampu tumbuh setelah diinkubasi dikarenakan adanya senyawa antibakteri pada daerah tersebut. Namun demikian, penggunaan pH yang berbeda untuk mengekstrak senyawa antibakteri pada mikroalga *Chlorella vulgaris* memberikan pengaruh yang berbeda pula terhadap zona hambat atau zona bening yang timbul disekitar lubang sumuran.

Penelitian ini menggunakan konsentrasi 5000 ppm karena pada konsentrasi tersebut efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Penggunaan konsentrasi 5000 ppm ini lebih efektif karena diameter hambat yang dihasilkan oleh ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* lebih terlihat daripada konsentrasi lainnya yang telah diberikan. Ditambahkan oleh Kusmiyati dan Agustini (2007), zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi 10.000 bpj lebih besar dibandingkan dengan 8.000, 7.000 dan 6.000 bpj. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak, semakin besar diameter hambat yang dihasilkan karena pada konsentrasi yang besar, semakin tinggi aktivitas senyawa antibakteri.

Diameter hambat ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH 8 memiliki diameter hambat yang paling tinggi dibandingkan dengan perlakuan pH yang lain dengan nilai rerata 10,69 mm. Hal ini menandakan bahwa pH 8 adalah pH yang efektif dan stabil untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* sesuai dengan hasil penelitian dari Delfahedah *et al.*, (2013), *Staphylococcus aureus* optimum pada 37°C dengan pH 6. Ditambahkan oleh Ristiati (2005), pH optimum untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah pada kisaran pH 6,4. *Staphylococcus aureus* meskipun mempunyai optimum pH 6-7, tetapi range pH pertumbuhannya sangat luas yaitu berkisar antara 4-10. Artinya pada sekitar pH 4,0 yang merupakan pH minimum *Staphylococcus aureus* masih dimungkinkan untuk bertahan hidup (Widowati *et al.*, 2014).

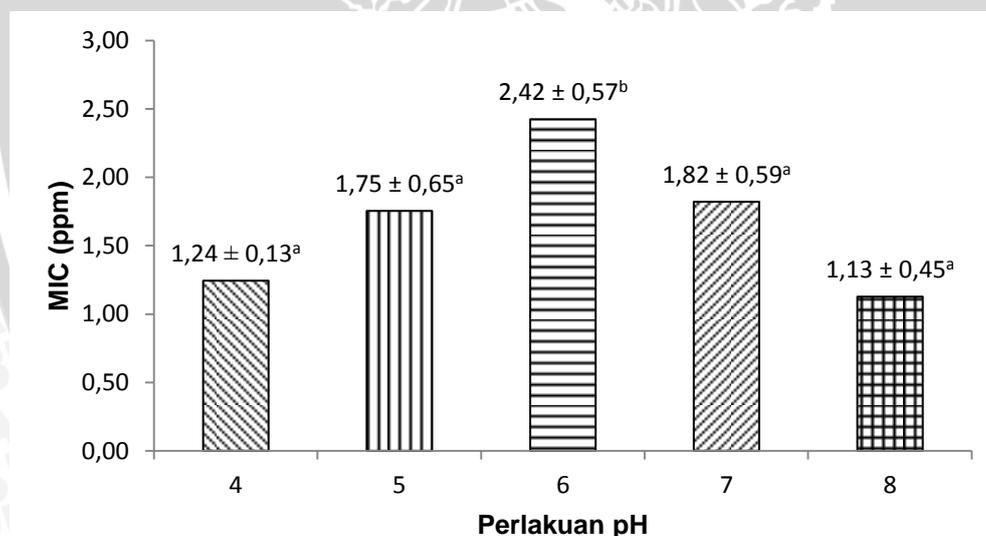
Menurut Dewi (2010), melaporkan bahwa ketentuan kekuatan daya antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih termasuk sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm kategori kuat, daerah hambatan 5-10 mm kategori sedang, dan daerah hambatan 5 mm atau kurang termasuk kategori lemah. Dengan kata lain, ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* mempunyai daya antibakteri yang kuat yaitu sebesar 10,69 mm. Dengan demikian dilakukan pencarian nilai MIC dan MBC untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

4.2.2 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum Bacteriocidal Concentration*) Tahap Kedua

Uji MIC dan MBC tahap kedua dilakukan dengan menggunakan konsentrasi ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terbaik pada tahap pertama yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat atau membunuh bakteri *Staphylococcus aureus*. Perhitungan nilai

MIC dan MBC tahap kedua ini nilai MIC dan MBC didasarkan pada penggunaan pH optimum pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* untuk mengetahui pH ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang terbaik dalam uji stabilitas antibakteri. Perlakuan pH pada ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* yang digunakan dalam pengujian MIC dan MBC adalah pH 6. Menurut Kristiani (2005), *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada suhu 6 sampai 46°C, rentang pH 4,2 – 9,3 dan nilai Aw (*water activity*) antara 0,83 dan 0,99.

Hasil ANOVA (Lampiran 18) menunjukkan bahwa perlakuan pH dan konsentrasi yang diberikan memberikan pengaruh nyata pada parameter MIC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut MIC dengan BNT (Lampiran 18) dapat dilihat pada Gambar 16.



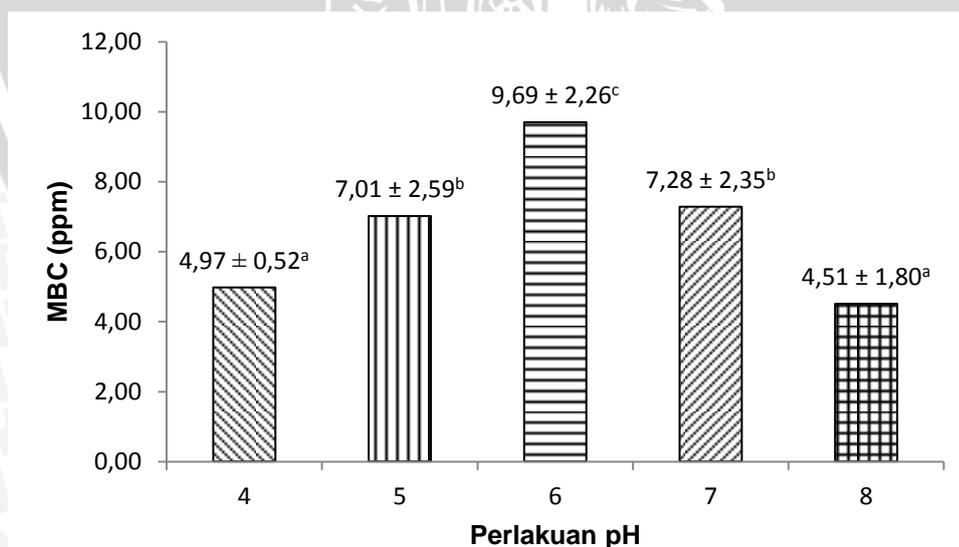
Gambar 16. MIC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH

Berdasarkan Gambar 16. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pH 4, 5, 7, dan 8 tidak berbeda nyata. Namun, pada pH 6 berbeda nyata terhadap pH 4, 5, 7, dan 8. Penentuan nilai MIC didasarkan pada nilai konsentrasi terendah yang didapat pada perlakuan pH terhadap

Staphylococcus aureus. Dengan kata lain, pada pH 8 mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* karena pada pH ini didapat nilai MBC terkecil yaitu sebesar 1,13 ppm.

MIC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terbaik didapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 1,13 ppm dan MIC terendah terdapat pada perlakuan pH 6 yaitu sebesar 2,42 ppm. Adapun yang dimaksud dari MIC itu sendiri adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Jadi, semakin kecil nilai MIC maka bisa dikatakan konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan bakteri semakin baik.

MBC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH ditahap kedua ini berkisar antara 4,51 ppm hingga 9,69 ppm. Hasil ANOVA (Lampiran 19) menunjukkan bahwa perlakuan pH dan konsentrasi yang diberikan memberikan pengaruh nyata pada parameter MBC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH ($p < 0,05$). Hasil uji lanjut MBC dengan BNT (Lampiran 19) dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 17. MBC ekstrak kasar *Chlorella vulgaris* terhadap *Staphylococcus aureus* dengan perlakuan pH

Berdasarkan Gambar 17. dapat dilihat hasil yang berbeda pada setiap perlakuan. Perlakuan pH 4 dan 8 tidak berbeda nyata. Tetapi berbeda nyata terhadap perlakuan pH 5, 6, dan 7. Pada perlakuan pH 5 dan 7 tidak berbeda nyata. Namun, berbeda nyata terhadap perlakuan pH 4, 6, dan 8. Pada perlakuan pH 6 berbeda nyata terhadap semua perlakuan pH yang diberikan yaitu pH 4, 5, 7, dan 8.

MBC ekstrak kasar mikroalga *Chlorella vulgaris* terbaik didapat pada perlakuan pH 8 yaitu sebesar 4,51 ppm dan MBC terendah terdapat pada perlakuan pH 6 yaitu sebesar 9,69 ppm. Dari hasil nilai MIC dan MBC tersebut memungkinkan karena mekanisme kerja dari kandungan ekstrak mikroalga *Chlorella vulgaris* dalam penghambatan pertumbuhan bakteri mungkin melalui rusaknya permeabilitas membran sel. Kerusakan membran sel dapat menyebabkan kebocoran sehingga komponen-komponen penting didalam sel seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain dapat mengalir keluar. Hal ini menyebabkan permeabilitas sel terganggu sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup dan pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Konsentrasi efektif adalah konsentrasi terendah yang mampu menghambat terhadap pertumbuhan bakteri sebesar 50% atau lebih dari jumlah koloni bakteri tersebut. Menurut Fatisa (2013), KHM yang menunjukkan senyawa bakteriostatik dari ekstrak etanol kulit buah pulasan melawan bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 2,43 mg/mL, akan tetapi dibandingkan ekstrak lain, ekstrak ini memberikan nilai KBM terbesar yaitu 156,13 mg/mL. Ditambahkan oleh Setyarini dan krisnansari (2011), MIC 50 adalah konsentrasi dari antimikroba $\geq 50\%$ yang dapat menghambat mikroorganisme. MIC merupakan kadar terendah obat-obat antibiotik dan obat-obat kimia yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Bakteriostatik adalah kemampuan menghambat

perkembangbiakan bakteri sedangkan bakterisidal memiliki sifat mematikan bakteri.

Nilai MIC yang lebih rendah menunjukkan kemampuan antibiotik yang tinggi. Makin rendah MIC, makin bagus aktivitas antibiotiknya. Dari hasil yang telah diperoleh, menunjukkan hasil yang positif, dimana kedua ekstrak memiliki aktivitas antibiotik yang lebih tinggi dibandingkan dengan antibiotik komersial yang telah lama digunakan untuk obat saat ini, walaupun masih dalam bentuk ekstrak campuran (Nurkanto *et al.*, 2010). Ditambahkan oleh Roihanah *et al.*, (2012), ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak mampu membunuh bakteri dan bersifat bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Mekanisme penghambatan dan kerusakan mikroba oleh senyawa antimikroba secara umum disebabkan oleh gangguan pada komponen penyusun sel terutama komponen penyusun dinding sel, reaksi dengan membran sel yang dapat mengakibatkan perubahan permeabilitas dan kehilangan komponen penyusun sel, penghambatan terhadap sintesis protein, dan gangguan fungsi material genetik (Nuraida *et al.*, 2008).