

**UJI EFEK ANTIBAKTERI MIKROALGA *Porphyridium cruentum* TERHADAP
BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

Oleh:

**ARMY AMIRA NAOMI
NIM. 125080101111052**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

**UJI EFEK ANTIBAKTERI MIKROALGA *Porphyridium cruentum* TERHADAP
BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**ARMY AMIRA NAOMI
NIM. 125080101111052**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2017**

SKRIPSI

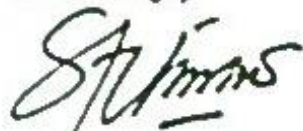
UJI EFEK ANTIBAKTERI MIKROALGA *Porphyridium cruentum* TERHADAP
BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA *IN VITRO*

Oleh:

ARMY AMIRA NAOMI
NIM. 12503010111052

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 9 Januari 2017

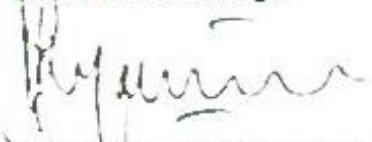
Dosen Penguji



Dr. Y. Umi Zakyah, M.Si
NIP. 19610303 196002 2 001

Tanggal: 20 JAN 2017

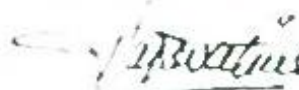
Menyetujui,
Dosen Pembimbing I



Prof. Ir. Yenny Rijani, DEA, Ph.D
NIP. 19610523 193703 2 003

Tanggal: 20 JAN 2017

Dosen Pembimbing II



Ir. Herwati Umi Subarlanti, MS
NIP. 19520402 198003 2 001

Tanggal: 20 JAN 2017

Mengetahui,
Ketua Jurusan



Dr. Ir. Amling Wulung Ekawati, MS
NIP. 19620205 196003 2 001

Tanggal: 20 JAN 2017

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya 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, 2 Januari 2016

Mahasiswa,

Army Amira Naomi
NIM. 125080101111052



UCAPAN TERIMAKASIH

Segala puji bagi Allah SWT yang atas rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyusun skripsi dari tahap awal hingga akhir. Tidak lupa sholawat dan salam penulis junjungkan kepada nabi besar Nabi Muhammad SAW. Berkat beliau umat islam, khususnya penulis dapat merasakan nikmat iman dan islam pada zaman ini. Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya atas terselesaikannya laporan skripsi ini, kepada:

1. Kedua orangtua dan keluarga penulis yang telah mendoakan dan mendukung penulis, baik dari material maupun moral.
2. Ibu Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D selaku dosen pembimbing pertama dan Ibu Ir. Herwati Umi Subarijanti, MS selaku dosen pembimbing kedua yang telah membimbing penulis dalam penyusunan skripsi dari awal hingga akhir.
3. Ibu Dr. Ir. Umi Zakiyah, M.Si selaku dosen penguji yang telah bersedia menguji dan membimbing penulis hingga akhir penyusunan skripsi.
4. Laboran Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya (LSIH UB) dan Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan (KHP), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis selama proses penelitian.
5. Teman – teman penulis yang telah mendukung penulis, yang tidak dapat disebutkan satu persatu.

RINGKASAN

ARMY AMIRA NAOMI. UJI EFEK ANTIBAKTERI MIKROALGA *Porphyridium cruentum* TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA *IN VITRO* (di bawah bimbingan Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph. D dan Ir. Herwati Umi Subarijanti, MS)

Udang merupakan biota yang bernilai ekonomis tinggi di pasar, baik internasional maupun domestik. Salah satu faktor lingkungan yang mengganggu budidaya udang yaitu serangan penyakit akibat *Vibrio harveyi*. Cara yang biasa dipakai untuk menanggulangi penyakit akibat *V. harveyi* salah satunya adalah pemberian antibiotik sintetik. Namun pemberian antibiotik sintetik pada udang akan menimbulkan bahaya bagi tubuh manusia. Penelitian ini membahas tentang pengaruh antibakteri yang berasal dari mikroalga *Porphyridium cruentum*, yang merupakan bahan alami yang dapat dikembangkan menjadi antibakteri untuk *V. harveyi*. Tujuan dari penelitian ini yaitu mengetahui adakah perbedaan zona hambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* akibat paparan konsentrasi ekstrak mikroalga *P. cruentum* yang berbeda, mengetahui konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. Harveyi* dan konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat mematikan bakteri *V. harveyi*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati, Universitas Brawijaya dan Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Agustus – November 2016.

Sebelum penelitian yang sebenarnya dilakukan beberapa kali Uji Pendahuluan dengan perlakuan pemberian konsentrasi Uji Daya Hambat yang berbeda, kemudian perlakuan pemberian hasil ekstrak yang menggunakan metode maserasi (ekstraksi tanpa perlakuan suhu). Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan empat tahap uji. Uji yang pertama yaitu ekstraksi dengan bantuan alat *Microwaved Assisted Extraction* (MAE), Uji kedua merupakan uji Daya Hambat. Uji ketiga yaitu Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Uji yang terakhir merupakan Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Ekstraksi dengan pemakaian alat MAE menggunakan suhu 60°C selama 20 menit. Perbandingan bahan dan pelarut (methanol) yang digunakan yaitu sebesar (1:10). Uji Daya Hambat dilakukan dengan total 6 perlakuan dan 3 kali ulangan. Perlakuannya yaitu pemberian konsentrasi ekstrak *P. cruentum* 250.000 ppm, 300.000 ppm, 350.000 ppm, 400.000 ppm, serta kontrol positif (streptomisin) dan kontrol negatif (DMSO 10%). Uji MIC dilakukan dengan 6 perlakuan yaitu konsentrasi ekstrak *P. cruentum* 250.000 ppm, 300.000 ppm, 350.000 ppm, 400.000 ppm, kontrol positif dan kontrol negatif. Uji MBC dilakukan dengan menggoreskan masing – masing konsentrasi yang digunakan pada uji MIC ke media agar dan dilihat pertumbuhan bakteri.

Pada Uji Pendahuluan diperoleh hasil tidak terdapat zona hambat meski konsentrasi telah dinaikkan dan memakai hasil ekstraksi dengan metode maserasi. Rendemen yang dihasilkan pada metode maserasi didapat sebesar 20,66%. Sementara itu hasil rendemen yang diperoleh dengan alat MAE sebesar 20,20%. Tidak terdapat zona hambat yang terbentuk pada Uji Daya Hambat. Hal tersebut dapat disebabkan karena beberapa faktor yaitu sedikitnya senyawa antibakteri yang terekstrak, konsentrasi yang kurang tinggi, dan sifat serta karakteristik *Vibrio harveyi* yang ganas. Diduga suhu pada saat ekstraksi tidak berpengaruh karena pada penelitian ini dilakukan ekstraksi pada suhu 60°C dan

tanpa perlakuan suhu pada saat maserasi. Sementara itu konsentrasi minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri tidak diketahui karena seluruh media berwarna keruh. Kekeruhan tersebut menandakan bila masih terdapat pertumbuhan bakteri, namun diduga kekeruhan tersebut diakibatkan oleh ekstrak *P. cruentum*. Pada Uji MBC tidak diketahui konsentrasi ekstrak terendah yang dapat mematikan bakteri karena masih terdapat koloni bakteri pada semua perlakuan kecuali pada perlakuan kontrol positif.

Berdasarkan hasil tersebut dapat ditarik kesimpulan apabila tidak ada perbedaan pemberian ekstrak *P. cruentum* terhadap *V. harveyi* antara perlakuan pada penelitian ini karena tidak terdapat zona hambat ada seluruh perlakuan pemberian ekstrak mikroalga *P. cruentum*. Tidak diketahui konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi*, karena seluruh media yang diberi ekstrak *P. cruentum* berwarna keruh. Selain itu tidak diketahui konsentrasi terendah yang dapat mematikan pertumbuhan *V. harveyi*, sehingga ekstrak *P. cruentum* tidak bersifat bakterisidal terhadap *V. harveyi*. Hal tersebut ditunjukkan oleh media yang ditumbuhi oleh koloni bakteri. Agar lebih akurat maka disarankan untuk melakukan perhitungan jumlah bakteri pada uji MIC, sehingga dapat diketahui apakah bakteri terhambat atau tidak, disarankan juga agar memakai mikroalga segar dan pelarut yang kepolarannya berbeda.



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT atas rahmat dan hidayahnya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul **“Uji Efek Antibakteri Mikroalga *Porphyridium cruentum* terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro*”**. Di dalam laporan ini, disajikan pokok-pokok bahasan mengenai proses pembuatan antibakteri yang berasal dari mikroalga *Porphyridium cruentum*, namun hanya sebatas tahapan uji *in vitro*.

Harapan penulis, pembaca dapat memahamami serta dapat mengambil manfaat dari laporan ini. Laporan ini tidak lebih dari hasil karya penulis yang memiliki banyak kekurangan, meskipun penulis telah maksimal dalam mengerjakannya. Kritik dan saran membangun sangat dibutuhkan agar di kemudian hari tulisan yang dibuat lebih baik lagi.

Malang, 16 Januari 2016

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiv
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>Porphyridium cruentum</i>	5
2.2 Bahan Bioaktif <i>Porphyridium cruentum</i>	6
2.3 Karakteristik dan Morfologi <i>Vibrio harveyi</i>	6
2.4 Patogenitas <i>Vibrio harveyi</i>	7
2.5 Ekstraksi	8
2.6 Senyawa Antibakteri	9
2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri	9
2.8 Uji Pendahuluan	11
2.9 Uji Daya Hambat Antibakteri dengan Metode Kertas Cakram	12
2.10 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)	15
2.11 Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	15
III. MATERI DAN METODE PENELITIAN	16
3.1 Materi Penelitian	16
3.2 Alat dan Bahan Penelitian	16
3.3 Bahan Penelitian	17
3.4 Metode Penelitian	18

3.5 Variabel Penelitian	19
3.6 Rancangan Percobaan.....	20
3.7 Persiapan Penelitian.....	21
3.7.1 Pembuatan Media <i>Tryptone Soya Broth</i> (TSB).....	22
3.7.2 Pembuatan Media <i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i> (TCBS-Agar)	22
3.7.3 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	23
3.7.4 Pembuatan Sampel Larutan.....	23
3.7.5 Peremajaan Bakteri	24
3.8 Uji Pendahuluan	24
3.9 Penelitian	26
3.9.1 Ekstraksi	26
3.9.2 Uji Daya Hambat Bakteri Dengan Metode Kertas Cakram	30
3.9.3 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC).....	32
3.9.4 Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	34
3.7 Analisis Data	35
IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	37
4.1 Uji Pendahuluan	37
4.2 Ekstraksi	39
4.3 Uji Daya Hambat Bakteri dengan Menggunakan Metode Kertas Cakram.....	41
4.4 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)	44
4.5 Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	46
V. KESIMPULAN DAN SARAN	48
5.1 Kesimpulan.....	48
5.2 Saran.....	48
DAFTAR PUSTAKA.....	49
LAMPIRAN	55

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Uji Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri oleh Mikroalga.....	13
2. Alat yang Digunakan dalam Penelitian dan Fungsinya.....	16
3. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian dan Fungsinya	17
4. Rancangan Percobaan Uji Cakram	20
5. Hasil Rendemen Ekstraksi Beberapa Jenis Mikroalga.....	40
6. Hasil pengukuran diameter zona hambat pada Uji Daya Hambat Menggunakan Metode Kertas Cakram.....	42
7. Nilai <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) ekstrak <i>P. cruentum</i> .	46
8. Hasil Pengamatan Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC).	47

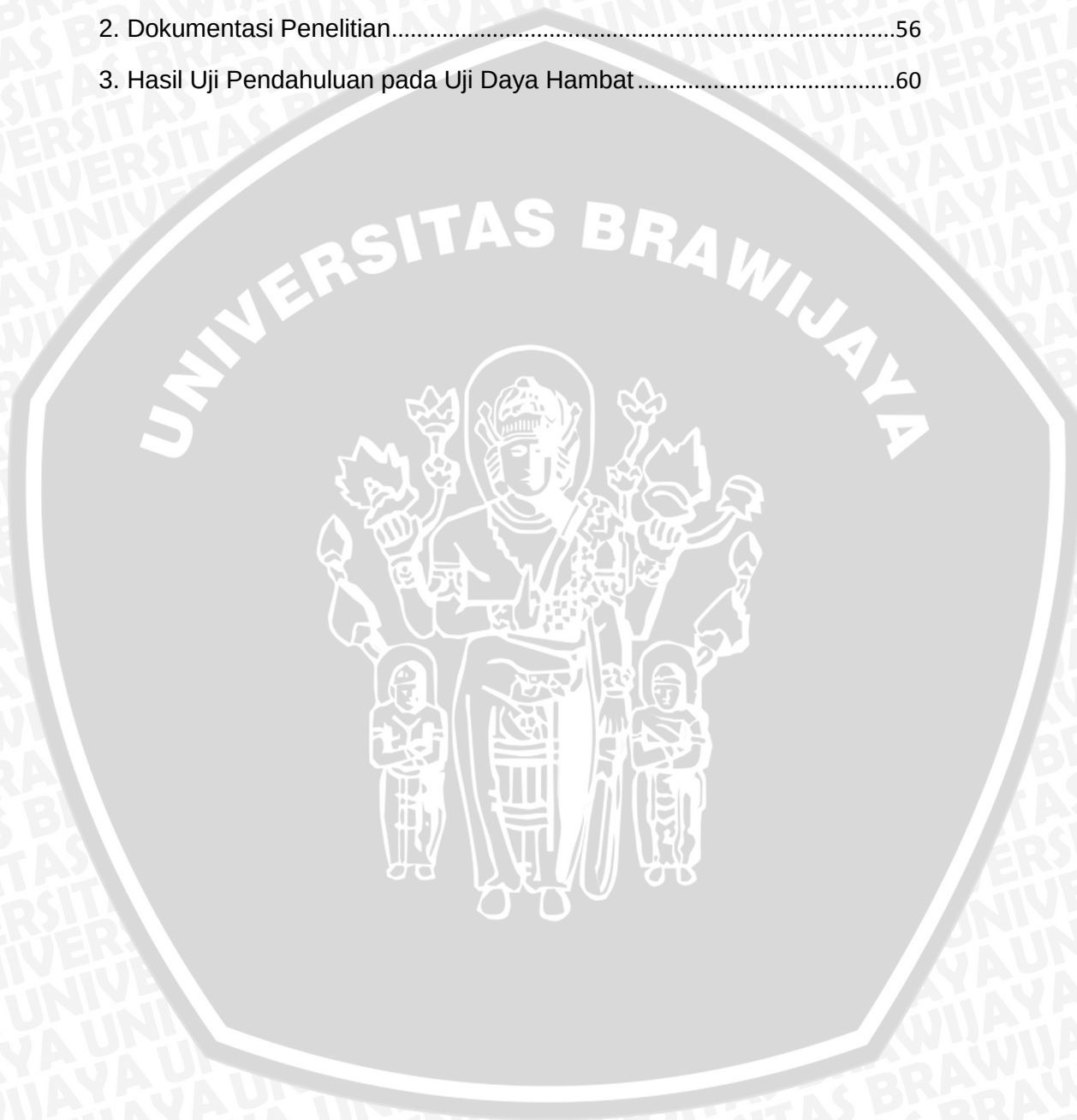


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Porphyridium cruentum</i> (a) diperoleh dari CCALA (2015), (b) diperoleh dari dokumentasi pribadi.....	5
2. <i>Vibrio harveyi</i> (Furley Bioextract, 2017)	7
3. Alat <i>Microwave Assisted Extraction</i> (MAE) (a) susunan vessel yang disusun di dalam Rotor 16 SOLV (b) susunan vessel pada rak (c) Rotor 16 SOLV yang telah dimasukkan ke dalam <i>Multiwave PRO</i> SOLV	28
4. Perhitungan diameter zona hambat antibakteri (Pratiwi, 2008).....	31
5. Hasil Uji Daya Hambat ekstrak <i>P. cruentum</i> dengan dosis 8.000, 10.000, 12.000, dan 14.000 ppm	37
6. Hasil Ekstraksi Metode Maserasi	38
7. Hasil estraksi <i>P. cruentum</i> dari alat MAE	39
8. Hasil uji daya hambat pada (a) konsentrasi 250.000, 300.000, 350.000, 400.000 ppm dan (b) kontrol positif serta negatif	41
9. Hasil uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) ekstrak <i>P. cruentum</i> ..	45
10. Hasil Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	47

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak <i>P. cruentum</i>	55
2. Dokumentasi Penelitian.....	56
3. Hasil Uji Pendahuluan pada Uji Daya Hambat.....	60



DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

Antibakteri	: zat yang membunuh, atau menekan pertumbuhan atau reproduksi bakteri
Antibiotik	: suatu produk yang dihasilkan secara alami oleh mikroba (fungi, Actinomycetes, dan bakteri) maupun sintetis untuk membunuh jenis mikroba lain
Dekok	: perebusan simplisia menggunakan air pada suhu $>90^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i> , pelarut untuk ekstrak
Kertas cakram	: kertas berbentuk bulat yang digunakan pada Uji Daya Hambat
MAE	: <i>Microwaved Assisted Extraction</i> , alat untuk ekstraksi dengan suhu tinggi
MBC	: uji yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat mematikan bakteri
MIC	: uji yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri
Maserasi	: metode ekstraksi dengan cara merendam bahan dengan menggunakan pelarut
Na Fis	: Natrium Fisiologis
Pelarut	: larutan yang melarutkan benda cair dan padat sehingga terbentuk suatu larutan
Rendemen	: perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan (gram) dengan bobot sampel awal sebelum diekstraksi (gram)
Sokhletasi	: proses pemisahan suatu komponen yang terdapat pada zat padat dengan cara penyaringan berulang ulang dengan menggunakan pelarut tertentu
TCBSA	: <i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i> , media pertumbuhan Agar selektif untuk bakteri <i>Vibrio</i> spp.
TSB	: <i>Tryptone Soya Broth</i> , media pertumbuhan Broth untuk bakteri patogen
Zona Hambat	: zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram, yang menandakan bila bakteri di sekitar kertas cakram tersebut mati

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Udang merupakan biota yang memiliki nilai ekonomis untuk dipasarkan di ranah internasional maupun domestik sebagai pemenuhan kebutuhan pangan terhadap protein hewani. Beberapa faktor mempengaruhi budidaya udang yaitu parameter kimiawi perairan seperti suhu, pH, dan BOD. Sementara itu, salah satu faktor biologi yang mempengaruhi adalah bakteri (Setyaningsih *et al.*, 2006).

Salah satu jenis bakteri yang menyerang udang yaitu *Vibrio harveyi*. *Vibrio harveyi* merupakan bakteri gram negatif, bakteri luminous, yang merupakan salah satu agen etiologi mortalitas massal dari pembenihan larva udang *Penaeus monodon* (Rao, 2016). Bakteri *Vibrio harveyi* dikenal sebagai bakteri yang mengakibatkan dampak yang serius, khususnya terhadap invertebrata laut seperti udang penaeid yang penting secara ekonomis terutama di Asia dan Amerika Selatan, (Austin dan Zhang, 2006). Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri *Vibrio harveyi* bersifat ganas, dan dapat mematikan larva udang dalam waktu 1-3 hari. Pembenihan udang di sepanjang tepi pantai India, termasuk produksi bibit udang terkena serangan penyakit bakteri tersebut menderita kerugian ekonomi yang sangat besar (Rao, 2016).

Petani ikan seringkali menggunakan antibiotik dan pestisida untuk membunuh bakteri. Namun penggunaan antibiotik dan pestisida yang berlebihan dapat mempengaruhi lingkungan budidaya dan udang yang dibudidayakan. Pemberian antibiotik sintetis yang terus menerus mengakibatkan tertinggalnya residu pada udang, sehingga dapat membahayakan konsumen (Setyaningsih *et al.*, 2006). Akibat hal tersebut, maka dilakukan penelitian pengembangan terhadap antibiotik dari bahan alami.

Salah satu bahan alami yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai antibiotik adalah mikroalga. Kemudahan dalam kultur dan berbagai manfaat, termasuk kandungan senyawa aktif yang dimiliki oleh mikroalga menjadikan mikroalga lebih unggul untuk dikembangkan pemanfaatannya sebagai produk bioteknologi dibandingkan dengan spons yang memiliki senyawa aktif lebih besar. Pada beberapa tahun terakhir, penelitian terhadap senyawa aktif dari mikroalga banyak dikembangkan baik di dalam dan di luar negeri (Murniasih, 2003). Salah satu mikroalga yang memiliki bahan bioaktif merupakan mikroalga dari jenis *Rhodophyceae* yaitu *Porphyridium cruentum*. Senyawa aktif dari mikroalga *P. cruentum* banyak diteliti untuk pembuatan berbagai macam produk seperti antihiperglikemik (Setyaningsih *et al.*, 2013), antioksidan (Hasanah, 2011), antibakteri (Kusmiyati dan Agustini, 2007), bioremediator (Pranajaya *et al.*, 2014). Banyaknya produk bioaktif yang dapat dihasilkan oleh *P. cruentum* melatarbelakangi penelitian ini apakah ekstrak dari *P. cruentum* dapat menghambat atau bahkan mematikan bakteri *V. harveyi*, serta pada konsentrasi berapakah bakteri tersebut dapat terhambat atau mati.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang terdapat di dalam penelitian ini yaitu:

- Apakah terdapat perbedaan pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak *P. cruentum* yang berbeda terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*?
- Berapakah konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*?
- Berapakah konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat mematikan bakteri *V. harveyi*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dalam penelitian ini adalah:

- Mengetahui perbedaan besar zona hambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* yang terbentuk akibat paparan konsentrasi ekstrak mikroalga *P. cruentum* yang berbeda
- Mengetahui konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*
- Mengetahui konsentrasi terendah ekstrak *P. cruentum* yang dapat mematikan bakteri *V. harveyi*

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa kegunaan, yaitu:

- Bagi peneliti, penelitian ini dapat menambah ilmu praktis meliputi proses ekstraksi, kultur bakteri, dan pengukuran zona hambat, konsentrasi minimum daya hambat bakteri, dan konsentrasi minimum bakterisidal bakteri akibat pengaruh ekstrak mikroalga. Selain itu didapatkan juga pengetahuan baru mengenai ekstraksi, antibakteri, dan mikroalga secara umum.
- Bagi lembaga pendidikan, hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai bahan referensi untuk pengembangan penelitian lain yang berkaitan dengan tema penelitian ini.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilakukan dalam beberapa uji yaitu ekstraksi mikroalga *Porphyridium cruentum*, Uji Daya Hambat, Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan Uji *Minimum Bacteriocidal Concentration* (MBC) yang dilakukan di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH), Universitas Brawijaya. Beberapa proses Ekstraksi dan Uji Daya Hambat dilakukan di Laboratorium Keamanan Hasil

Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penelitian dilakukan pada bulan Agustus – November 2016.

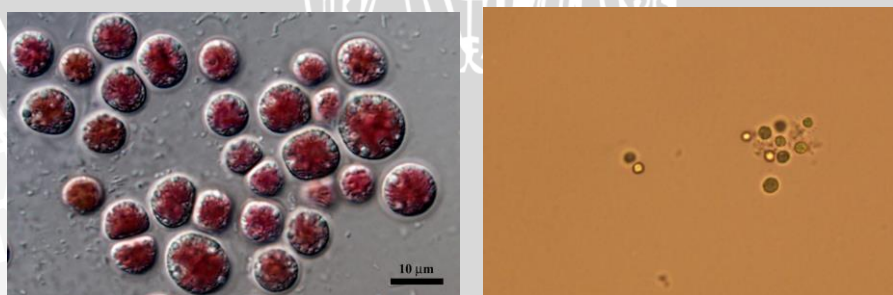


II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi dan Morfologi *Porphyridium cruentum*

Porphyridium cruentum merupakan mikroalga merah bersel satu yang termasuk ke divisi Rhodophyta, hidup bebas atau berkoloni yang terikat dalam *mucilage*. Senyawa *mucilage* diekskresikan secara konstan oleh sel membentuk sebuah kapsul yang mengelilingi sel. *Mucilage* merupakan polisakarida sulfat yang bersifat larut di dalam air (Rahman, 2011). *Porphyridium cruentum* dapat hidup di berbagai habitat alam seperti air laut, air tawar, maupun pada permukaan tanah yang lembab dan membentuk lapisan kemerah-merahan yang sangat menarik. Habitat asli dari *P. cruentum* diduga berasal dari laut karena dapat hidup dengan baik pada media air laut (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Sel *P. cruentum* berbentuk bulat dengan diameter 4 - 9 μm . Struktur selnya terdiri dari sebuah nukleus (inti), kloroplas, badan golgi, mitokondria, lendir, pati dan vesikel. Setiap sel memiliki kloroplas dengan pirenoid di tengahnya (Lee, 1989). Berikut merupakan gambar dari *P. cruentum* yang dapat dilihat pada **Gambar 1**. Dokumentasi mikroalga diperoleh dengan menggunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 40x.



(a)

(b)

Gambar 1. *Porphyridium cruentum* (a) diperoleh dari CCALA (2015), (b) diperoleh dari dokumentasi pribadi

Klasifikasi *P. cruentum* menurut Vonshak (1988) dalam Kosasih (2011) adalah sebagai berikut:

Divisi : Rhodophyta
Sub kelas : Bangiophyceae
Ordo : Porphyridiales
Famili : Porphyriceae
Genus : *Porphyridium*
Spesies : *Porphyridium cruentum*

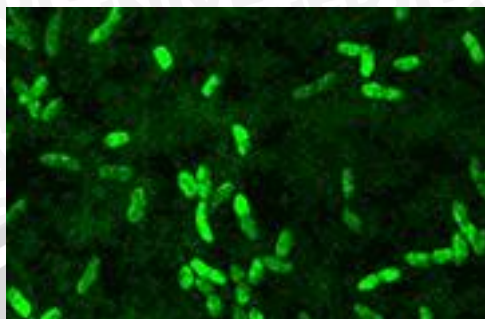
2.2 Bahan Bioaktif *Porphyridium cruentum*

Pada hasil uji fitokimia yang dilakukan Hasanah (2011), kandungan dari biomassa mikroalga *P. cruentum* yaitu alkaloid, steroid, flavonoid, fenol, dan hidrokuinon, karbohidrat, dan gula pereduksi. Alkaloid dan flavonoid merupakan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. Kedua senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis* (Hasanah, 2011). Senyawa kimia utama bahan antibakteri menurut Pelczar dan Chan (1988) yaitu senyawa fenol dan persenyawaan fenolat, alkohol, halogen, logam berat dan persenyawaannya, deterjen, aldehyd, dan kemosterilisator gas. Senyawa antibakteri *P. cruentum* dominan yang teridentifikasi pada penelitian Kusmiyati dan Agustini (2007) yaitu asam lemak metil heksadekanoat (asam palmitat).

2.3 Karakteristik dan Morfologi *Vibrio harveyi*

Bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif, bersifat motil, berbentuk batang pendek, oksidase positif, tidak membentuk gas dari fermentasi terhadap D-glukosa, dapat menggunakan gelatin, glukosa dan laktosa sebagai sumber karbon tetapi tidak dapat menggunakan sukrosa, menghasilkan enzim protease, amilase dan kitinase. Berdasarkan penelitian Widanarni *et al.* (2004), yang menumbuhkan tiga isolat *V. harveyi*, ketiga koloni isolat *V. harveyi* yang digunakan berwarna hijau pada media selektif *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose*

Agar (TCBSA) dan berpendar bila diamati di ruang gelap. Gambar dari bakteri *Vibrio harveyi* dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. *Vibrio harveyi* (Furley Bioextract, 2017)

Pertumbuhan *Vibrio* spp. optimum pada suhu 30-35°C, sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tidak akan tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati (Prajitno, 2007). *V. harveyi* merupakan bakteri yang bersifat fakultatif anaerobik, motil, oksidase-positif, gram negatif (Buller, 2014). *V. harveyi* bersifat ganas dan akut bagi larva udang karena dapat mematikan populasi larva yang terserang dalam waktu 1 hingga 3 hari sejak gejala awal tampak (Zulham, 2004). Serangan oleh bakteri ini ditandai dengan pendaran cahaya pada tubuh udang saat gelap. Tanda-tanda lain yang muncul yaitu timbul bercak-bercak merah pada tubuh udang, pergerakan lambat, bentuk tidak normal, dan nafsu makan menurun (Zulham, 2004).

2.4 Patogenitas *Vibrio harveyi*

Bakteri *V. harveyi* pada umumnya menyerang larva udang pada stadia zoea, mysis, dan awal pasca larva. Bakteri ini bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal di dalam lingkungannya dari keadaan saprofitik berubah menjadi patogenik dalam kondisi lingkungan dan inang yang memburuk (Widanarni *et al.*, 2004). Menurut Saulnier *et al.* (2000), beberapa galur dari *Vibrio harveyi* merupakan patogen sebenarnya dan penyebab utama dalam penyakit vibriosis pada udang windu.

Berdasarkan hasil penelitian Suwanto *et al.* (1998), galur *V. harveyi* berpendar yang menyerang larva udang sangat bervariasi pada musim dan lokasi yang berbeda, sehingga tidak semua spesies *Vibrio* penyebab vibriosis dapat dikendalikan dengan menggunakan vaksin karena sulit menentukan galur yang tepat sebagai bahan vaksin.

2.5 Ekstraksi

Proses ekstraksi (penyarian) merupakan proses penarikan komponen aktif yang terkandung di dalam tanaman menggunakan pelarut yang sesuai dengan kelarutan komponennya (Satuhu dan Yulianti, 2012). Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut organik. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1987).

Ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan *Microwave Assist Extraction* (MAE). MAE merupakan alat ekstraksi pengganti sokhletasi yang lebih modern. Alat ini memiliki beberapa kelebihan dibandingkan dengan metode sokhletasi, diantaranya yaitu waktu yang dibutuhkan dalam ekstraksi lebih cepat, dan jumlah material yang digunakan lebih sedikit (Anonim, 2016). Keuntungan lain dari MAE yang dijabarkan oleh Dhobi *et al.* (2009), yaitu waktu ekstraksi yang lebih pendek, penggunaan pelarut yang lebih sedikit, hasil ekstraksi yang lebih tinggi, dan produksi yang lebih bagus dengan biaya yang lebih rendah. Selain itu penggunaan pelarut yang sedikit membuktikan bila MAE memiliki fitur yang ramah lingkungan dan pengeluaran biaya yang rendah. Bila dibandingkan dengan metode maserasi, ekstrak yang dihasilkanpun lebih besar, sesuai dengan penelitian Rafiee *et al* (2011) dimana ekstrak fenol yang

dihasilkan dari beberapa varietas tanaman lebih banyak dihasilkan oleh MAE dibandingkan dengan metode maserasi.

2.6 Senyawa Antibakteri

Antibakteri atau antimikroba merupakan suatu zat yang dihasilkan oleh mikroba untuk membunuh mikroba lain, khususnya mikroba yang merugikan manusia (Gan dan Setiabudy, 1987). Pada penelitian ini, antibakteri yang digunakan yaitu antibakteri yang berasal dari mikroalga *Porphyridium cruentum*, karena mikroalga tersebut mengandung zat metabolit sekunder yang dapat dikembangkan menjadi antibakteri. *Porphyridium cruentum* merupakan salah satu fitoplankton yang mempunyai komponen aktif tersebut selain *Chaetoceros calcitrans*, *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* (Rizky et al., 2013). Senyawa kimia utama bahan antibakteri menurut Pelczar dan Chan (1988) yaitu senyawa fenol dan persenyawaan fenolat, alkohol, halogen, logam berat dan persenyawaannya, deterjen, aldehid, dan kemosterilisator gas.

2.7 Mekanisme Kerja Antibakteri

Secara umum, kemungkinan situs serangan zat antibakteri dapat diduga dengan meninjau struktur serta komposisi sel mikroba. Sel hidup yang normal memiliki sejumlah besar enzim yang mengatur proses-proses metabolik dan juga protein lain, asam nukleat, serta senyawa-senyawa lain. Adapun membran semipermeabel berfungsi sebagai pertahanan integritas kandungan selular, pengatur keluar masuknya zat antar sel dan lingkungan luar. Dinding sel berperan sebagai penutup pelindung bagi sel, selain itu berperan pula terhadap proses-proses fisiologis tertentu (Pelczar dan Chan, 1988).

Menurut Pelczar dan Chan (1988), kerusakan dari salah satu situs yang telah disebutkan dapat mengawali terjadinya perubahan-perubahan yang menuju

ke arah matinya sel tersebut. Antibakteri dapat merusak sel bakteri melalui hal berikut:

- **Kerusakan pada dinding sel**

Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat atau mengubahnya setelah selesai dibentuk (Pelczar dan Chan, 1988).

- **Perubahan permeabilitas sel**

Membran semipermeabel atau membran sitoplasma merupakan membran yang berfungsi untuk mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel, mengatur keluar masuknya bahan-bahan lain. Selain itu membran juga memelihara integritas komponen-komponen selular. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 1988).

- **Perubahan molekul protein dan asam nukleat**

Hidup suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alaminya. Kondisi atau substansi yang mengubah hal tersebut, yaitu terdenaturasinya protein dan asam nukleat dapat merusak sel dan tidak dapat kembali seperti semula. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat suatu zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi) ireversibel komponen-komponen selular yang vital (Pelczar dan Chan, 1988).

- **Penghambatan kerja enzim**

Setiap enzim yang berada di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi kerja suatu penghambat. Banyak zat kimia yang telah diketahui mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya atau matinya sel (Pelczar dan Chan, 1988).

- **Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein**

DNA, RNA, dan protein merupakan komponen utama dalam suatu sel. Sehingga bila terdapat gangguan terhadap pembentukan atau fungsi zat tersebut, maka dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel (Pelczar dan Chan, 1988).

2.8 Uji Pendahuluan

Sebelum dilakukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram, dilakukan uji pendahuluan yang berfungsi untuk menentukan konsentrasi ekstrak *P. cruentum* yang tepat untuk bakteri *V. harveyi*. Selain itu, uji pendahuluan digunakan untuk melihat potensi senyawa aktif pada *P. cruentum* pada konsentrasi tersebut. Seperti penelitian Ningtyas (2010), yang melakukan uji cakram sebagai uji pendahuluan untuk melihat adakah zat aktif di ekstrak daun kecombrang yang berpotensi untuk antioksidan dan antibakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Pada uji pendahuluan dilakukan juga metode ekstraksi menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses pengekstrakan bahan dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Keunggulan dari ekstraksi menggunakan metode maserasi dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan MAE adalah kandungan yang ada pada hasil ekstrak tidak rusak akibat suhu. Beberapa senyawa dapat rusak karena pengaruh suhu pada saat ekstraksi. Seperti pada Mukhriani (2014), proses ekstraksi dengan maserasi dapat menghindari rusaknya bahan yang mudah dipengaruhi oleh suhu. Namun kekurangan dari metode ini yaitu waktu ekstrak yang cukup lama, membutuhkan banyak pelarut, dan besar kemungkinan banyak senyawa yang hilang.

2.9 Uji Daya Hambat Antibakteri dengan Metode Kertas Cakram

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode dilusi (Ketchum, 1988). Menurut Kusmiyati dan Agustini (2007), metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas:

- **Metode silinder** yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder
- **Metode lubang** 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. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang
- **Metode cakram kertas** yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram.

Metode pengenceran yaitu mengencerkan zat antibakteri dan dimasukkan ke dalam tabung-tabung reaksi steril. Ke dalam masing-masing tabung reaksi itu ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah diketahui jumlahnya. Pada interval waktu tertentu, dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung-tabung reaksi berisi media steril yang lalu diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Tabel 1. Uji Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri oleh Mikroalga

No.	Spesies mikroalga	Pelarut	Metode antibakteri	Konsentrasi	Efek bioaktif (mm)	Bakteri target	Referensi
1.	<i>Corallina officinalis</i>	Methanol	Difusi (cakram kertas)	-	21,66 32,00 34,00	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	Taskin et al., 2007
2.	<i>Porphyridium cruentum</i>	Ethanol 96%	Difusi (lubang)	10.000, 8.000, 7.500, 6.000 ppm	9,00-9,10 12,50-12,70 12,00-12,25	<i>E. coli</i> <i>B. subtilis</i> <i>S. aureus</i>	Kusmiyati dan Agustini, 2007
3.	<i>Pithophora oedogonium</i> , <i>Botrydiopsis arhiza</i>	Ethanol	Difusi (cakram kertas)	2.000, 4.000, 6.000, 8.000 ppm	4-7, 2-7	<i>Salmonella</i> 4 (Meat 2), <i>Salmonella</i> 1 (Egg), <i>Staphylococcus</i> 5034, <i>Staphylococcus</i> 4978	Danyal et al., 2013
4.	<i>Chlorococcum humicola</i>	acetone, benzene, chloroform, diethyl ether, ethyl acetate, ethanol, hexane and methanol	Difusi (sumur agar)	25, 50, 75µg/well	7-11, 10-18, 0-18, 8-12, 13-17, 0-15, 7-13, 0-12	<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Bhagavathy S et al., 2011
5.	<i>Tetraselmis suecica</i>	Acetone, n-butanol, Isopropanol, Acetone + nbutanol (1:1), Acetone + Isopropanol (1:1), Acetone + Chloroform (1:1), Butanol + Isopropanol (1:1), Chloroform + Methanol (1:1)	Difusi (cakram kertas)	50µl/per disk	1,30-11,6, 3,1-12,2, 3,3-9,8, 3,1-11,2, 4,3-11,8, 2,6-11, 2,7-13, 2,7-13, 2,6-13,8, 9,4-12,8	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella</i> sp, <i>Proteus</i> sp, <i>Streptococcus pyogens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus megaterium</i> and <i>Bacillus subtilis</i>	Bai dan Krishnakumar, 2011

Adapun beberapa referensi mengenai daya hambat aktivitas bakteri oleh ekstrak mikroalga disajikan pada **Tabel 1**. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteriostatik, bakteriolitik, dan bakterisidal. Antibakteri bakteriostatik bekerja dengan menghambat pertumbuhan sel, antibakteri bakteriolitik

menyebabkan lisis pada sel, sedangkan antibakteri bakterisidal membunuh bakteri tanpa menyebabkan sel lisis (Ketchum, 1988).

Pemilihan konsentrasi ekstrak mikroalga *P. cruentum* dipilih mengacu pada penelitian Kusmiyati dan Agustini (2007). Bakteri yang diuji aktivitas nya yaitu bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi mikroalga *P. cruentum* sebesar 6.000 ppm, 7.500 ppm, 8.000 ppm, dan 10.000 ppm. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan ekstraksi bertingkat, yaitu dengan pelarut jenis polar, lalu sisa ekstraksi diekstrak dengan semi polar, kemudian sisa hasilnya diekstrak kembali dengan pelarut non polar. Hasil ekstraksi menggunakan pelarut polar tidak menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang terhambat baik bakteri gram positif dan negatif. Pada ekstraksi pelarut semi polar hanya perlakuan terhadap bakteri gram positif yang terhambat pertumbuhannya, sedangkan hasil ekstraksi pelarut menggunakan pelarut non polar dapat menghambat semua bakteri yang diuji baik gram positif maupun negatif.

Pada penelitian ini tetap digunakan pelarut yang bersifat polar, yaitu methanol. Namun metode ekstraksi yang dilakukan tidak menggunakan maserasi, tetapi bantuan alat MAE. Asumsinya akan terdapat senyawa antibakteri yang terekstrak apabila menggunakan alat MAE, sehingga walaupun mikroalga *P. cruentum* diekstrak menggunakan pelarut methanol yang bersifat polar, bakteri akan dapat terhambat pertumbuhannya.

Zona hambat yang terbentuk pada perlakuan konsentrasi terbesar yaitu 10.000 ppm terhadap bakteri *E. coli* yaitu antara 9,00 – 9,10 mm yang menurut Nazri *et.al* (2011) merupakan kategori daya hambat lemah. Kategori daya hambat berdasarkan Nazri *et.al* (2011) yaitu:

- Diameter zona hambat 15-20 mm : Daya hambat kuat
- Diameter zona hambat 10-14 mm : Daya hambat sedang

- Diameter zona hambat 0-9 mm : Daya hambat lemah

Berdasarkan acuan konsentrasi tersebut, maka konsentrasi yang digunakan dalam uji pendahuluan penelitian yaitu sebesar 8.000 ppm, 10.000 ppm, 12.000 ppm, dan 14.000 ppm. Dengan konsentrasi tersebut, diasumsikan akan didapatkan daya hambat kategori sedang pertumbuhan *V. harveyi* yang merupakan bakteri gram negatif seperti *E. coli*. Kemudian pada saat penelitian dinaikkan konsentrasi hingga 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm.

2.10 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Kemampuan antibakteri dalam melawan bakteri dapat diukur menggunakan beberapa metode, salah satunya ialah metode dilusi. Metode dilusi dapat berupa perbenihan cair maupun teknik dilusi agar yang bertujuan untuk menentukan aktivitas antibakteri secara kuantitatif. Antibakteri dilarutkan ke media agar atau cair, kemudian dilakukan penanaman bakteri. Setelah itu sampel diinkubasi selama 18 - 24 jam konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) (Soleha, 2015). Konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan pertumbuhan disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum atau MIC (Ketchum, 2015).

2.11 Uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Dasar penentuan aktivitas antibakteri secara in vitro adalah uji MIC dan MBC. MIC merupakan konsentrasi terendah antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan uji MBC adalah konsentrasi terendah antibakteri yang dapat membunuh 99,9% pada biakan selama waktu yang ditentukan (Soleha, 2015). Aktivitas dari antibakteri tertentu dapat meningkat dari bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) menjadi bakteriosid (mematikan bakteri) apabila konsentrasi antibiotik ditingkatkan (Gan *et al.*, 1987).

III. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

Materi yang digunakan di dalam penelitian ini adalah mikroalga *Porphyridium cruentum* dan bakteri *Vibrio harveyi*. *Porphyridium cruentum* diperoleh dari Balai Besar Air Payau (BBAP) Situbondo, sedangkan bakteri *Vibrio harveyi* didapatkan dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara.

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian “Uji Efek Antibakteri Mikroalga *Porphyridium cruentum* terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro*” dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Alat yang Digunakan dalam Penelitian dan Fungsinya

No.	Alat	Fungsi
1.	Autoklaf	Sebagai alat untuk menyeterilisasi alat dan bahan
2.	Beaker Glass	Sebagai wadah alat dan bahan yang akan disterilisasi
3.	Bunsen	Sebagai alat pencegah kontaminasi saat penelitian
4.	Cawan Petri	Sebagai tempat kultur bakteri, Uji Daya Hambat, dan Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)
5.	Erlenmeyer 250 ml	Sebagai tempat pembuatan media
6.	Gelas Ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan yang akan digunakan
7.	Gunting	Sebagai alat untuk memotong tali, plastik wrap, dan aluminium foil
8.	Hotplate	Sebagai alat untuk memanaskan media
9.	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi
10.	Jangka Sorong	Sebagai alat untuk mengukur panjang diameter zona hambat
11.	Jarum Ose	Sebagai alat untuk mengambil bakteri
12.	<i>Laminar Air Flow</i> (LAF)	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan
13.	Lemari Pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu rendah
14.	Mikropipet 100-1000 µl	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan dengan ukuran 100-1000 µl

Tabel 2. Lanjutan

15.	Mikropipet 10-100 μ l	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan dengan ukuran 10-100 μ l
16.	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat
17.	Pinset	Sebagai alat untuk membantu mengambil kertas cakram pada perakuan
18.	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
19.	<i>Rotary Vacum Evaporator</i>	Sebagai alat untuk mengevaporasi ekstrak mikroalga <i>P. cruentum</i>
20.	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan
21.	Sprayer	Sebagai tempat untuk menyimpan alkohol
22.	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)
23.	Timbangan Digital	Sebagai alat untuk mengukur berat dengan ketelitian 10^{-2}
24.	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk mengukur berat dengan ketelitian 10^{-3}
25.	<i>Vortex Mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
26.	Spatula	Sebagai alat untuk mengambil sampel
27.	<i>Microwaved Assisted Extraction</i> (MAE)	Sebagai alat untuk mengekstrak <i>P. cruentum</i>
28.	Botol Kaca	Sebagai wadah untuk menyimpan ekstrak

3.3 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian “Uji Efek Antibakteri Mikroalga *Porphyridium cruentum* terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* secara *in vitro*” dapat dilihat pada **Tabel 3.**

Tabel 3. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian dan Fungsinya

No.	Bahan	Fungsi
1.	Alkohol 70%	Sebagai bahan untuk sterilisasi
2.	Alumunium foil	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian botol yang berisi ekstrak
3.	Aquades	Sebagai bahan pelarut
4.	Bakteri <i>V.harveyi</i>	Sebagai bakteri yang digunakan dalam perlakuan
5.	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
6.	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat yang disterilisasi
7.	Kertas bekas	Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan disterilisasi
8.	<i>Blue tip</i>	Sebagai bahan untuk mengambil larutan dalam volume 200-1000 μ l
9.	<i>Yellow tip</i>	Sebagai bahan untuk mengambil larutan dalam volume tertentu 10-200 μ l
10.	Kertas label	Sebagai bahan penanda

Tabel 3. Lanjutan

11.	Kertas cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui diameter zona hambat yang terbentuk di sekelilingnya
12.	<i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i> (TCBSA)	Sebagai media pertumbuhan bakteri <i>V. harveyi</i> pada saat peremajaan, kultur, Uji Daya Hambat, dan Uji MBC
13.	<i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	Sebagai media pertumbuhan <i>V. harveyi</i>
14.	Methanol	Sebagai bahan pelarut saat ekstraksi
15.	Plastik wrap	Sebagai bahan untuk membungkus cawan petri
16.	Sarung tangan	Sebagai bahan untuk mencegah kontaminasi
17.	Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk bunsen
18.	Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat
19.	Mikroalga <i>P. cruentum</i>	Sebagai bahan utama yang digunakan untuk ekstraksi
20.	Tisu	Sebagai bahan pembersih
21.	Masker	Sebagai bahan untuk pencegah kontaminasi
22.	Plastik bening	Sebagai bahan untuk membungkus alat yang akan disterilisasi, yang sudah terbungkus dengan kertas bekas

3.4 Metode Penelitian

Metode yang digunakan di dalam penelitian ini merupakan metode eksperimen. Menurut Jaedun (2011), penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja oleh peneliti dengan cara memberikan perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diukur/diamati dampaknya (data yang akan datang). Data pada hasil eksperimen menunjukkan data yang tidak tersebar normal karena hanya terdapat dua hasil perlakuan yang berbeda sehingga penelitian yang dilakukan secara kualitatif dan dibandingkan antar hasil. Menurut Cresswell (1998) penelitian kualitatif merupakan penelitian yang penemuan - penemuannya tidak dapat diperoleh dengan prosedur statistik atau cara – cara kuantitatif. Menurut Bodgan dan Biklen (1992), penelitian kualitatif merupakan prosedur penelitian yang menghasilkan data deskriptif berupa ucapan atau tulisan dari objek yang diamati.

Sumber data pada penelitian ini diperoleh dari primer dan data sekunder. Data primer merupakan data yang diperoleh dengan pengamatan langsung. Menurut Kuncoro (2009), data primer adalah data yang diperoleh dengan tampak lapangan dengan pengamatan langsung yang menggunakan semua metode pengumpulan data asli. Data primer meliputi pengukuran rendemen hasil ekstraksi, pengukuran zona hambat, pengukuran kekeruhan media, dan pengamatan pertumbuhan bakteri. Sedangkan data sekunder merupakan data yang diambil secara tidak langsung. Menurut Noviaty (2012), data sekunder adalah data yang diperoleh peneliti yang bersumber dari buku-buku pedoman, literatur yang disusun oleh para ahli, dan berbagai artikel yang berhubungan dengan masalah yang diteliti. Data sekunder pada penelitian ini diperoleh dari buku, skripsi, jurnal, dan juga situs internet.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap uji, yang pertama yaitu menguji keefektifan ekstrak methanol dari mikroalga *P. cruentum* terhadap daya pertumbuhan bakteri dengan pengukuran zona hambat di sekeliling kertas cakram. Uji yang kedua adalah uji MIC untuk menentukan dosis terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, lalu uji MBC untuk mengetahui dosis terendah yang dapat membunuh bakteri. Seluruh uji memakai konsentrasi mikroalga yang berbeda, bakteri kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif merupakan bakteri yang terpapar antibiotik konvensional (Streptomisin) (Harlina *et al.*, 2015), sedangkan bakteri kontrol negatif merupakan bakteri yang terpapar oleh emulsigator *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO 10%).

3.5 Variabel Penelitian

Menurut Purnama (2014), variabel yang diteliti dalam suatu penelitian dapat dibagi menjadi dua, yaitu variabel bebas (*independent*) dan variabel terikat (*dependent*). Variabel bebas merupakan variabel yang mempengaruhi atau

menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat. Sedangkan variabel terikat yaitu variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat, karena adanya variabel bebas.

Variabel bebas di dalam penelitian ini adalah ekstrak mikroalga *P. cruentum* dengan pelarut methanol. Adapun variabel terikat dalam penelitian ini yaitu panjang diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram setelah terpapar oleh ekstrak mikroalga *P. cruentum*. Parameter penelitian ini adalah lebar zona hambat yang terdapat pada uji daya hambat, media kultur bakteri cair yang secara visual tingkat kekeruhannya paling rendah setelah diberi konsentrasi ekstrak *P. cruentum* yang berbeda pada uji MIC, serta keberadaan koloni bakteri yang terbentuk di media agar akibat paparan ekstrak *P. cruentum* dengan konsentrasi berbeda pada uji MBC.

3.6 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL dilakukan karena percobaan dalam penelitian ini memiliki media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen (Sastrosupadi, 2000). Perlakuan yang terdapat dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak mikroalga *P. cruentum* yang bervariasi dan kontrol positif serta negatif. Konsentrasi yang digunakan yaitu 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm. Selain itu digunakan antibiotik streptomisin 100.000 ppm sebagai antibiotik kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif.

Tabel 4. Rancangan Percobaan Uji Cakram

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃
D	D ₁	D ₂	D ₃
K (+)	K (+) ₁	K (+) ₂	K (+) ₃
K (-)	K (-) ₁	K (-) ₂	K (-) ₃

Keterangan:

- A : Uji Daya Hambat dengan perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak *Porphyridium cruentum* sebesar 250.000 ppm
- B : Uji Daya Hambat dengan perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak *Porphyridium cruentum* sebesar 300.000 ppm
- C : Uji Daya Hambat dengan perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak *Porphyridium cruentum* sebesar 350.000 ppm
- D : Uji Daya Hambat dengan perlakuan pemberian konsentrasi ekstrak *Porphyridium cruentum* sebesar 400.000 ppm
- K (+) : kontrol positif; Uji Daya Hambat dengan perlakuan antibiotik konvensional (Streptomisin)
- K (-) : kontrol negatif; Uji Daya Hambat tanpa tambahan ekstrak maupun antibiotik konvensional

Jumlah ulangan di dalam penelitian ini sebanyak 3 kali ulangan seperti yang digambarkan pada **Tabel 4**. Jumlah ulangan untuk Rancangan Acak Lengkap (RAL) dapat dituliskan dalam rumus sebagai berikut:

$$a(n-1) = 10$$

keterangan:

n = banyaknya ulangan

a = banyaknya perlakuan

10 = derajat bebas minimal

(Nugroho, 1990).

3.7 Persiapan Penelitian

Sebelum dimulai penelitian, terdapat beberapa hal yang harus dipersiapkan yaitu pembuatan media *Tryptone Soya Broth* (TSB), pembuatan Media *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar* (TCBS-Agar), sterilisasi alat dan bahan, pembuatan sampel larutan, dan peremajaan bakteri. Media TSB akan digunakan untuk uji MIC, sedangkan media TCBSA digunakan untuk peremajaan bakteri, kultur stok, dan media untuk uji Daya Hambat dan uji MBC. Sterilisasi alat dan bahan dilakukan sebelum memulai perlakuan agar alat dan bahan yang dipakai bebas dari kontaminasi mikroba lain. Pembuatan sampel larutan yang

dilakukan yaitu pembuatan konsentrasi ekstrak *P. cruentum* dan DMSO 10%. Peremajaan bakteri merupakan proses penanaman bakteri agar didapat kultur bakteri dengan usia tertentu.

3.7.1 Pembuatan Media *Tryptone Soya Broth* (TSB)

Komposisi media TSB dalam 1 liter akuades adalah tripton 17.0 g, soya pepton 3.0 g, dekstrosa 2.5 g, NaCl 5.0 g, dan K₂HPO₄ 2.5 g (Fitriannur, 2009). Media TSB yang digunakan ditambah dengan 3 garam yaitu garam NaCl, MgSO₄, dan KCl dengan perbandingan 0,32 g : 0,184 g : 0,069 g : 0,007 g tiap 10 ml akuades¹. Langkah pembuatan media TSB yaitu ditimbang media TSB, NaCl, MgSO₄, dan KCl. Kemudian masukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml. Setelah itu, media dilarutkan dengan akuades, lalu media tersebut disterilisasi dengan menggunakan autoklaf (Prawira, 2014). Media TSB digunakan untuk kultur bakteri dalam uji MIC. Pembuatan media TSB dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF).

3.7.2 Pembuatan Media *Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar* (TCBS-Agar)

Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar (TCBSA) merupakan media selektif untuk bakteri *Vibrio*. Semua bakteri jenis *Vibrio* akan tumbuh pada media ini kecuali *V. hollisae*. Komposisi media TCBSA terdiri dari *Yeast Extract* 5 g, *Enzymatic Digest of Casein* 5 g, *Enzymatic Digest of Animal Tissue* 5 g, *Sodium Citrate* 10g, *Sodium Thiosulfate* 10 g, *Ox bile* 5 g, *Sodium Cholate* 3 g, *Sucrose* 20 g, *Sodium Chloride* 10 g, *Ferric Citrate* 1 g, *Bromthymol Blue* 0,04 g, *Thymol Blue* 0,04 g, *Agar* 14 g (Neogen, 2015).

Media TCBSA sebanyak 8,8 g dapat dilarutkan dengan 100 ml akuades steril di dalam Erlenmeyer (Neogen, 2015). Media ditambahkan larutan 3 garam

¹ Berdasarkan wawancara dengan laboran lab. Keamanan Hasil Perikanan (KHP) FPIK UB (Megawati Kusuma, S.Gz)

yaitu, KCl, MgSO_4 , dan NaCl dengan perbandingan 0,075 g : 0,694 g : 1,34 g¹. Larutkan media TCBS menggunakan hotplate stirrer selama 5 menit (Brown, 2005). Media TCBS dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 ml, media TCBS tidak dapat disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C (Neogen, 2015). Media TCBS ditaruh di atas cawan petri yang fungsinya menurut Cappuccino dan Sherman (2011), yaitu menyediakan area permukaan media yang lebih luas untuk isolasi bakteri dan mikroorganisme. Pada penelitian ini, media TCBSA di cawan petri digunakan sebagai media peremajaan bakteri, kultur pada uji daya hambat dengan kertas cakram, dan uji MBC. Pembuatan media TCBSA dilakukan di dalam LAF.

3.7.3 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan sebelum penelitian agar alat dan bahan yang ada tidak terkontaminasi dengan mikroba lain. Sehingga dalam persiapannya, mikroba-mikroba yang ada harus dihilangkan terlebih dahulu. Cara untuk sterilisasi yaitu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 15 psi. Pada kondisi ini, sel dan endospore yang ada dapat mati (Brown, 2005). Satu siklus sterilisasi dengan autoklaf yang mencakup peningkatan tekanan, sterilisasi, dan pengeluaran gas biasanya membutuhkan waktu dari tiga puluh menit hingga satu jam (Ketchum, 1988).

3.7.4 Pembuatan Sampel Larutan

Pada larutan kontrol negatif untuk Uji Daya Hambat digunakan larutan DMSO 10%. Langkah pembuatannya yaitu dengan melarutkan 10 ml DMSO murni dengan akuades sebanyak 90 ml. Menurut Assidqi *et al.* (2012), larutan DMSO dapat digunakan sebagai pelarut untuk mengencerkan ekstrak hingga konsentrasi tertentu. Sedangkan untuk kontrol positif menggunakan antibiotik konvensional Streptomisin dengan konsentrasi 100.000 ppm.

3.7.5 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri dilakukan pada media TCBSA. Bakteri *V. harveyi* dikultur dengan cara inokulasi bakteri dari isolate murni menggunakan jarum ose, kemudian dikultur pada media TCBSA. Kemudian bakteri yang telah diinokulasi diinkubasi 1 x 18-24 jam untuk diamati pertumbuhannya (Ilmiah *et al.*, 2015). Bakteri yang diremajakan diencerkan hingga kepadatan konsentrasi 10^5 CFU/ml yang dibandingkan dengan standar McFarlan 10^5 (Saptiani *et al.*, 2011). Peremajaan bakteri dilakukan di dalam LAF.

3.8 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan dengan uji cakram menggunakan konsentrasi yang dikutip dari jurnal Kusmiyati dan Agustini (2007), dimana konsentrasi *P. cruentum* yang digunakan untuk menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* adalah 6.000, 7.500, 8.000, dan 10.000 ppm. Berdasarkan konsentrasi tersebut, maka dibuat konsentrasi sebesar 4.000, 6.000, 8.000, dan 10.000 ppm. Pada masing-masing konsentrasi tersebut (4.000, 6.000, 8.000, dan 10.000 ppm) setelah diinkubasi tidak tampak zona hambat di sekitar kertas cakram. Konsentrasi mikroalga ditingkatkan menjadi 8.000, 10.000, 12.000, dan 14.000 ppm, namun zona hambat pada pada konsentrasi tersebut tidak tampak.

Diduga lama perendaman kertas cakram di dalam ekstrak mikroalga berpengaruh terhadap penelitian, sehingga pada percobaan selanjutnya kertas cakram direndam di dalam cairan ekstrak dengan lama perendaman 15 menit pada konsentrasi yang sama. Perlakuan tersebut masih tidak menghasilkan zona hambat di sekitar kertas cakram. Konsentrasi mikroalga ditingkatkan kembali menjadi 20.000, 25.000, 30.000, dan 35.000 ppm dengan lama perendaman kertas cakram di dalam ekstrak selama 15 menit. Perbedaan perlakuan yang

diberikan tersebut masih tidak menunjukkan zona hambat di sekeliling kertas cakram, sehingga konsentrasi ditingkatkan kembali dan perendaman kertas cakram dilakukan selama 30 menit. Konsentrasi mikroalga *P. cruentum* yang diberikan yaitu 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm, namun pada perlakuan tersebut juga tidak terbentuk zona hambat di sekeliling kertas cakram.

Konsentrasi mikroalga *P. cruentum* yang diberikan meningkat sekitar 100 kali lipat namun tetap tidak terbentuk zona hambat di sekitar kertas cakram. Diduga suhu pada saat ekstraksi mempengaruhi hasil Uji Daya Hambat, sehingga dilakukan juga ekstraksi dengan metode maserasi tanpa perlakuan suhu (menggunakan suhu ruang). Metode maserasi yang digunakan mengutip penelitian Istiqomah (2013) dengan modifikasi. Perbandingan berat bahan dan volume pelarut yang digunakan pada ekstraksi maserasi yaitu 1: 10. *P. cruentum* kering sebanyak 30 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan pelarut methanol sebanyak 300 ml. Proses maserasi dilakukan di dalam 3 erlenmeyer. Masing-masing Erlenmeyer dibungkus dengan menggunakan alumunium foil. Setelah itu ketiga erlenmyer ditaruh di dalam *water bath shaker* tanpa perlakuan pemberian suhu, sehingga yang dipakai ialah suhu ruang. Maserasi yang pertama dilakukan selama 3 hari. Setelah itu, hasil ekstraksi disaring menggunakan kertas saring halus. Sisa hasil ekstraksi direndam kembali dengan pelarut methanol sebanyak 300 ml selama 2 hari. Maserasi kedua dilakukan agar hasil ekstraksi yang didapat lebih optimal. Setelah proses ekstraksi dilakukan, hasil ekstraksi diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan putaran 25-60 rpm. Selanjutnya didapat ekstrak pekat mikroalga *P. cruentum*, lalu ditimbang dan dihitung hasil rendemen ekstrak. Selanjutnya hasil ekstrak dimasukkan ke botol kaca dan dibungkus dengan alumunium foil.

Hasil dari ekstraksi menggunakan metode maserasi digunakan untuk Uji Daya Hambat dengan perlakuan konsentrasi sama dengan uji yang terakhir, yaitu 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm. Namun pada uji tersebut tidak terdapat zona hambat di sekeliling kertas cakram. Uji Daya Hambat yang dilakukan menggunakan metode MAE ataupun maserasi tidak menghasilkan zona hambat walaupun konsentrasi dinaikkan 100 kali dan diberi perlakuan ekstraksi tanpa suhu, sehingga Uji Daya Hambat dilanjutkan hanya dengan menggunakan ekstrak hasil alat MAE. Perlakuan yang diberikan yaitu pemberian ekstrak mikroalga *P. cruentum* sebesar 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm serta kontrol positif (pemberian antibiotik konvensional streptomisin) dan kontrol negatif (tanpa pemberian antibiotik) dengan tiga kali ulangan.

3.9 Penelitian

Penelitian yang dilakukan terdiri dari beberapa tahap, yaitu proses ekstraksi, Uji Daya Hambat bakteri dengan kertas cakram, Uji *Minimum Inhibitory Concentration*, dan Uji *Minimum Bactericidal Concentration*. Tahap tersebut dilakukan secara berurutan. Setiap tahap tersebut dijelaskan pada sub bab – sub bab selanjutnya.

3.9.1 Ekstraksi

Ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan alat *Microwaved Assisted Extraction* (MAE), yang dikutip dalam penelitian Rafiee *et al.* (2011), dimana hasil ekstraksi yang diperoleh dengan alat MAE lebih banyak dibandingkan dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi. Penelitian ini mengutip penelitian Kusmiyati dan Agustini (2007), yang menggunakan *P. cruentum* sebagai antibakteri. Pada penelitian tersebut, ekstrak *P. cruentum* yang menggunakan pelarut etanol 96% (bersifat polar) dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi tidak berfungsi terhadap bakteri yang diuji, baik

bakteri gram positif maupun negatif. Ekstraksi *P. cruentum* dilakukan menggunakan alat MAE dengan pelarut methanol (polar) dengan dosis yang sama dengan penelitian Kusmiyati dan Agustini (2007) untuk mengatasi masalah tersebut. Rangkaian dari alat MAE dapat dilihat pada **Gambar 3**.





(c)

Gambar 3. Alat *Microwave Assisted Extraction* (MAE) (a) susunan vessel yang disusun di dalam Rotor 16 SOLV (b) susunan vessel pada rak (c) Rotor 16 SOLV yang telah dimasukkan ke dalam *Multiwave PRO SOLV*

Proses ekstraksi mikroalga menggunakan alat yang disebut dengan *Microwave Assisted Extraction* (MAE). Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut methanol mengacu pada penelitian Menendez *et al.* (2014), dimana hasil ekstraksi terbanyak dihasilkan dari proses ekstraksi mikroalga *Nannochloropsis gaditana* dengan perbandingan antar bahan dan pelarut 1:10, diekstrak pada suhu 60°C selama 20 menit. Berdasarkan jurnal tersebut, jumlah mikroalga *P. cruentum* yang diekstrak sebanyak 4 gram dengan pelarut methanol 40 ml per vessel. *P. cruentum* diekstrak pada suhu 60°C selama 20 menit. Ekstraksi dengan pelarut methanol lebih efisien dalam melarutkan senyawa aktif walaupun lebih bersifat toksik apabila dibandingkan dengan pelarut ethanol yang bersifat polar (Sani *et al.* 2014).

Setelah diekstrak, kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* yang bertujuan untuk memekatkan ekstrak dan memisahkan antara pelarut dan senyawa aktif *P. cruentum* (Hasiib, 2014), sehingga uji aktivitas antibakteri tidak terpengaruh oleh zat pelarut untuk ekstraksi. Ekstrak methanol dipekatkan pada suhu 40°C dengan putaran 25-60 rpm. Setelah didapatkan ekstrak pekat, dihitung volume yang dibutuhkan untuk mendapatkan larutan

induk dengan konsentrasi sebesar 500.000 ppm. Untuk membuat konsentrasi 500.000 ppm, maka dibutuhkan 4 gram hasil ekstrak, kemudian dilarutkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 8 ml DMSO 10%. Setelah didapatkan larutan induk, dibuat konsentrasi yang dibutuhkan yaitu; 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm. Pembuatan konsentrasi masing-masing ekstrak akan disertakan dalam **Lampiran 1**.

Setelah hasil ekstraksi didapatkan, maka dihitung rendemen ekstrak yang dihasilkan. Rendemen ekstrak adalah perbandingan antara bobot ekstrak yang dihasilkan (gram) dengan bobot sampel awal sebelum diekstraksi (gram). Rendemen ekstrak digunakan untuk menentukan persentase kandungan bahan bioaktif yang terdapat pada suatu bahan. Presentase rendemen ekstrak dihitung dengan rumus sesuai dengan Pasaribu dan Setyawati (2011):

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak pekat (g)}}{\text{bobot sampel yang diekstrak (g)}} \times 100 \%$$

Adapun prosedur ekstraksi pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Mikroalga bubuk

- Menyiapkan mikroalga bubuk sebanyak 4 gram
- Memasukkan ke dalam vessel pada MAE
- Menambahkan pelarut methanol sebanyak 40 ml
- Mengelap permukaan luar vessel dengan tisu agar kering
- Memasukkan masing – masing vessel ke dalam wadah *ceramic vessel jacket*
- Memasukkan *stirrer* ke dalam vessel nomer 2-16
- Memasang P/T-Sensor Accessory pada vessel nomer 1

Ditutup semua *ceramic vessel jacket* dengan *screw cap* sampai rapat

Ditutup semua *ceramic vessel jacket* dengan *screw cap* sampai rapat

- Memasukkan *ceramic vessel jacket* ke Rotor 16 SOLV
- Memasukkan ke Rotor 16 SOLV ke dalam *Multiwave PRO SOLV*
- Men-setting alat MAE dengan suhu ekstraksi 60°C selama 20 menit
- Menutup pintu *Multiwave PRO SOLV*, klik tombol *start*
- Menunggu hingga terdapat error, apabila tidak muncul, maka tidak terdapat kesalahan pada awal hingga akhir proses peletakkan Rotor 16 SOLV
- Menunggu hingga proses *cooling* selesai
- Membuka pintu *Multiwave PRO SOLV*
- Mengeluarkan Rotor 16 SOLV dari *Multiwave PRO SOLV*
- Mengambil *ceramic vessel jacket* dan dibuka *screw cap* di dalam *Multiwave PRO SOLV*, agar uap dari pelarut yang tersisa di dalam *vessel* keluar dan menguap di dalam *Multiwave PRO SOLV*
- Menuang hasil ekstrak ke dalam Erlenmeyer atau wadah

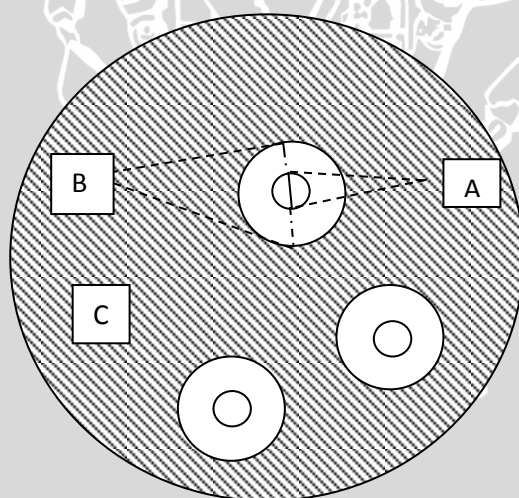
Hasil

3.9.2 Uji Daya Hambat Bakteri Dengan Metode Kertas Cakram

Uji daya hambat yang dilakukan dengan menggunakan teknik difusi kertas cakram. Sebelum uji daya hambat dilakukan, bakteri *vibrio harveyi* yang telah diremajakan 1 x 18-24 jam diambil beberapa ose kemudian dihomogenkan ke dalam larutan Na Fisiologis 10 ml dengan bantuan vortex. Langkah selanjutnya bakteri yang sudah homogen tersebut dicocokkan dengan Standar Mc Farlan 10⁵. Inokulasi bakteri ke permukaan media TCBSA di cawan dilakukan dengan mencelupkan *cotton swab* ke dalam kultur bakteri yang berada di dalam larutan Na Fis. Kertas cakram diletakkan di tengah media menggunakan pinset yang steril. Agar kertas cakram yang digunakan tidak bergeser, maka kertas

cakram dapat ditekan ke medium (Cappuccino dan Sherman, 2011). Kemudian masing-masing ekstrak ditetaskan ke kertas cakram sehingga di dalam satu cawan terdapat 3-4 kertas cakram yang berisi konsentrasi *P. cruentum* yang berbeda (200.000, 250.000, 300.000, 350.000 ppm), satu cawan mewakili satu kali ulangan. Sedangkan kontrol positif dan kontrol negatif berada pada cawan lain.

Langkah selanjutnya, cawan petri diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, cawan petri diperiksa bila terdapat zona hambat di sekitar kertas cakram, maka terdapat penghambatan akibat ekstraksi mikroalga tersebut. Zona tersebut diukur panjang diameternya, sehingga didapatkan data kuantitatif yang dapat dibandingkan dengan sampel lain. Zona diukur dari pinggir kertas cakram hingga bagian terluar zona hambat (Brown, 2005). Diameter zona hambat dideskripsikan pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Perhitungan diameter zona hambat antibakteri (Pratiwi, 2008)

Keterangan:

A = diameter kertas cakram (mm)

B = diameter zona hambat yang terbentuk (mm)

C = daerah yang ditumbuhi bakteri (zona arsir)

Cara menghitung zona hambat yaitu:

$$\text{Zona Hambat} = \text{Diameter Zona Hambat} - \text{Diameter Kertas Cakram}$$

Adapun prosedur Uji Daya Hambat pada penelitian ini adlaah sebagai berikut:

Bakteri yang telah diremajakan 1 x 24 jam

- Mengambil bakteri dengan menggunakan jarum ose, dimasukkan ke dalam Na Fis 10 ml
- Menyamakan kekeruhan bakteri dengan standar Mc Farlan 10^5
- Mencelupkan jarum ose ke dalam Na Fis yang telah berisi bakteri 10^5
- Menggoreskan ke media TCBSA
- Menaruh kertas cakram di atas media yang berisi bakteri dengan menggunakan pinset
- Meneteskan ekstrak mikroalga *P. cruentum* masing – masing konsentrasi ke atas masing -masing kertas cakram sebanyak 20 μ l dengan mikropipet
- Menginkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 1 x 18 - 24 jam
- Mengukur diameter yang terbentuk di sekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong

Hasil

3.9.3 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Selain menggunakan Uji Daya Hambat, uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menguji MIC atau uji konsentrasi daya hambat minimum. Total perlakuan yang diberikan dalam penelitian ini yaitu 6 perlakuan; ekstrak *P. cruentum* sebanyak 4 konsentrasi berbeda; 250.000, 300.000, 350.000, 400.000 ppm serta kontrol positif (tanpa bakteri) dan kontrol negatif (tanpa ekstrak *P. cruentum*).

Uji MIC dilakukan dengan menyiapkan 6 buah tabung reaksi yang telah disterilisasi, kemudian pada setiap tabung diisi dengan media TSB masing – masing tabung sebanyak 4 ml, kemudian disterilisasi di dalam autoklaf pada

suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, kelima tabung diberi konsentrasi masing – masing ekstrak *P. cruentum* berbeda dan streptomisin sebanyak 1 ml. Setelah diberi ekstrak, diambil bakteri yang sudah dicocokkan dengan standar McFarlan 10⁵ menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing – masing 1 ml.

Semua tabung reaksi tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, kemudian diamati dan dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif. Konsentrasi sampel terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (ditandai secara visual atau bantuan alat oleh pengamat) ditentukan sebagai Kadar Hambat Minimum atau *Minimum Inhibitory Concentration*, dikutip dari Salima (2014). Secara visual, nilai MIC merupakan media yang berwarna bening pertama kali mendekati kontrol positif. Setelah diamati tingkat kekeruhannya dengan visual, maka dilakukan juga pengamatan kekeruhan dengan menggunakan spektrofotometer agar lebih akurat. Nilai absorbansi media yang mendekati nilai absorbansi kontrol positif merupakan nilai MIC. Larutan yang dimasukkan pertama kali ke dalam cuvet yang berada di spektrofotometer yaitu media TSB sebagai larutan blanko, kemudian diatur gelombang absorbansi pada 600 nm yang mengacu pada penelitian Evan (2009), untuk melihat absorbansi *V. harveyi* digunakan gelombang absorbansi 600 nm. Kemudian cuvet dibilas menggunakan akuades dan dimasukkan masing-masing media yang akan dilihat kekeruhannya dan ditandai yang hasilnya mendekati kontrol positif. Menurut Assidqi *et al.* (2012), apabila nilai kekeruhan mendekati kontrol positif saat diukur oleh spektrofotometer, maka nilai tersebut merupakan nilai MIC. Adapun prosedur Uji MIC adalah sebagai berikut:

Bakteri yang telah diremajakan 1 x 24 jam

- Mengambil bakteri dengan menggunakan jarum ose, dimasukkan ke dalam Na Fis 10 ml

Disamakan kekeruhan dengan standar Mc Farlan 10⁵

Disamakan kekeruhan dengan standar Mc Farlan 10⁵

- Menyiapkan media TSB steril di dalam 7 tabung reaksi masing-masing sebanyak 4 ml, dipisah 1 tabung sebagai larutan blanko pada spektrofotometer
- Memasukkan ekstrak mikroalga *P. cruentum* masing-masing konsentrasi sebanyak 1 ml masing – masing di 4 tabung reaksi
- Memasukkan streptomisin 10.000 ppm sebanyak 1 ml ke dalam 1 tabung reaksi sebagai kontrol positif, satu tabung dibiarkan tanpa penambahan antibiotik (kontrol negatif)
- Memasukkan bakteri *V. harveyi* ke dalam masing – masing tabung sebanyak 1 ml
- Menginkubasi tabung reaksi selama 1 x 18-24 jam
- Mengambil larutan media TSB sebanyak 4 ml, dimasukkan ke dalam *cuve*t pada spektrofotometer (sebagai blanko)
- Mengukur absorbansi pada gelombang 600nm
- Membuang media dalam *cuve*t, dibilas dengan akuades
- Memasukkan media yang berisi bakteri dan mikroalga *P. cruentum* 250.000 ppm ke dalam *cuve*t, dilihat absorbansinya, dicatat
- Membuang media dalam *cuve*t, dibilas dengan akuades
- Memasukkan media yang lain satu persatu
- Mencatat hasil, dilihat nilai yang mendekati kontrol positif

Hasil

3.9.4 Uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Langkah pertama yang dilakukan untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum atau *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), diambil satu ose dari masing-masing media TSB yang digunakan dalam uji MIC pada observasi

sebelumnya, lalu digoreskan pada media TCBS agar, mengacu pada penelitian Assidqi *et al.* (2012). Lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Pada penelitian Roihanah *et al.* (2012), dalam uji MIC dan MBC, bakteri *V. harveyi* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, pembacaan hasil dilakukan dengan melihat konsentrasi yang tidak ditemukannya pertumbuhan bakteri. Menurut Salima (2014) dan Garba *et al.* (2013), nilai Kadar Bunuh Minimum atau MBC ditentukan pada konsentrasi terkecil dimana pada media agar tidak lagi ditemukan pertumbuhan koloni bakteri. Adapun prosedur dari Uji MBC pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

Media hasil Uji MIC

- Mengambil satu ose bakteri dengan menggunakan jarum ose
- Menggoreskan ke media TCBSA
- Menginkubasi selama 1 x 18 – 24 jam

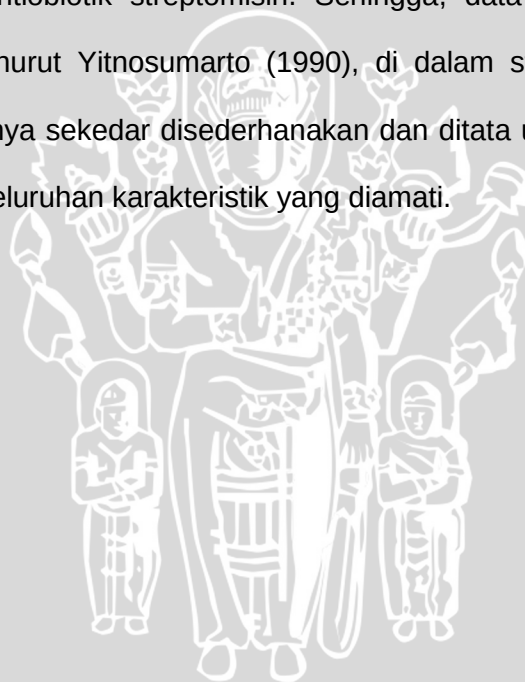
Hasil

3.7 Analisis Data

Pengamatan zona hambat diamati secara kualitatif dan kuantitatif kemudian dianalisis keragamannya dengan menggunakan uji *Analysis of Varian* (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji ANOVA dilakukan dengan bantuan software SPSS. Sebelum dilakukan uji ANOVA, maka terdapat tiga asumsi yang harus dipenuhi terlebih dahulu; data harus dipilih secara acak, data harus berdistribusi normal, serta data bersifat homogen hal tersebut sesuai dengan pernyataan Usman dan Akbar (2012). Setelah tiga asumsi tersebut dipenuhi, maka data dapat dilanjutkan dengan uji ANOVA. Namun apabila tidak terpenuhi, maka data ditransformasikan seperti pernyataan Sugandi dan Sugiarto (1994). Uji ANOVA bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat pengaruh yang berbeda antara konsentrasi ekstrak mikroalga yang berbeda terhadap daya

hambat bakteri *V. harveyi*. Apabila berbeda nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 5% dan 1% atau uji Duncan untuk mengetahui perbedaan rata-rata (mean) zona hambat bakteri *V. harveyi* dengan pemberian konsentrasi mikroalga *P. cruentum* sebesar 250.000, 300.000, 350.000, dan 450.000 ppm. Hal tersebut didukung dengan pernyataan Sampurna dan Nindhia (2013), bahwa uji BNT atau uji Duncan dilakukan untuk mengetahui perbedaan rata-rata dari data.

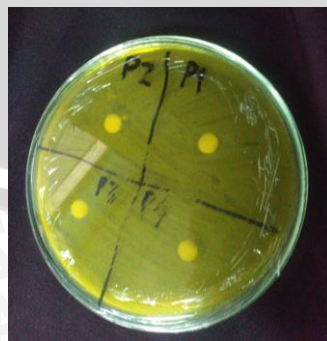
Data pada Uji Daya Hambat yang diperoleh pada tiap konsentrasi memiliki nilai sebesar nol, kecuali pada perlakuan kontrol positif, yaitu perlakuan dengan pemberian antibiotik streptomisin. Sehingga, data cukup dijelaskan secara deskriptif. Menurut Yitnosumarto (1990), di dalam statistika deskriptif, data yang didapat hanya sekedar disederhanakan dan ditata untuk memperoleh gambaran secara keseluruhan karakteristik yang diamati.



IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan dengan uji cakram menggunakan konsentrasi yang dikutip dari jurnal Kusmiyati dan Agustini (2007), dimana konsentrasi *P. cruentum* yang digunakan untuk menghambat bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* adalah 6.000, 7.500, 8.000, dan 10.000 ppm. Berdasarkan konsentrasi tersebut, maka dibuat konsentrasi sebesar 4.000, 6.000, 8.000, dan 10.000 ppm. Karena tidak terdapat zona hambat pada konsentrasi tersebut maka konsentrasi dinaikkan menjadi 8.000, 10.000, 12.000, dan 14.000 ppm. Kemudian konsentrasi dinaikkan kembali menjadi 20.000, 25.000, 30.000, dan 35.000 ppm. Pada konsentrasi tersebut tidak terdapat zona hambat, sehingga konsentrasi dinaikkan kembali sebesar 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm, namun zona hambat tidak tampak. Pada uji selanjutnya, dicoba uji dengan ekstrak hasil maserasi, namun zona hambat tidak tampak juga. Zona hambat tetap tidak muncul meskipun konsentrasi dinaikkan hingga sangat tinggi dan diberi perlakuan dengan hasil ekstraksi yang berbeda, sehingga Uji Daya Hambat tetap dilanjutkan dengan memakai konsentrasi terakhir yaitu 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm.



Gambar 5. Hasil Uji Daya Hambat ekstrak *P. cruentum* dengan dosis 8.000, 10.000, 12.000, dan 14.000 ppm

Zona hambat yang tidak terbentuk salah satunya dapat dilihat pada **Gambar 5**, yaitu Uji Daya Hambat pada konsentrasi 8.000, 10.000, 12.000 dan 14.000 ppm. Pada konsentrasi tersebut, seluruh permukaan kertas cakram tertutupi bakteri *Vibrio harveyi* yang berwarna kuning. Apabila terbentuk zona hambat, maka terbentuk zona / daerah yang berwarna bening di sekeliling kertas cakram. zona bening tersebut menandakan bila bakteri yang berada di sekitar kertas cakram terhambat pertumbuhannya oleh ekstrak *P. cruentum*. Adapun hasil dari Uji Daya Hambat pada penelitian Pendahuluan dapat dilihat pada **Lampiran 3**.

Pada ekstraksi menggunakan metode maserasi, dihasilkan ekstrak dengan berat sebesar 18.59 gram, yang berasal dari 90 gram mikroalga bubuk. Berdasarkan berat hasil ekstrak tersebut, sehingga diperoleh rendemen ekstrak maserasi sebesar 20,66 %. Gambar hasil ekstrak menggunakan metode maserasi dapat dilihat pada **Gambar 6**. Uji Daya Hambat menggunakan alat MAE tidak menghasilkan zona hambat, oleh karena itu dilakukan uji Daya Hambat dengan ekstrak *P. cruentum* yang didapatkan dengan metode maserasi pada suhu ruang. Uji Daya Hambat tersebut dilakukan hanya dengan satu kali ulangan, namun tidak didapatkan hasil seperti yang ditunjukkan pada **Lampiran 3**, sehingga pada uji selanjutnya ekstrak hasil maserasi ini tidak digunakan kembali.



Gambar 6. Hasil Ekstraksi Metode Maserasi

4.2 Ekstraksi

Ekstraksi *Porphyridium cruentum* menggunakan alat MAE menghasilkan ekstrak kasar sebanyak 1.265 ml yang berasal dari 35,5 gram *P. cruentum* kering. Hasil ekstrak yang dihasilkan (**Gambar 7**) kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* dan dihasilkan pellet sebanyak 7,17 gram. Perbandingan bobot ekstrak sebelum dan sesudah ekstraksi berupa rendemen yang didapatkan adalah sebanyak 20,20 %.



Gambar 7. Hasil estraksi *P. cruentum* dari alat MAE

Rendemen yang dihasilkan dari ekstraksi methanol *P. cruentum* menggunakan alat MAE lebih sedikit apabila dibandingkan dengan metode maserasi seperti pada penelitian ini, berbeda dengan hasil dari metode maserasi dari beberapa referensi yang terdapat pada **Tabel 5**. Meskipun begitu, membandingkannya harus dengan hati-hati karena beberapa faktor tidak sama. Pada penelitian Barqi (2015), rendemen yang dihasilkan MAE hanya 0,547%. Berbeda dengan penelitian ini, yang dilakukan dengan bantuan MAE menghasilkan rendemen sebesar 20,19 %. Diduga hasil tersebut dipengaruhi oleh jenis pelarut, karena Barqi (2015) memakai akuades sebagai pelarut. Bila dibandingkan dengan metode sonikasi pada penelitian Sani *et al.* (2014), rendemen yang dihasilkan sonikasi lebih banyak dari hasil ekstrak yang

menggunakan alat MAE dan maserasi pada penelitian ini. Rendemen yang dihasilkan menggunakan metode sonikasi didapatkan sebesar 30,97%.

Tabel 5. Hasil Rendemen Ekstraksi Beberapa Jenis Mikroalga

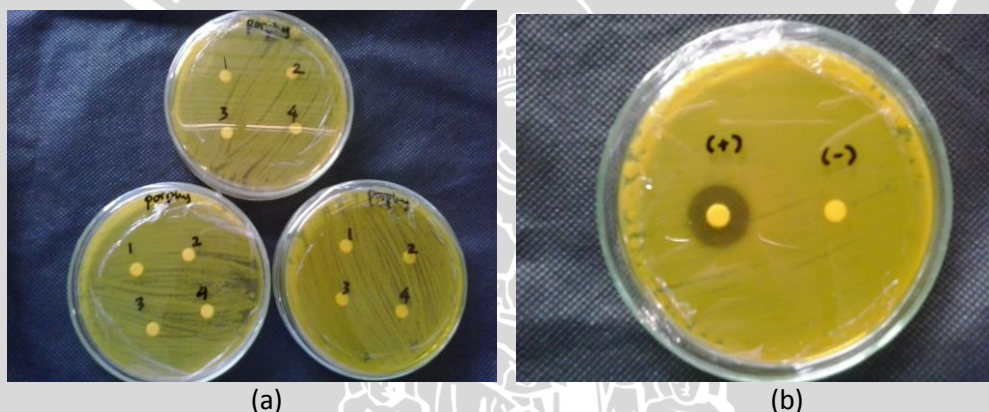
Jenis mikroalga	Jenis pelarut	Rasio pelarut (b:v)	Lama ekstraksi, suhu	Metode ekstraksi	Rendemen ekstrak (%)	Referensi
<i>Tetraselmis chuii</i>	Ethanol 70%	1:5	15 menit, suhu ruang	Sonikasi	30,97	Sani <i>et al.</i> , 2014
<i>Tetraselmis chuii</i>	Methanol	1:5	72 jam, suhu ruang	Maserasi	23,69	Maligan <i>et al.</i> , 2015
	Kloroform				3,31	
	Aseton				29,92	
<i>Chlorella</i> sp	n-heksana	1:8	6-8 jam, 80°C	Sokhletasi	6,28%	Kumalasari <i>et al.</i> , 2014
<i>Chlorella</i> sp.	Methanol	1:5	24 jam, suhu ruang	Maserasi	7,001	Bariyyah <i>et al.</i> , 2013
	Etil asetat				3,673	
<i>Porphyridium cruentum</i> (dalam media Becker)	Ethanol 96%	1:6	30 menit, suhu ruang	Maserasi	18,2	Kosasih, 2011
<i>Chlorella</i> sp.	akuades	1:4	20 menit	MAE	0,547	Barqi, 2015
<i>Porphyridium cruentum</i>	methanol	1:10	20 menit	MAE	20,19	Penelitian ini
			5 hari	Maserasi	20,66	

Keterangan: b = berat, v = volume

Sedangkan pada hasil penelitian Maligan *et al.* (2015) yang menggunakan metode maserasi, rendemen yang didapatkan sebesar 23,69 % dengan pelarut methanol. Penelitian tersebut menggunakan metode dan pelarut yang sama dengan penelitian ini, namun rendemen yang dihasilkan lebih banyak dari rendemen hasil maserasi pada penelitian ini. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor lain yang berbeda seperti lama ekstraksi, perbandingan pelarut seperti yang dikutip dari Ghomi dan Ghasemzadeh, (2011), rendemen yang dihasilkan suatu ekstrak dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya yaitu jenis pelarut, rasio pelarut, lama ekstraksi, suhu, metode ekstraksi, dll.

4.3 Uji Daya Hambat Bakteri dengan Menggunakan Metode Kertas Cakram

Uji daya hambat pada konsentrasi 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 ppm tidak menghasilkan zona hambat meskipun dosis telah dinaikkan dari 14.000 ppm hingga 400.000 ppm (**Gambar 8**). Pada gambar tersebut tampak bahwa kertas cakram ditumbuhi bakteri yang *V. harveyi* dilihat dari warnanya yang berwarna kuning. Berbeda dengan kontrol positif, yang diberi tambahan antibiotik konvensional, tampak di sekeliling kertas cakram terdapat zona bening / daerah yang berwarna transparan. Hal tersebut menandakan bila bakteri yang berada di sekitar kertas cakram pada perlakuan kontrol positif terhambat pertumbuhannya.



Gambar 8. Hasil uji daya hambat pada (a) konsentrasi 250.000, 300.000, 350.000, 400.000 ppm dan (b) kontrol positif serta negatif

Pada **Tabel 6**, dapat dilihat bila hanya perlakuan kontrol positif, yaitu penambahan larutan antibiotik konvensional (streptomisin) yang menghasilkan zona hambat. Berdasarkan data yang diperoleh, data cukup dibandingkan dan dijelaskan secara deskriptif, karena hanya terdapat satu perlakuan yang berbeda. Tidak terdapat perbedaan zona hambat bakteri yang terbentuk akibat pengaruh konsentrasi *P. cruentum* yang berbeda, karena pada seluruh konsentrasi *P. cruentum* tidak ditemukan zona hambat. Sedangkan seluruh perlakuan pemberian konsentrasi *P. cruentum* sangat berbeda bila dibandingkan dengan kontrol positif.

Tabel 6. Hasil pengukuran diameter zona hambat pada Uji Daya Hambat Menggunakan Metode Kertas Cakram

Perlakuan	Diameter Zona Hambat (mm)		
	Ulangan		
	1	2	3
250.000 ppm	0	0	0
300.000 ppm	0	0	0
350.000 ppm	0	0	0
400.000 ppm	0	0	0
Kontrol (+)	11,9	9,2	9,4
Kontrol (-)	0	0	0

Keterangan: kontrol (+) = perlakuan dengan penambahan antibiotik konvensional (streptomisin), kontrol (-) = perlakuan tanpa penambahan antibiotik

Terdapat dugaan bila senyawa antibakteri yang berada di dalam ekstrak sangat sedikit yang terekstrak, sehingga pada saat konsentrasi dinaikkan tidak terdapat zona hambat meskipun ekstraksi dilakukan dengan menggunakan alat MAE. Salah satu faktor yang turut mempengaruhi zona hambat yang tidak terbentuk yaitu dari jenis pelarut yang digunakan pada saat ekstraksi. Methanol merupakan pelarut universal seperti ethanol, sehingga seluruh senyawa dapat terlarut ke dalam ekstrak dan senyawa antibakteri yang terekstrak sangat sedikit (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Diduga, suhu pada saat ekstraksi tidak berpengaruh terhadap kandungan senyawa aktif mikroalga, namun dugaan tersebut perlu dibuktikan lebih lanjut dengan penelitian. Hal tersebut didukung dengan penelitian yang dilakukan Kumalasari *et al.* (2014). Pada penelitian tersebut mikroalga *Chlorella* sp. diekstrak menggunakan metode sonifikasi pada suhu 80°C dan dapat menghambat bakteri *S. aureus* dengan zona hambat sebesar 1,8 – 3,5 mm. Sedangkan pada penelitian ini digunakan suhu ekstraksi sebesar 60°C namun tidak memberikan hasil.

Sedikitnya senyawa antibakteri yang terekstrak dapat disebabkan karena senyawa antibakteri yang ada di *P. cruentum* lebih banyak larut di dalam senyawa semi polar dan non polar, seperti pada penelitian Kusmiyati dan

Agustini (2007), dengan ekstrak *C. P. cruentum*, zona hambat paling besar terbentuk. Pada ekstrak C, terdapat kandungan lemak jenuh dan tidak jenuh yang memiliki jumlah atom karbon lebih dari sepuluh, sehingga dapat menyebabkan protoplas bakteri mengalami lisis, dan keluarnya bahan makanan dari dalam sel. Kerusakan tersebut akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan bahkan kematian bakteri uji (Naviner, 1999)

Berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Taskin *et al.* (2007), daya hambat atau efek bioaktif yang dihasilkan oleh mikroalga *Corallina officinalis* dengan ekstraksi pelarut yang sama, yaitu methanol, sangat besar. Daya hambat terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* yang dihasilkan mencapai 21,66 mm, 32,00 mm, 34,00 mm secara berturut-turut. Penelitian tersebut dilakukan dengan metode yang sama, yaitu metode difusi agar dengan menggunakan kertas cakram dengan pelarut methanol.

Berdasarkan hasil penelitian Bhagavathy *et al.* (2011), dengan menggunakan pelarut yang berbeda-beda jenis kepolarannya dalam ekstraksi mikroalga *Chlorococcum humicola* terhadap beberapa jenis bakteri menghasilkan zona hambat yang berbeda-beda. Bakteri yang menjadi target dari daya hambat yaitu *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Pada ekstrak dengan pelarut benzene menghasilkan 10-18 mm, ekstrak methanol menghasilkan daya hambat sebesar 0-12 mm, sedangkan ekstrak dengan pelarut etil asetat menghasilkan zona hambat sebesar 13-17 mm. benzene merupakan pelarut dengan jenis non polar (Pudyoko, 2010), methanol berjenis polar, sedangkan etil asetat merupakan pelarut jenis semi polar (Tanaya *et al.*, 2015). Sehingga dapat dilihat bila zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh bahan ekstrak dan jenis pelarut.

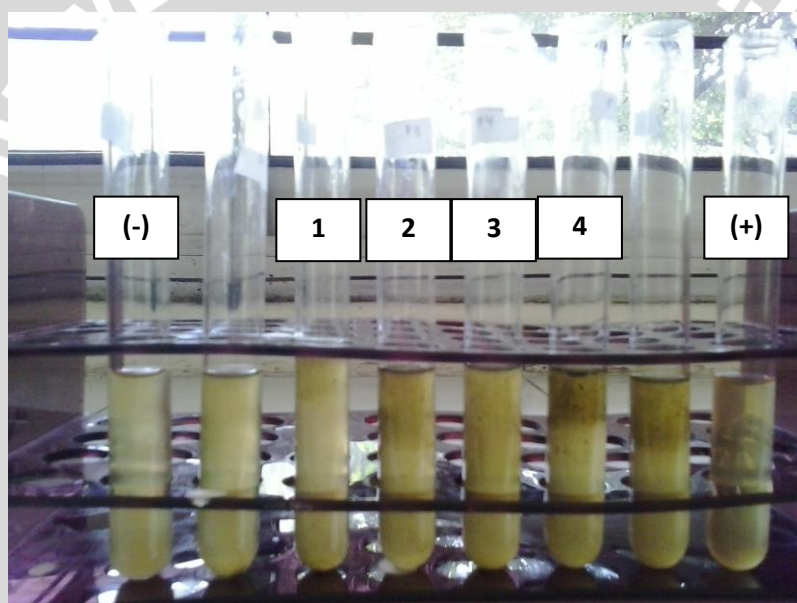
Tidak adanya hasil pada perlakuan ekstrak *P. cruentum* terhadap bakteri *V. harveyi* dapat dikarenakan konsentrasi yang diberikan kurang tinggi. Sehingga perlu ada penelitian lebih lanjut dengan perlakuan pemberian konsentrasi *P. cruentum* dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Hal itu dapat disebabkan karena struktur dan sifat bakteri dari *V. harveyi*. *V. harveyi* merupakan bakteri yang paling bersifat patogen di antara *Vibrio* lain seperti bakteri *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio anguillarum*. Presentase kematian larva udang windu yang terinfeksi *V. harveyi* sebesar 36,7 % dengan kepadatan 10^4 CFU/ml. Sementara itu mengalami penurunan pada *Vibrio* lain sebesar 16,7 %, 6,7 %, dan 3,3 % (Feliatra et al., 2014).

4.4 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Dapat dilihat pada **Gambar 9**, tabung yang diberi tanda (+) merupakan tabung kontrol positif dengan pemberian antibiotik konvensional, yaitu streptomisin. Sedangkan tabung kontrol negatif yaitu tabung yang ditandai dengan tanda (-), berisi media dengan 1 ml bakteri. Pada tabung yang diberi nomor 1 – 4 berisi media dengan konsentrasi ekstrak mikroalga *P. cruentum* yang berasal dari MAE secara berurutan; 250.000, 300.000, 350.000, 400.000 ppm.

Nilai MIC atau konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri pada penelitian ini tidak diketahui, karena seluruh konsentrasi berwarna keruh. Keruh pada media menandakan bila terdapat pertumbuhan bakteri pada media. Apabila media berwarna jernih atau mendekati tingkat kekeruhan media yang diberi antibiotik streptomisin, maka dapat dikatakan, konsentrasi yang berada pada media tersebut merupakan nilai MIC. Pada dosis terendah (250.000 ppm), media yang terdapat di tabung terlihat lebih keruh bila dibandingkan dengan kontrol negatif yang berisi bakteri dan media

saja. Semakin tinggi konsentrasi *P. cruentum* yang diberikan, media terlihat lebih keruh (**Gambar 9**) bahkan nilai absorbansi ikut meningkat (**Tabel 7**). Diduga kekeruhan pada media selain dipengaruhi oleh bakteri, dipengaruhi juga oleh bahan ekstraksi yaitu ekstrak *P. cruentum*. Hal ini diperkuat penelitian Assidqi *et al.* (2012), semakin tinggi ekstrak daun patikan kebo, maka nilai *Optical Density* (OD) atau nilai absorbansi yang dihasilkan semakin tinggi. Hal tersebut menunjukkan bila nilai absorbansi berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak. Ekstrak *P. cruentum* terlalu pekat sehingga mempengaruhi pembacaan nilai absorbansi pada spektrofotometer.



Gambar 9. Hasil uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak *P. cruentum*

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Ardananurdin *et al.* (2004) konsentrasi larutan dekok bunga belimbing wuluh 10 % berwarna jernih seperti kontrol bahan. Sementara itu, pada konsentrasi di bawah 10 % media menunjukkan tingkat kekeruhan yang berbeda. Pada konsentrasi di atas 10 % yaitu 12,5 % dan 15 % menunjukkan tingkat kejernihan yang lebih jernih dibandingkan dengan 10% dan kontrol bahan, sehingga konsentrasi 10 % merupakan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

(MIC). Pada penelitian Roihanah *et al.* (2014), nilai MIC ditentukan dengan media yang terlihat agak bening.

Tabel 7. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak *P. cruentum*

Konsentrasi (ppm)	Tingkat kekeruhan	
	Absorbansi Spektrofotometer (A)	Visual
250.000	0,444	Keruh
300.000	0,662	Keruh
350.000	0,543	Keruh
400.000	0,670	Keruh
Kontrol (+)	0,003	Bening
Kontrol (-)	0,256	Keruh

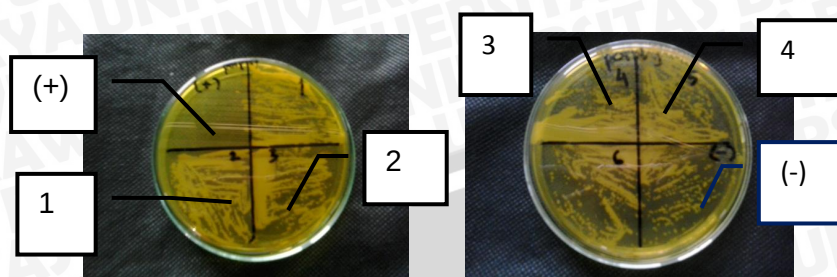
Keterangan: kontrol (+) = perlakuan dengan penambahan antibiotik konvensional (streptomisin), kontrol (-) = perlakuan tanpa penambahan antibiotik

Agar lebih diketahui secara akurat apakah terdapat bakteri yang terhambat pertumbuhannya, maka selain melihat kekeruhan dengan visual dan spektrofotometer diperlukan juga perhitungan bakteri dengan uji *Total Plate Count* (TPC). Sehingga dapat diketahui perlakuan dengan konsentrasi terendah yang paling dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Seperti pada penelitian Suciati *et al.* (2012), diketahui konsentrasi ekstrak *Rhizophora mucronata* terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yaitu pada konsentrasi 300 ppm, dimana bakteri yang ditanam berkurang secara signifikan dari 10^7 CFU/ ml menjadi $5,502 \times 10^3$ CFU/ml.

4.5 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Bagian cawan yang digores terdapat koloni bakteri yang tumbuh kecuali pada bagian yang berisi kontrol (+) atau streptomisin. Hal ini menandakan bila seluruh konsentrasi tidak bersifat bakterisidal, kecuali pada perlakuan kontrol positif, atau pada media yang berisi streptomisin 1 ml seperti pada **Tabel 8**. Dapat dilihat pula pada **Gambar 10**, seluruh media yang digoreskan terlihat ditumbuhi oleh bakteri, kecuali pada media dengan perlakuan pemberian kontrol positif yang ditandai dengan adanya tanda (+). Pemberian perlakuan konsentrasi

ekstrak 250.000, 300.000, 350.000, dan 400.000 berturut-turut ditunjukkan oleh nomor 1-4.



Gambar 10. Hasil Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Apabila tidak terdapat koloni bakteri yang tumbuh, maka dapat dikatakan bila konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi yang dapat mematikan bakteri. Sesuai pada penelitian Assidqi *et al.* (2012), dimana konsentrasi ekstrak daun patikan kebo terendah yang dapat mematikan bakteri *A. hydrophila* yaitu konsentrasi 0,312 %. Pada konsentrasi tersebut tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri, sedangkan konsentrasi di bawahnya masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri *A. hydrophila*. Sehingga konsentrasi 0,312 % merupakan nilai MBC. Menurut Edberg (1983), senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri, sehingga mengakibatkan permeabilitas terhadap sel bakteri dan difusi ke dalam sel, sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) atau mematikan (bakterisidal). Selain itu senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik bakteri yang mengakibatkan mutasi.

Tabel 8. Hasil Pengamatan *Uji Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Konsentrasi <i>P. cruentum</i> (ppm)	Hasil pengamatan
250.000	+
300.000	+
350.000	+
400.000	+
Kontrol positif	-
Kontrol negatif	+

Keterangan: (+) = terdapat pertumbuhan bakteri, (-) = tidak terdapat pertumbuhan bakteri

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil berdasarkan hasil penelitian ini yaitu:

- Tidak ada perbedaan pemberian ekstrak *P. cruentum* terhadap *V. harveyi* antara perlakuan pada penelitian ini karena tidak terdapat zona hambat ada seluruh perlakuan pemberian ekstrak mikroalga *P. cruentum*
- Tidak diketahui konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi*, karena seluruh media yang diberi ekstrak *P. cruentum* berwarna keruh
- Tidak diketahui konsentrasi terendah yang dapat mematikan pertumbuhan *V. harveyi*, sehingga ekstrak *P. cruentum* tidak bersifat bakterisidal terhadap *V. harveyi*. Hal tersebut ditunjukkan oleh media yang ditumbuhi oleh koloni bakteri

5.2 Saran

Penelitian ini dapat dikembangkan dengan mengganti pelarut polar menjadi pelarut yang bersifat semi polar dan non polar, sehingga senyawa zat *P. cruentum* yang bersifat non polar maupun semipolar dapat terekstrak lebih banyak. Disarankan untuk mencoba memakai mikroalga segar untuk menghindari pengaruh suhu terhadap rusaknya bahan. Selain itu, pada Uji MIC disarankan untuk menghitung kepadatan bakteri yang terdapat dalam media, sehingga didapatkan hasil yang lebih akurat untuk mencari nilai MIC.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2012. Difference Between *in vitro*, *in vivo*, and *in silico* Studies. http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies#in_vitro_studies. Diakses pada tanggal 26 Maret 2016
- Anonim. 2016. Microwave Digestion and Extraction: Rotor 16SOLV HF100. www.anton-paar.com. Diakses pada tanggal 1 Juni 2016
- Ardananuridin, A., S. Winarsih, M. Widayat. 2004. Uji efektifitas dekok bunga belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. **XX**(1):30 – 34
- Ariyanti, Dessy dan N. A. Handayani. 2010. Mikroalga sebagai Sumber Biomassa Terbarukan: Teknik Kultivasi dan Pemanenan, Fakultas Teknik, Universitas Diponegoro: Semarang
- Assidqi, K., W. Tjahjaningsih dan S. Sigit. 2012. Potensi Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta*) sebagai Antibakteri terhadap *Aeromonas Hydrophila* secara *in vitro*. *Journal of Marine and Coastal Science*. **1**(2): 113-124
- Austin, B dan X-H. Zhang. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant patogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*. **43**:119–124
- Bai, V. D. M., dan S. Krishnakumar. 2011. Evaluation of antimicrobial metabolites from marine microalgae *Tetraselmis suecica* using gas chromatography – mass spectrometry (gc – ms) analysis. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*. **5**(3): 17-23
- Bariyyah, S. K., A. G. Fasya, M. Abidin, A. Hanapi. 2013. Uji aktivitas antioksidan terhadap dpph dan identifikasi golongan senyawa aktif ekstrak kasar mikroalga *Chlorella* sp. hasil kultivasi dalam medium ekstrak tauge. *ALCHEMY*. **2** (3):150 – 204
- Barqi, W. S. 2015. Pengambilan minyak mikroalga *Chlorella* sp. dengan metode *microwave assisted extraction*. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. **4** (1) : 34-41
- Bhagavathy S., Sumathi, J. S. Bell I. 2011. Green algae *Chlorococcum humicola*- a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. S1-S7
- Bhakta, S., E. Sahu, dan A. K. Bastia. 2014. Microalgae: a potential source of bioactive metabolites. *Natural Products — Drug Development*. 21-39
- Bogdan, R., dan Biklen, S. 1992. Qualitative Research for Education. Boston, MA: Allyn and Bacon
- Brown, A. E. 2005. **Benson's Microbiological Applications Ninth Edition**. McGraw-Hill: New York. 413 hlm

- Buller, N. B. 2014. **Bacteria and Fungi from Fish and other Aquatic Animals: a Practical Identification Manual 2nd Edition**. Halstan Printing Group: UK. 919 hlm
- Cappuccino, J. G., dan N. Sherman. 2011. **Microbiology a Laboratory Manual Ninth Edition**. Pearson Education, Inc.: San Fransisco. 544 hlm
- CCALA. 2015. 415 *Porphyridium cruentum*.
<http://ccala.butbn.cas.cz/cs/node/13643>. Diakses pada tanggal 29 Maret 2016
- Cresswell, J. 1998. Research Design: Qualitative and Quantitative Approaches. Thousand Oaks, CA: Sage Publications
- Danyal, A., U. Mubeen dan K. A. Malik. 2013. Investigating two native algal species to determine antibiotik susceptibility against some pathogens. *Current Research Journal of Biological Sciences*. **5**(2): 70-74
- Dhobi, M., V. Mandal, S. Hemalatha. 2009. Optimization of microwave assisted extraction of bioactive flavonolignan – silybinin. *J. Chem. Metrl.* **3** (1): 13-23
- Edberg, S. C. 1983. **Tes kerentanan antimikroba. Dalam Antibiotika dan Infeksi**. Alih bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC
- Evan, Yan. 2009. Uji Ketahanan Beberapa Strain Larva Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*, *skripsi*, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Feliatra, Zainuri and D. Yoswaty. 2014. Pathogenitas bakteri *Vibrio* sp. terhadap udang windu (*Penaeus monodon*). *Jurnal Sungkai*. **2** (1) : 23-36
- Fitriannur. 2009. Aktivitas Antibakteri Propolis Lebah *Trigona* spp. Asal Pandeglang terhadap *Enterobacter sakazakii*, *skripsi*, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Furley Bioextract. 2017. Lighting up the World with Bioluminescence.
<https://furleybio.com/blog/lighting-up-the-world-with-bioluminescence/>. Diakses pada tanggal 5 Januari 2017
- Gan, S., R. Setiabudy, U. Sjamsudin, Z. S. Bustami. 1987. **Farmakologi dan Terapi Edisi 3**. Bagian Farmakologi FKUI: Jakarta. 793 hlm
- Garba, I., Umar, A.I., Abdulrahman, A.B., Tijjani, M.B., Aliyu, M.S., Zango, U.U. and Muhammad, A. 2013. Phytochemical and antibacterial properties of garlic extracts. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*. **6**(2): 45 - 48
- Ghomi, J, S, Ghasemzadeh, M, A. 2011. Ultrasound-assisted synthesis of dihydropyrimidine-2-thiones. *J. Serb. Chem. Soc.* **76**(5):679-684
- Harborne, J. B. 1987. **Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. ITB: Bandung. 354 hlm
- Harlina, H., A. Prajitno, E. Suprayitno, H. Nursyam, and Rosmiati. 2015. Potential study of kopasanda (*Chromolaena odorata* L.) leaves as antibacterial

- against *Vibrio harveyi*, disease causative agent of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabricius) post larvae. *J Aquac Res Development*. 6:10. 1-5
- Hasanah. 2011. Mikroenkapsulasi Biomassa *Porphyridium cruentum*. Skripsi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Hasiib, E. A. 2014. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) dalam Air Minum terhadap Performa Broiler, *skripsi*, Jurusan Peternakan Fakultas Pertanian Universitas Lampung
- Ilmiah, S. N., Z. Dwyana, dan A. Abdullah. 2015. Efektivitas Antimikroba Kultur Probiotik pada Media Fermentasi Alami dalam Menghambat Pertumbuhan *Vibrio* spp. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti* Fructus), *skripsi*, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta
- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. Puslit Dikdasmen, Lemlit UNY
- Ketchum, P. A. 1988. **Microbiology Concept And Applications**. John Wiley and sons: Canada
- Kosasih, Y. 2011. Aktivitas Komponen Antibakteri Mikroalga *Porphyridium Cruentum* terhadap Berbagai Jenis Bakteri Patogen, *skripsi*, Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Kumalasari, D., A. G. Fasya, T. K. Adi, A. Maunatin. 2014. Uji aktivitas antibakteri asam lemak hasil hidrolisis minyak mikroalga *Chlorella sp.* *ALCHEMY*. 3(2):163-172
- Kuncoro, M. 2009. Metode Riset untuk Bisnis & Ekonomi, Bagaimana Meneliti dan Menulis Tesis. Edisi 3. Erlangga: Yogyakarta
- Kusmiyati, N. W. S. Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. 8(1):48-53
- Lee, E.R. 1989. **Phycology**. Second edition, Cambridge: Cambridge University Press.
- Maligan, J. M., V. T. Widayanti, dan E. Zubaidah. 2015. Identifikasi senyawa antimikroba ekstrak mikroalga laut *Tetraselmis chuii* (kajian metode ekstraksi maserasi, jenis pelarut, dan waktu ekstraksi). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 16 (3):195-206
- Menendez, J.M.B., A. Arenillas, J. A. M. Diaz, L. Boffa, S. Mantegna, dan G. Cravotto. 2014. Optimization of microalgae oil extraction under ultrasound and microwave irradiation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 89 (11): 1779-1784
- Milles, M.B. and Huberman, M.A. 1984. *Qualitative Data Analysis*. London: Sage Publication
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa, dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. VII (2): 361-367

- Murniasih, T. 2003. Metabolit sekunder dari spons sebagai bahan obat-obatan. *Oseana*. **28**(3) : 27-33
- Naviner, M., J.-P. Berge' b, P. Durand b, H. Le Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. *Aquaculture* 174 : 15–24
- Nazri, N.A.A.M., N. Ahmat, A. Adnan, S. A. S. Mohamad, dan S. A. S. Ruzaina. 2011. *In vitro* antibacterial and radical scavenging activities of malaysian tabel salad. *African Journal of Biotechnology*. **10**(30): 5728-5735
- Neogen. 2015. TCBS Agar (7210).
http://www.neogen.com/Acumedial/pdf/ProdInfo/7210_PI.pdf. Diakses pada tanggal 18 April 2016
- Ningtyas, Rina. 2010. Uji Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Air Daun Kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack) R. M. Smith) sebagai Pengawet Alami terhadap *Escheria coli* dan *Staphylcoccus aureus*, skripsi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah: Jakarta
- Noviawaty. 2012. Faktor – faktor yang mempengaruhi konsumen membeli produk vetsin. *Jurnal Orasi Bisnis*. **7**: 37 – 43
- Nugroho, W. H. 1990. **Perancangan dan Analisis Percobaan**. GAneca Exact Bandung: Bandung. 163 hlm
- Ogbuli, J. N., C. C. Ogueke, I. C. Okoli and B. N Anyanwu. 2007. Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*. *African Journal of Biotechnology*. **6** (13) : 1544-1548
- Pasaribu, Gunawan Dan T. Setyawati. 2011. Aktivitas antioksidan dan toksisitas ekstrak kulit kayu raru (*Cotylelobium* sp.) : 322 - 330
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 1988. **Dasar- Dasar Mikrobiologi II**. UI-Press: Jakarta. 446-997 hlm
- Prajitno, A. 2007. Uji sensitifitas flavonoid rumput laut (*Eucheuma cottoni*) sebagai bioaktif alami terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Protein*. **15** (2): 66-71
- Pranajaya, R. H., A. Djunaedi, dan B. Yulianto. 2014. Pengaruh tembaga terhadap kandungan pigmen dan pertumbuhan mikroalga merah *Porphyridium cruentum*. *ILMU KELAUTAN*. **19** (2):97–104
- Pratiwi S.T. 2008. **Mikrobiologi Farmasi**. Penerbit Erlangga. Jakarta
- Prawira, Sandhi Yudha. 2014. Pemeriksaan *B. rucella* sp. pada Sampel Penyakit Hewan di Balai Besar Uji Standar Karantina Pertanian, skripsi Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Pudyoko, Sigit. 2010. Hubungan Paparan Benzene dengan Kadar Fenol dalam Urine dan Gangguan Sistem Hematopoietic pada Pekerja Instalasi BBM, Thesis Magister Kesehatan Lingkungan, Universitas Diponegoro: Semarang
- Purnama, I. 2014. Pengaruh Return on Asset (ROA), Return on Equity (ROE) dan Economic Value Added (EVA) terhadap Return Saham (Survey

pada perusahaan manufaktur yang Terdaftar di Bursa Efek Indonesia Periode 2008-2012), skripsi Universitas Widyatama: Bandung

- Rafiee, Z., S. M. Jafari, M. Alami and M. Khomeiri. 2011. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from olive leaves; a comparison with maceration. *The Journal of Animal & Plant Sciences*. **21**(4):738-745
- Rahman, Dwi Abdia. 2011. Aktivitas Antihiperlikemik dari Biomassa dan Polisakarida Ekstraseluler *Porphyridium cruentum* sebagai Inhibitor α -Glukosidase, skripsi, Institut Pertanian Bogor: Bogor
- Rao, Venkateswara. 2016. Vibriosis in Shrimp Aquaculture. A Review Article. <http://neospark.com/> diakses pada tanggal 26 Juni 2016
- Rizky, Y. A., I. Raya, dan S. Dali. 2013. Penentuan Laju Pertumbuhan Sel Fitoplankton *Chaetoceros Calcitrans*, *Chlorella Vulgaris*, *Dunaliella Salina*, dan *Porphyridium cruentum*. Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Hasanuddin Makassar, Sulawesi Selatan
- Roihanah, S., S. Sukoso, S. Andayani. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak teripang *Holothuria* sp. terhadap bakteri *Vibrio harveyi* secara *In vitro*. *J.Exp. Life Sci.* **2**(1): 1-5
- Salima, Jeanna. 2014. Uji Daya Hambat dan Daya Bunuh Ekstrak Ethanol Bawang Putih (*Allium sativum* L.) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*, skripsi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung: Lampung
- Sampurna, I. P. dan T. S. Nindhia. 2013. Penuntun Praktikum dengan Rancangan Percobaan SPSS. Universitas Udayana: Bali
- Sani, R. N., F. C. Nisa, R. D. Andriani, dan J. M. Maligan. 2014. Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2**(2):121-126
- Saptiani, G., S. B. Prayitno, S. Anggoro. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap pertumbuhan *Vibrio harveyi* secara *in vitro*. *Jurnal Veteriner*. **13** (3) : 257-262
- Sastrosupadi, Adji. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian**. Kanisius: Yogyakarta. 276 hlm
- Satuhu, Suyanti dan Sri Yulianti. 2012. **Panduan Lengkap Minyak Asiri**. Penebar Swadaya: Jakarta. 204 hlm
- Saulnier, D., P. Haffner, C. Goarant, P. Levy, dan D. Ansquer. 2000. Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: a review. *Aquaculture*. 191:133–144
- Setyaningsih, I., E. Salamah, dan D. A. Rahman. 2013. Komposisi kimia dan aktivitas antihiperlikemik biomassa dan polisakarida ekstraseluler dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **16** (1): 79-85
- Setyaningsih, I., L. M. Panggabean, B. Riyanto, N. Nugraheny. 2006. Potensi antibakteri diatom laut *Skeletonema costatum* terhadap bakteri *Vibrio* sp. *Buletin Teknologi Hasil Perikanan*. **IX** (1). 61-70

- Soleha, T.U. 2015. Uji Kepekaan terhadap Antibiotik. Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Lampung
- Spolaore, Pauline and Joannis-Cassan, Claire and Duran, Elie and Isambert, Arsène. 2006. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **101**(6):201-211
- Suciati, A., Wardiyanto, dan Sumino. 2012. Efektifitas ekstrak daun *Rhizophora mucronata* dalam menghambat pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* dan *Vibrio harveyi*. *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. **1**(1): 1-8
- Sugandi, E. dan Sugiarto. 1994. **Rancangan Percobaan Teori dan Aplikasi**. Andi Offset Yogyakarta: Yogyakarta. 234 hlm
- Suwanto, A., M. Yuhana, E. Herawati, dan S. L. Angka. 1998. Genetic Diversity of Luminous *Vibrio* Isolated from Shrimp Larvae. Bogor Agricultural University: Bogor
- Tanaya, V., R. Retnowati, dan Suratmo. 2015. Fraksi semi polar dari daun mangga kasturi (*Mangifera casturi* Kosterm) *KIMIA STUDENT JOURNAL*. **1**(1): 778 - 784
- Taskin, E., M. Ozturk, E. Taskin, And O. Kurt. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the aegean sea (Turkey). *African Journal Of Biotechnology*. **6**(24):2746-2751
- Usman, H., dan P. S. Akbar. 2012. **Pengantar Statistika Edisi Kedua**. PT Bumi Aksara: Jakarta. 363 hlm
- Widanarni, D. Meha, S. Nuryati, Sukenda & A. Suwanto. 2004. Uji patogenisitas *Vibrio harveyi* pada larva udang windu menggunakan resisten rifampisin sebagai penanda molekuler. *Jurnal Akuakultur Indonesia*, **3**(3): 23-27
- Yitnosumarto, S. 1990. **Dasar – Dasar Statistika**. CV. Rajawali: Jakarta. 403 hlm
- Zulham, R. 2004. Potensi Ekstrak Mangrove *Sonneratia caseolaris* dan *Avicennia marina* untuk Pengendalian Bakteri *Vibrio harveyi* pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fabr.), skripsi, Institut pertanian Bogor: Bogor

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak *P. cruentum*

- **Larutan Induk 500.000 ppm**
 $= 500 \text{ g} / 1.000 \text{ ml DMSO } 10\%$
 $= 5 \text{ g} / 10 \text{ ml DMSO } 10\%$

Konsentrasi 250.000 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 500.000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml} \cdot 250.000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$$

Konsentrasi 300.000 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 500.000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml} \cdot 300.000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,2 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 1,2 \text{ ml} = 0,8 \text{ ml}$$

Konsentrasi 350.000 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 500.000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml} \cdot 350.000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,4 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 1,4 \text{ ml} = 0,6 \text{ ml}$$

Konsentrasi 400.000 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 500.000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml} \cdot 400.000 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 1,6 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 1,6 \text{ ml} = 0,4 \text{ ml}$$

Keterangan:

V_1 = volume larutan induk

N_1 = konsentrasi larutan induk

V_2 = volume ekstrak

N_2 = konsentrasi ekstrak

Lampiran 2. Dokumentasi Penelitian

- Ekstraksi Mikroalga



(a)



(b)



(c)



(d)

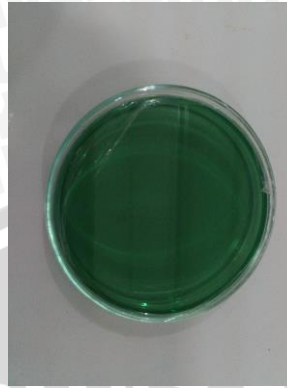
- (a) : alat *Microwaved Assisted Extraction*
- (b) : vessel sebagai wadah pelarut dan bahan yang akan diekstrak
- (c) : pengukuran methanol dan mikroalga
- (d) : penguapan sisa pelarut dengan *rotary evaporator*

Lampiran 2. Lanjutan

- Proses Pembuatan Media dan Penanaman Bakteri



(e)



(f)



(g)



(h)

- (e) : pembuatan media dan penanaman bakteri di dalam LAF
- (f) : media TCBS di dalam cawan petri
- (g) : media TSB steril
- (h) : pembuatan media TCBSA di kompor listrik

Lampiran 2. Lanjutan

- Uji Daya Hambat menggunakan Kertas Cakram



(i)



(j)

(i) : standar Mc Farlan

(j) : peletakkan kertas cakram ke atas media

- Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)



(k)



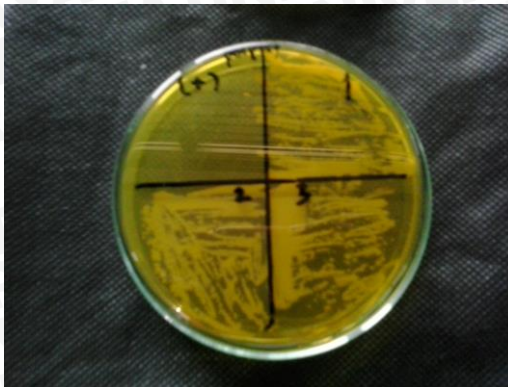
(l)

(k) : pembacaan nilai absorbansi pada spektrofotometer

(l) : media TSB yang berisi masing-masing konsentrasi sebelum diinkubasi

Lampiran 2. Lanjutan

- Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)



(m)



(n)

(m) : hasil uji MBC; kontrol positif, konsentrasi 200.000 ppm, 250.000 ppm, dan 300.000 ppm (searah jarum jam dari kiri atas)

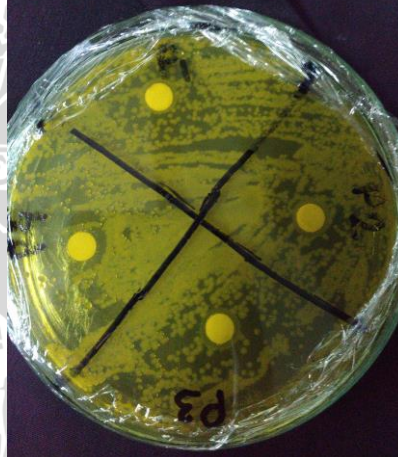
(n) : hasil uji MBC; 350.000 ppm, 400.000 ppm, 450.000 ppm, dan kontrol negatif (searah jarum jam dari kiri atas)



Lampiran 3. Hasil Uji Pendahuluan pada Uji Daya Hambat

Percobaan	Konsentrasi (ppm)	Diameter Zona Hambat (mm)	Dokumentasi	Keterangan
1	4.000	0	-	Menggunakan hasil ekstraksi dari alat MAE
	6.000	0		
	8.000	0		
	10.000	0		
2	8.000	0	-	Menggunakan hasil ekstraksi dari alat MAE
	10.000	0		
	12.000	0		
	14.000	0		
3	8.000	0		Menggunakan hasil ekstraksi dari alat MAE, diberi perlakuan perendaman ± 15 menit kertas cakram di dalam masing-masing konsentrasi ekstrak
	10.000	0		
	12.000	0		
	14.000	0		

Lampiran 3. Lanjutan

4	20.000	0			Menggunakan hasil ekstraksi dari alat MAE, diberi perlakuan perendaman ± 15 menit kertas cakram di dalam masing-masing konsentrasi ekstrak
	25.000	0			
	30.000	0			
	35.000	0			
5	250.000	0			Menggunakan hasil ekstraksi dari alat MAE, diberi perlakuan perendaman ± 30 menit kertas cakram di dalam masing-masing konsentrasi ekstrak
	300.000	0			
	350.000	0			
	400.000	0			
6	250.000	0			Menggunakan ekstrak hasil Maserasi, tanpa perendaman kertas cakram (ekstrak diteteskan ke atas kertas cakram)
	300.000	0			
	350.000	0			
	400.000	0			