

IDENTIFIKASI SENYAWA ANTIMIKROBA EKSTRAK MIKROALGA LAUT *TETRASELMIS CHUII* (KAJIAN METODE EKSTRAKSI MASERASI, JENIS PELARUT, DAN WAKTU EKSTRAKSI)

Identification of Antimicrobial Compounds of Microalgae Tetraselmis chuii Extract (Study the Maceration Extraction Method, Type of Solvent, and Extraction Time)

Jaya Mahar Maligan^{1*}, Vindhya Tri Widayanti², Elok Zubaidah¹

¹Jurusan Teknologi Hasil Pertanian - Fakultas Teknologi Pertanian - Universitas Brawijaya
Jl. Veteran - Malang 65145

²Akademi Kuliner dan Patiseri Ottimmo International
Jl. Telaga Golf TC-4/2-3 Citraland - Surabaya 60217

*Penulis Korespondensi: email: maharajay@gmail.com

ABSTRAK

Tetraselmis chuii dikenal sebagai mikroorganisme *photoautotroph* yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba sebagai metabolisme atau senyawa alelopati. Berkenaan dengan metabolit yang berharga, penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan informasi tentang ekstraksi dan identifikasi senyawa antimikroba oleh *T. chuii* menggunakan metode maserasi. Pada penelitian, rancangan acak dikerjakan untuk mengekstrak dan mengidentifikasi senyawa antimikroba oleh *T. chuii*. Dua faktor dan tiga tingkat yang diperlukan dalam penelitian ini. Faktor pertama adalah jenis pelarut (metanol (L1), kloroform (L2), dan aseton (L3)), kedua adalah waktu ekstraksi (24 (T1), 48 (T2), dan 72 (T3) jam). Hasil penelitian menunjukkan bahwa interaksi antara jenis pelarut dan waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang signifikan ($P < 0.05$) pada ekstrak hasil senyawa antimikroba. Hasil tertinggi dan terendah ekstrak senyawa antimikroba yang diperoleh di Runs L3T3 dan L2T1 sekitar, 29.92 dan 2.01%. Hasil menunjukkan bahwa diameter tertinggi zona bening diperoleh di Run L2T3, sekitar 14.30; 16.30; 13.33; 14.33 mm *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *A. flavus*. GC-MS digunakan sebagai alat bantu analisa senyawa antimikroba *T. chuii* yang meliputi asam lemak (asam 9-hexadecanoic, asam heksadecanoat (asam palmitat), asam 9-octadecenoic), alkan (Docosane, Tricosane, Eicosane, Nonadecane), cycloalkene (Cyclohexene), senyawa ester (asam heksadecanoat (etil ester), asam 1,2-benzenedicarboxylic), senyawa alkohol (Benzil alkohol), dan di-terpenoide (fitol dan 2,6,10-trimetil). Oleh karena itu, didapatkan hasil bahwa perlakuan terbaik dicapai ketika kloroform digunakan sebagai pelarut dengan waktu ekstraksi 72 jam (L2T3) dan menyebabkan diameter zona bening.

Kata kunci : Mikroalga, Maserasi, Senyawa Antimikroba, *Tetraselmis chuii*

ABSTRACT

Tetraselmis chuii, known as the *photoautotroph* microorganism, is capable of producing antimicrobial compound as their metabolic or allelopathic compound (capable of inhibiting growth of both competitors and predators). With regard to these valuable metabolites, this study was conducted to gain insight into extraction and identification of antimicrobial compound by *T. chuii* using maceration method. In this research, randomized block design was employed to extract and identify antimicrobial compound by *T. chuii*. Two factors and three levels are required in the experiment. The first factor is the type of solvent (methanol (L1), chloroform (L2) and acetone (L3)), and second is the extraction time (24 (T1); 48 (T2) and 72 (T3) hours). Results revealed that interaction between type of solvent and extraction time gave significant effect ($p < 0.05$) on yield extract of antimicrobial compounds. The highest and lowest yields extract of antimicrobial compound were obtained in Runs L3T3 and L2T1 approximately, 29.92 and 2.01%, respectively. Results further showed that the highest diameter of clear zone were obtained in Run L2T3, approximately 14.30; 16.30; 13.33; 14.33 mm of *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans*, and *A. flavus*, respectively. Therefore, using GC-

MS, antimicrobial compounds are present in *T.chuui* of which fatty acids (9-Hexadecanoic acid, Hexadecanoic acid (Palmitic acid), 9-Octadecenoic acid), alcane (Docosane, Tricosane, Eicosane, Nonadecene), cycloalcene (Cyclohexene), esthers compounds (Hexadecanoic acid (ethyl ester), 1,2-benzenedicarboxylic acid), alcoholic compound (Benzyl alcohol), and di-terpenoids (Phytol and 2,6,10-trimethyl). Therefore, it can be concluded that the best treatment were achieved when chloroform was employed as a solvent with the time of extraction 72 hours (L2T3) and leading to diameter of clear zone.

Keywords: Antimicrobial Compounds, Maceration, Microalgae, *Tetraselmis chuui*

PENDAHULUAN

Senyawa antimikroba merupakan senyawa yang berpotensi menghambat ataupun membunuh mikroorganisme (Dipasqua *et al.*, 2007). Senyawa antimikroba yang banyak digunakan antara lain antibiotik. Aplikasi penggunaan antibiotik memiliki beberapa kelemahan apabila digunakan secara berangsur-angsur. Kelemahan tersebut diantaranya adalah dapat memberikan efek resistensi pada mikroorganisme patogen, dan beberapa senyawa juga memberikan efek toksik (Martinez *et al.*, 2008; Chandrasekar, 2011).

Dewasa ini, penggunaan antibiotik sebagai senyawa antimikroba mulai dialihkan dengan memanfaatkan bahan alamiah, seperti tumbuhan (Karaman *et al.*, 2002) dan diharapkan dapat meminimalkan efek resisten terhadap mikroorganisme yang akan dihambat (Demain and Zhang, 2005). Namun, Burt (2004) menyatakan bahwa tumbuhan sebagai penghasil senyawa antimikroba memiliki beberapa kelemahan, diantaranya adalah masa tanam dan panennya yang relatif lama. Salah satu alternatif yang dapat digunakan sebagai penghasil senyawa bioaktif dengan masa tanam dan panen (kultivasi) yang lebih singkat yaitu mikroalga (Makridis *et al.*, 2006; Orpez *et al.*, 2009; Vratnica *et al.*, 2011).

Mikroalga merupakan mikroorganisme *fotoautotrof* yang berpotensi menghasilkan metabolit sekunder (Austin, 1992). Metabolit sekunder yang dihasilkan mikroalga bersifat allelopathic, yaitu mampu menghambat pertumbuhan kompetitor baik mikroorganisme maupun predator lainnya (Rice, 1984). Salah satu spesies mikroalga yang memiliki metabolit sekunder dengan kemampuan tersebut adalah *Tetraselmis chuui*. Lebih lanjut, Agustini (2009) melaporkan bahwa senyawa allelopathic yang terdapat pada *T.chuui* antara lain adalah 1,2-Benzenedicarboxylic acid, 1-Hepadecene, Palmitic acid, Hexadecanoic acid dan Bis(2-methylpropyl) ester.

Berdasarkan uraian di atas diperlukan adanya penelitian lebih lanjut dalam mengekstrak senyawa antimikroba dari *T.chuui*. Maserasi merupakan metode ekstraksi yang sederhana untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan (Hassel, 1996). Waktu yang digunakan dalam ekstraksi juga merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi konsentrasi ekstrak senyawa antimikroba (Ocaña dan Reglero, 2012). Selain itu, penggunaan berbagai macam polaritas pelarut akan memberikan pengaruh terhadap konsentrasi dan jenis senyawa antimikroba yang terekstrak (Romero *et al.*, 2005).

Penelitian mengenai eksplorasi senyawa antimikroba dari *T. chuui* sangat diperlukan, dengan berbagai macam pelarut dan waktu ekstraksi yang memiliki respon terbaik terhadap beberapa karakteristik, yaitu pengujian daya hambatnya terhadap *E. Coli*, *S. Aureus*, *C. Albicans*, dan *A. Flavus*. Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh akan dilakukan karakterisasi profil senyawa antimikroba yang terekstrak menggunakan *Gas Chromatography Mass Spectrometry* (GC-MS). Harapannya, dari penelitian ini diperoleh metode terbaik dalam ekstraksi senyawa antimikroba, sehingga dapat meningkatkan nilai tambah dari *T. chuui* yang nantinya dapat diaplikasikan secara massal pada industri pangan.

BAHAN DAN METODE

Alat

Alat-alat yang dibutuhkan dalam kultivasi mikroalga *Tetraselmis chuui* antara lain autoklaf, toples bening dengan kapasitas volume 16 L, lampu TL 6000 Lux, aerator, selang aerator, gelas arloji, spatula, gelas ukur, beaker glass 500 ml, serta timbangan analitik. Pemanenan mikroalga yang dibantu dengan sentrifus dingin (Hermle Z300K). Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi senyawa antimikroba dari *Tetraselmis chuui* antara lain *glassware*, timbangan analitik, *shaker water-*

bath, sentrifus dingin, kertas saring, *rotary vacuum evaporator* (Buchi switzerland, R 200), botol kaca ukuran 10 ml. Pada uji aktivitas antimikroba digunakan peralatan antara lain *glassware*, autoklaf, timbangan analitik, kompor listrik, cawan petri, mikropipet 10 μ l, 100 μ l, dan 1000 μ l, tip untuk mikropipet, inkubator, serta *laminar air flow* (LAF). Setelah dilakukan uji aktivitas antimikroba, selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa yang terkandung di dalam ekstrak senyawa antimikroba menggunakan alat GC-MS Merk Agilent Teknologi (spesifikasi bahan isian silika, fase CBP20 (polar)), gas pembawa nitrogen dengan kecepatan alir 160 kPa, suhu kolom 150-240 °C.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam kultivasi mikroalga antara lain kultur *Tetraselmis chuii* yang diperoleh dari Balai Budi daya Air Payau (BBAP) Situbondo, air laut, serta pupuk atau nutrisi tambahan antara lain Urea, EDTA, FeCl₃, ZA, dan TSP. Bahan yang digunakan dalam proses ekstraksi senyawa antimikroba dari mikroalga *T. chuii* antara lain pelarut aseton teknis, metanol PA, dan klorofom PA, sedangkan untuk uji aktivitas antimikroba, digunakan bakteri *E. coli* dan *S. aureus* dan juga digunakan jamur *C. albican*, dan *A. Flavus*. Bahan untuk menghilangkan sisa pelarut yang ada pada ekstrak senyawa antimikroba, digunakan gas nitrogen. Uji aktivitas antimikroba dibutuhkan media pertumbuhan berupa natrium broth (NB), natrium agar (NA), potato dextrose agar (PDA), potato dextrose broth (PDB). Selain media pertumbuhan, dalam uji aktivitas antimikroba dibutuhkan pula aquades, alkohol 70%, spirtus, dan kertas cakram.

Rancangan Percobaan

Penelitian ini dilaksanakan dengan menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) dua faktor. Faktor pertama adalah jenis pelarut (L) yang terdiri dari tiga level yaitu metanol (L1), kloroform (L2), dan aseton (L3), sedangkan faktor kedua adalah waktu ekstraksi (T) yang terdiri dari tiga level pula yaitu 24 (T1), 48 (T2), dan 72 (T3) jam. Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh 9 kombinasi perlakuan. Setiap perlakuan dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan waktu panen kultivasi mikroalga *T. chuii*, sehingga didapatkan 27 satuan percobaan.

Kultivasi Mikroalga *Tetraselmis chuii*

Air laut dengan total padatan terlarut (TPT) 31 ppt di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf suhu 121 °C tekanan 1 atm, selama 15 menit. Setelah itu di sterilisasi di tunggu hingga dingin. Air laut steril dipindahkan secara aseptis ke dalam toples bening yang sebelumnya telah disterilkan menggunakan alkohol 70%, kemudian ditambahkan 10% kultur stok *T. chuii* dari hasil kultivasi sebelumnya. Tambahkan pupuk atau nutrisi tambahan berupa urea sebanyak 0.08 g/L, TSP 0.015 g/L, ZA 0.02 g/L, FeCl₃ 0.002 g/L, EDTA 0.004 g/L, dikultivasi dengan aerasi 14 L/menit/L kultur selama 7 hari dengan cahaya 6000 lux yang berasal dari lampu TL. Setelah 7 hari kultivasi, kultur siap dipanen menggunakan sentrifus dingin dengan kecepatan 5000 rpm, selama 5 menit dengan suhu 10 °C (Modifikasi Rostini, 2007).

Ekstraksi Senyawa Antimikroba dari *Tetraselmis chuii*

Biomassa sel *Tetraselmis chuii* setelah disentrifus, ditimbang dan dilarutkan dengan pelarut yang berbeda-beda yakni metanol, klorofom, dan aseton dengan rasio biomassa sel : pelarut adalah 1:5 (b/v). Larutan ditempatkan dalam erlenmeyer 250, lalu dikocok menggunakan *shaker waterbath* selama 24, 48, dan 72 jam dengan suhu 27 °C, kemudian di shaker larutan di sentrifus dingin dengan dengan kecepatan 5000 rpm, suhu 10 °C, selama 30 menit, lalu dibuang endapannya. Pelarut di evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 35 °C, dan tekanan 1 atm, sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes. Hasil ekstrak diuapkan sisa pelarutnya menggunakan gas nitrogen. Selanjutnya, hasil ekstrak antimikroba siap untuk digunakan (Modifikasi Nugrahini, 2011).

Uji Aktifitas Senyawa Antimikroba

Sterilisasi alat, bahan, dan media agar yang akan digunakan dalam pengujian aktivitas antimikroba. Media agar dituang pada cawan petri secara aseptis dan ditunggu hingga agar memadat. Inokulasi suspense bakteri dan jamur sebanyak 100 μ l pada permukaan agar dengan metode spread plate. Selanjutnya, kertas cakram diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasi mikroba uji secara aseptis dengan menggunakan pinset. Ekstrak antimikroba diteteskan pada masing-masing permukaan kertas cakram sebanyak 10 μ l untuk bakteri, dan 20 μ l untuk

jamur. Mikroba uji selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk bakteri dan suhu 30 °C selama 5 hari untuk jamur (Modifikasi Nugrahini, 2011).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Rendemen Ekstrak Antimikroba dari *Tetraselmis chuii*

Rendemen suatu ekstrak dipengaruhi oleh beberapa hal, seperti metode ekstraksi yang dipilih, pelarut yang digunakan, rasio pelarut, lama ekstraksi, suhu, dan berbagai faktor lainnya (Ghomi dan Ghasemzadeh, 2011). Berdasarkan hasil analisa sidik ragam, jenis pelarut dan waktu ekstraksi memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap rendemen ekstrak antimikroba pada taraf kepercayaan 95%. Rendemen ekstrak yang didapatkan, dilihat perbedaannya lebih lanjut dengan menggunakan metode *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada Tabel 1.

Rendemen menggambarkan efektifitas suatu pelarut terhadap bahan dalam suatu sistem, tetapi tidak menunjukkan tingkat aktivitas ekstrak. Berdasarkan data Tabel 1, ekstraksi menggunakan aseton memiliki nilai rendemen ekstrak yang paling tinggi dibandingkan dengan ekstrak metanol maupun ekstrak kloroform. Hal ini karena diduga aseton memiliki nilai polaritas yang sesuai untuk mengekstrak sebagian besar komponen dalam sel mikroalga *T.chuii*. Konstanta dielektrikum yang dimiliki oleh kloroform adalah 4.8; aseton 20.7; dan 33 untuk metanol (Maulida dan Zulkarnaen, 2010).

Konstanta dielektrik berhubungan erat dengan polaritas suatu pelarut, semakin tinggi nilai konstanta dielektrik maka larutan tersebut semakin polar.

Rendemen juga dipengaruhi oleh waktu, sebab semakin lama waktu ekstraksi yang digunakan maka bahan yang terekstrak semakin meningkat pula. Namun dengan rasio tertentu antara bahan dan pelarut yang digunakan dapat menciptakan kondisi larutan yang jenuh sehingga penambahan waktu ekstraksi juga tidak memberikan efek peningkatan rendemen (Spigno dan De Faveri, 2007). Menurut Komara (1991), penambahan waktu ekstraksi pada larutan yang telah mencapai titik jenuh tidak memberikan hasil ekstrak yang lebih baik, bahkan merupakan suatu pemborosan.

Senyawa Antimikroba Pada *T. chuii* dari Ekstraksi Dengan Pelarut Berbeda

Ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda mampu melarutkan senyawa antimikroba yang berbeda pula. Pada penelitian ini, telah teridentifikasi delapan senyawa dalam hasil ekstraksi menggunakan pelarut metanol yang dianalisis dengan GC-MS. Puncak kromatogram yang terbentuk dari ekstraksi menggunakan pelarut metanol dapat dilihat pada Gambar 1. Pada gambar tersebut dapat dilihat terdapat 8 puncak kromatogram yang terbentuk.

Delapan senyawa yang teridentifikasi menggunakan GC-MS dari ekstraksi menggunakan pelarut metanol sebagian besar merupakan golongan asam lemak, alkena, dan flavonoid. Senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1. Rendemen ekstrak antimikroba dari *T. chuii* dengan berbagai pelarut dan waktu ekstraksi

| Perlakuan | | Rerata Rendemen (%) | Notasi | RP* DMRT 5% |
|-----------|-----------------------|---------------------|--------|-------------|
| Pelarut | Waktu Ekstraksi (jam) | | | |
| Metanol | 24 | 12.95 | b | 4.723246 |
| | 48 | 22.66 | cd | 4.834709 |
| | 72 | 23.69 | d | 4.904374 |
| Kloroform | 24 | 2.01 | a | 4.542119 |
| | 48 | 2.30 | a | 4.542119 |
| | 72 | 3.31 | a | 4.542119 |
| Aseton | 24 | 18.46 | c | 4.834709 |
| | 48 | 25.08 | d | 4.904374 |
| | 72 | 29.92 | e | 4.946172 |

*Keterangan : RP = wilayah nyata terpendek

Angka pada kolom dengan mempunyai huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada uji DMRT 5%

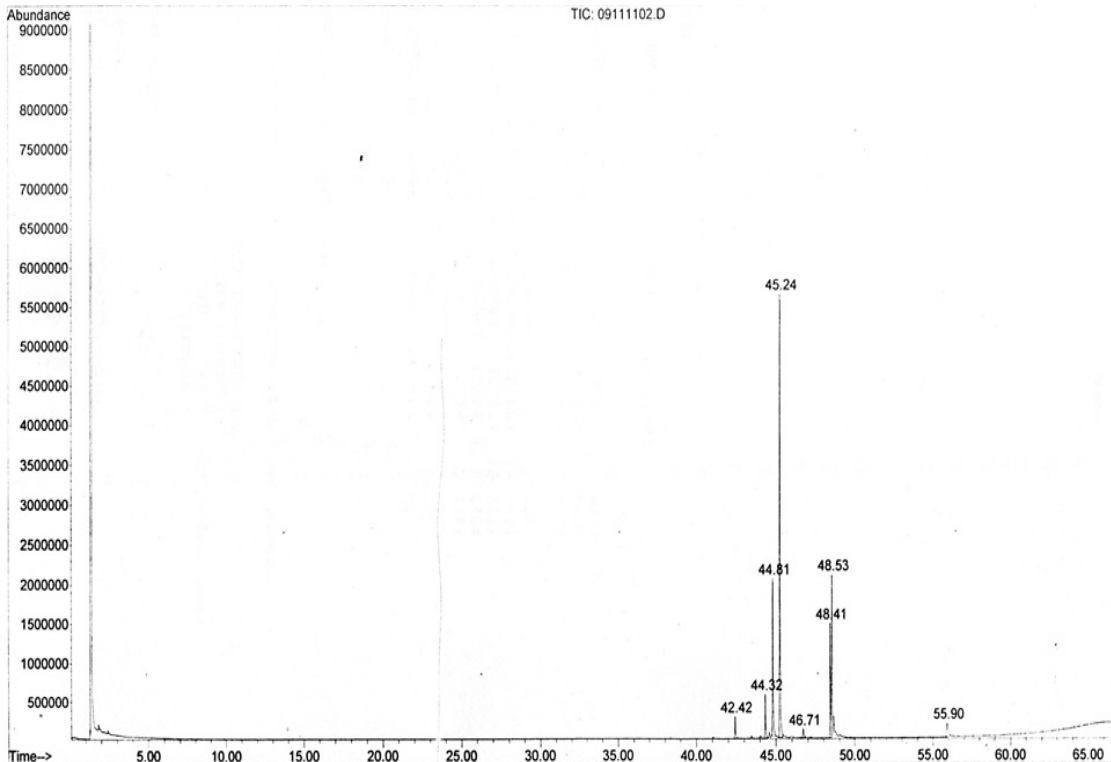
Apabila dilihat pada hasil analisa dengan menggunakan GC-MS, pelarut kloroform mampu mengekstrak 28 senyawa. Semua senyawa yang teridentifikasi ditunjukkan dengan puncak kromatogram yang terbentuk. Pada Gambar 2 dapat dilihat puncak kromatogram yang terbentuk dari ekstrak kloroform. Namun, beberapa senyawa yang sama memiliki beberapa perbedaan penguapan, sehingga senyawa tersebut akan terpisahkan menjadi beberapa bagian puncak kromatogram yang berbeda.

Senyawa yang terekstrak dengan menggunakan pelarut kloroform jumlahnya lebih banyak apabila dibandingkan dengan ekstrak metanol maupun aseton. Berdasarkan hasil rendemen yang didapatkan, ekstraksi dengan kloroform memiliki persentase rendemen yang paling kecil, diduga senyawa yang terekstrak dari ekstrak kloroform adalah senyawa volatil dan memiliki berat molekul kecil sehingga dapat tervisualisasi dengan jelas menggunakan GC-MS (Foltz *et al.*, 1980). Senyawa tersebut dapat dilihat pada Tabel 3. Sebagian besar senyawa yang terekstrak dari mikroalga *T.chunii* dengan menggunakan pelarut kloroform adalah senyawa golongan asam lemak, alkana, dan

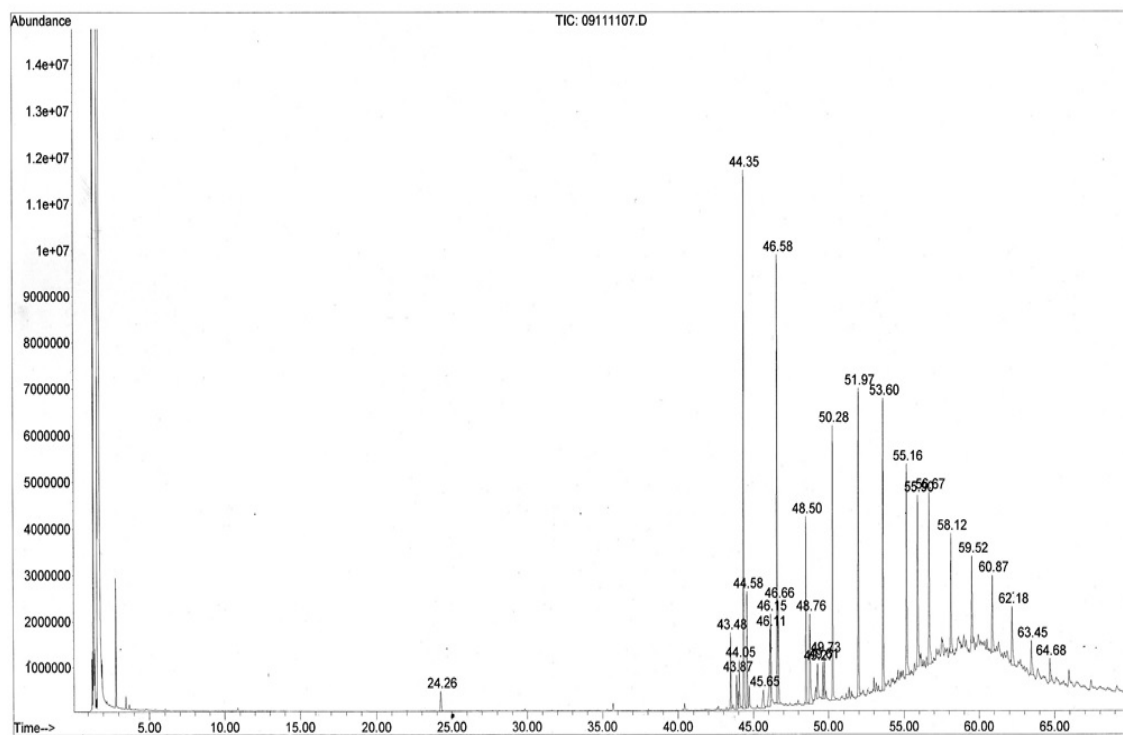
diterpenoid. Keragaman golongan senyawa inilah yang menyebabkan ekstrak kloroform memiliki aktifitas penghambatan dengan diameter yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak lainnya.

Ekstraksi menggunakan pelarut aseton menghasilkan rendemen paling tinggi. Puncak kromatogram yang tervisualisasi pada ekstraksi *T. chunii* menggunakan pelarut aseton sejumlah 10 puncak (Gambar 3). Di sisi lain, rendemen ekstrak menggunakan pelarut aseton memiliki persentase tertinggi diantara pelarut lainnya. Dimungkinkan beberapa senyawa yang memiliki berat molekul besar dan tidak bersifat volatil pada ekstrak tersebut tidak dapat teridentifikasi menggunakan GC-MS. Hal ini dikarenakan senyawa yang teridentifikasi menggunakan GC-MS hanyalah senyawa yang volatil.

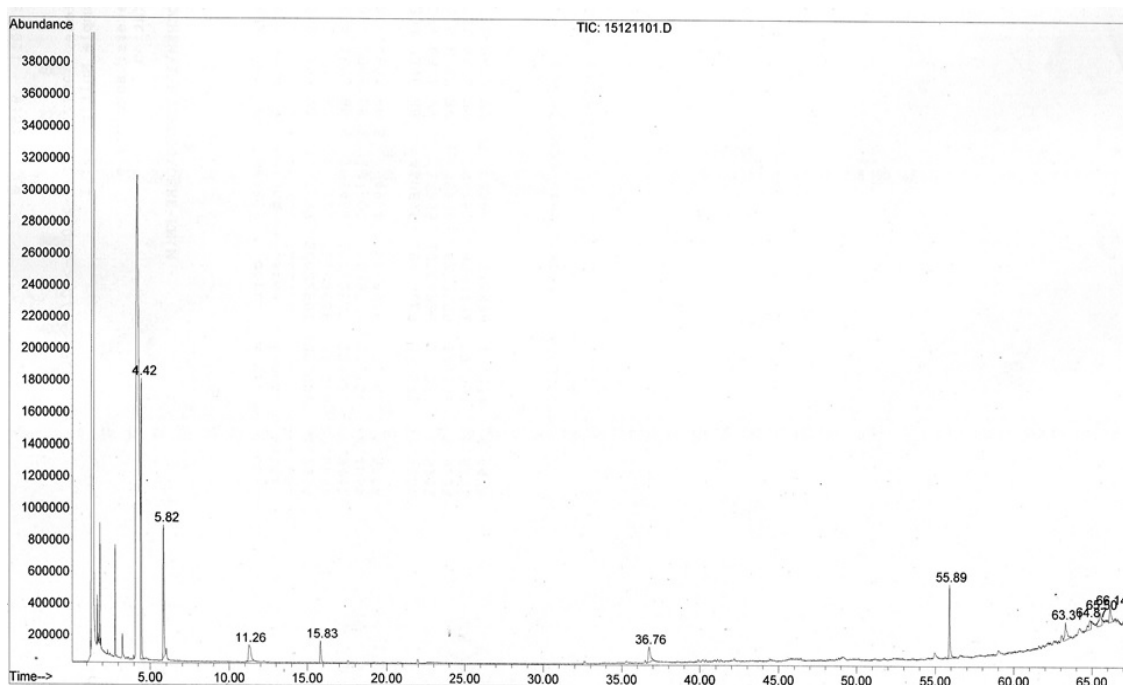
Sepuluh puncak kromatogram dari ekstrak aseton yang tervisualisasi menggunakan GC-MS, tidak semuanya dapat teridentifikasi jenis senyawa yang diduga secara pasti. Pada analisa yang telah dilakukan, dari sepuluh identifikasi senyawa terdapat empat senyawa yang memiliki kualitas dibawah 50%, sehingga dipilihlah hanya 6 senyawa pada Tabel 4 dengan kualitas pendugaan



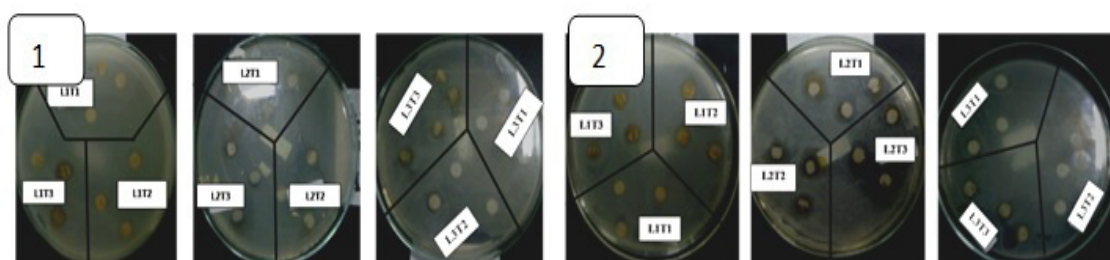
Gambar 1. Puncak kromatogram ekstrak *T. chunii* dengan pelarut metanol



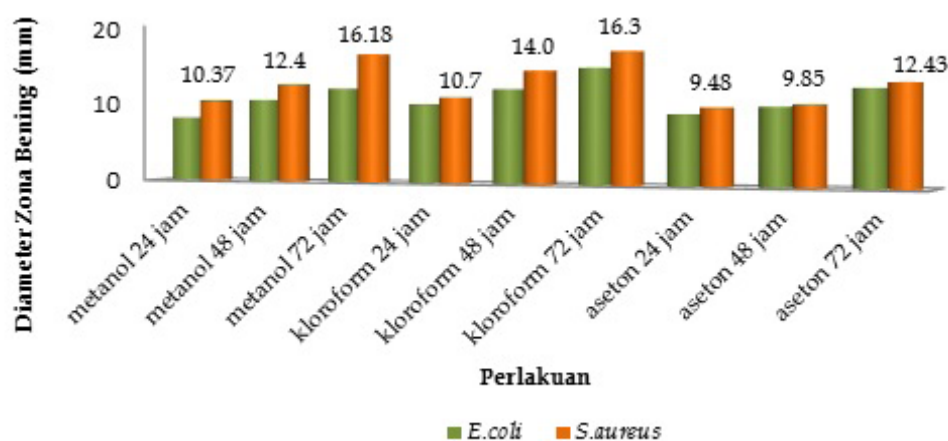
Gambar 2. Puncak kromatogram ekstrak *T. chunii* dengan pelarut kloroform



Gambar 3. Puncak kromatogram ekstrak *T. chunii* dengan pelarut aseton



Gambar 4. Aktifitas antimikroba dari ekstrak *Tetraselmis chuii* pada *E. Coli* dan *S.aureus* dengan Perlakuan ekstraksi menggunakan pelarut L1 = Metanol, L2 = Kloroform, L3 = Aseton, dengan waktu ekstraksi 24 jam untuk T1, 48 jam untuk T2, dan 72 jam untuk T3. 1) Pada *Eshericia coli*, 2) pada *Staphylococcus aureus*



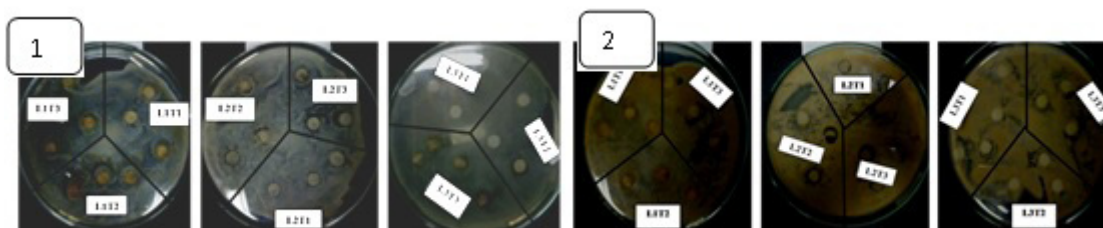
Gambar 5. Perbedaan diameter zona bening terhadap *E. coli* dan *S. aureus* oleh masing-masing perlakuan

Tabel 2. Senyawa yang terekstrak dari ekstraksi menggunakan pelarut metanol

| No | Nama Senyawa | Persentase Luas Area (%) | Rumus Molekul |
|----|---|--------------------------|---------------|
| 1 | Pentadecanoic acid; Methyl Pentadecanoate | 2.304 | C16H32O2 |
| 2 | 1,13-tetradecadiene | 4.640 | C14H26 |
| 3 | 9-Hexadecenoic acid, methyl palmitoleate | 16.023 | C17H32O2 |
| 4 | 9-Hexadecenoic acid, methyl palmitoleate | 43.816 | C17H32O2 |
| 5 | Hexadecanoic acid; palmitic acid | 1.344 | C16H32O2 |
| 6 | 9,12-octadecadienoic acid; linoleic acid | 11.973 | C18H32O2 |
| 7 | 9-octadecenoic acid; oleic acid | 17.049 | C18H34O2 |
| 8 | 1,2-benzenedicarboxylic acid | 2.851 | C8H6O4 |

Tabel 3. Senyawa yang terekstrak dari ekstraksi menggunakan pelarut kloroform

| No | Nama Senyawa | Persentase Luas Area (%) | Rumus Molekul |
|----|---|--------------------------|---------------|
| 1 | 1,3-bis(1,1-Dimethylethyl) | 0.846 | C14H22 |
| 2 | 2,6,10-trimethyl; 14-ethylene-14-pentadecne | 1.555 | C20H38 |
| 3 | Pentadecanoic acid; ethyl pentadecanoate | 0.849 | C17H34O2 |
| 4 | 1,9-tetradecadiene | 1.175 | C14H26 |
| 5 | 13-octadecadien-1-ol | 13.169 | C18H34O |
| 6 | 1-Nonadecene | 2.649 | C19H38 |
| 7 | Hexadecenoic acid; z-11-Hexadecenoic acid | 0.916 | C16H30O2 |
| 8 | Hexadecanoic acid; palmitic acid | 2.962 | C16H32O2 |
| 9 | E-11 Hexadecanoic acid; ethyl ester | 2.021 | C16H32O2 |
| 10 | Hexadecanoic acid, ethyl ester | 10.684 | C18H40O |
| 11 | Eicosane; n-eicosane | 2.478 | C20H42 |
| 12 | Heneicosane; n-heneicosane | 4.367 | C21H44 |
| 13 | Phytol | 3.182 | C20H40O |
| 14 | 9,17-octadecadienal | 1.163 | C18H32O |
| 15 | 9,12-octadecadienoic acid, ethyl ester | 0.902 | C18H32O2 |
| 16 | Ethyl oleate; 9-octadecenoic acid | 1.164 | C20H38O2 |
| 17 | Docosane | 6.810 | C22H46 |
| 18 | Tricosane | 7.554 | C23H48 |
| 19 | Tetracosane | 7.302 | C24H50 |
| 20 | Octadecane; n-octadecane | 5.838 | C18H38 |
| 21 | 1,2-benzenedicarboxylic acid | 4.877 | C8H6O4 |
| 22 | Octacosane; n-octacosane | 4.915 | C28H58 |
| 23 | Triacontane | 3.398 | C30H62 |
| 24 | Nonadecane | 2.423 | C19H40 |
| 25 | Dotriacontane | 2.379 | C32H66 |
| 26 | Eicosane; icosane | 2.322 | C20H42 |
| 27 | Eicosane; n-eicosane | 1.325 | C20H42 |
| 28 | Eicosane; n-eicosane | 0.775 | C20H42 |



Gambar 6. Aktifitas antimikroba dari *T. chuii* pada *A. flavus*

diatas 90%. Beberapa senyawa yang terekstrak menggunakan pelarut aseton merupakan golongan senyawa ester, alkohol, cycloalkena, dan asam karboksilat. Namun, tidak semua senyawa tersebut berperan sebagai antimikroba.

Aktifitas Antimikroba Ekstrak *T.chuui* Pada *E. coli* dan *S. aureus*

Ekstrak antimikroba dari *Tetraselmis chuui* menunjukkan hasil yang positif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* maupun *S.aureus*. Ekstrak antimikroba dengan pelarut metanol, kloroform, dan aseton memiliki diameter zona bening yang berbeda-beda terhadap bakteri tersebut. Perbedaan penghambatan pertumbuhan *E.coli* yang berbeda dapat dilihat pada Gambar 20, sedangkan pada *S. aureus* dapat dilihat pada Gambar 4.

Diameter zona bening yang dihasilkan termasuk diameter kertas cakram yang digunakan yakni sebesar 6 mm. Perbedaan antar perlakuan yang didapatkan dapat dipengaruhi oleh perbedaan sifat fisiologis dari kedua bakteri, sehingga mekanisme ekstrak dalam menghambat pertumbuhan pun akan berbeda keefektifannya. Perbedaan akibat dari masing-masing perlakuan dapat dilihat pada Gambar 5.

Berdasarkan Gambar 5 dapat diketahui bahwa estrak antimikroba dari *T.chuui* lebih maksimal dalam menghambat pertumbuhan *S.aureus* dibandingkan dengan *E.coli*. Penyebab perbedaan utamanya adalah dinding sel bakteri, *S.aureus* merupakan bakteri gram positif dan *E.coli* adalah bakteri gram negatif (Charles River Lab, 2009). Senyawa antimikroba yang menyerang keaktifan ter-

hadap sintesis dinding sel dapat membunuh mikroba *S.aureus*, sedangkan pada *E.coli* tidak. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme melalui mekanisme penghambatan sintesis dinding sel melibatkan gangguan pada sintesis peptidoglikan (Mc Kane dan Kdaneli, 1986). Peptidoglikan merupakan komponen utama dalam pembentukan dinding sel bakteri gram positif. Terganggunya sintesis peptidoglikan, maka pembentukan dinding sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan, sehingga sel hanya diliputi oleh membran sel. Keadaan ini menyebabkan sel *S.aureus* mudah mengalami lisis, baik karena fisik maupun tekanan osmotik dan menyebabkan sel bakteri mati, sehingga membentuk diameter penghambatan yang lebih luas dibandingkan dengan *E.coli*.

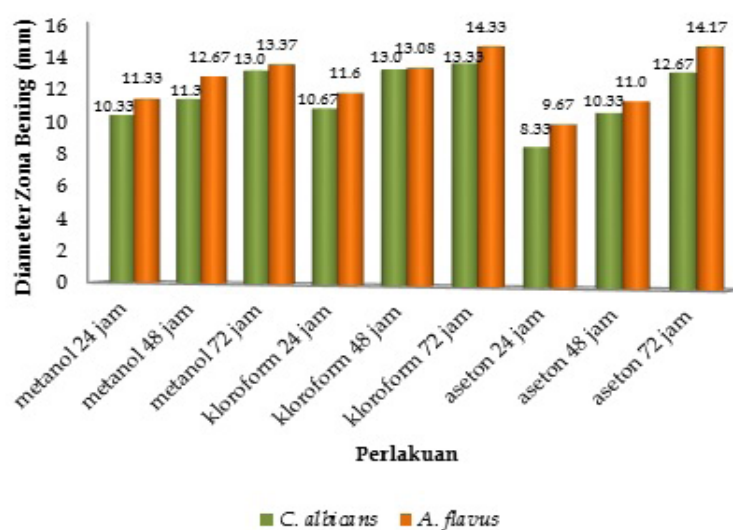
Semua perlakuan menunjukkan diameter daya hambat yang berbeda, namun ekstraksi menggunakan pelarut kloroform memberikan hasil yang terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S.aureus* maupun *E.coli*. Diameter daya hambat yang maksimal dihasilkan dari ekstraksi menggunakan pelarut tersebut dengan waktu ekstraksi selama 72 jam.

Aktifitas Antimikroba Ekstrak *T. chuui* Pada *C. albicans* dan *A. Flavus*

Pada uji aktifitas anti jamur ekstrak dari pelarut metanol, kloroform, dan aseton menunjukkan hasil yang positif terhadap penghambatan pertumbuhan jamur *C.albicans* dan *A.flavus*. Gambar 6 menunjukkan hasil uji aktifitas antimikroba pada *C. albicans*, dan *A. flavus* dengan perbedaan masing-masing perlakuan.

Tabel 4. Senyawa yang terekstrak dari ekstraksi menggunakan pelarut aseton

| No | Nama Senyawa | Persentase (%) | Rumus Molekul |
|----|---------------------------------------|----------------|---------------|
| 1 | 2-pentanone; 4-hydroxy-4methyl | 31.245 | C5H10O |
| 2 | Ethanol; 2-butoxy; beta-butoxyethanol | 20.063 | C6H14O2 |
| 3 | Benzyl Alcohol; Benzene methanol | 6.944 | C7H8O |
| 4 | Cyclohexen-1-one; 3,5,5-trimethyl | 4.405 | C6H8O |
| 5 | 2-propenoic acid | 5.529 | C3H4O2 |
| 6 | 1,2-Benzenedicarboxylic acid | 11.510 | C8H6O4 |



Gambar 7. Perbedaan diameter daya hambat terhadap *C. albicans* dan *A. flavus* oleh masing-masing perlakuan

Pengaruh masing-masing perlakuan ekstrak terhadap daya hambat pertumbuhan *C. albicans* dan *A. flavus* memberikan respon yang berbeda. Setiap perlakuan yang sama, pada *C. albicans* menunjukkan respon zona bening dengan diameter lebih kecil apabila dibandingkan dengan *A. flavus*. Diameter yang berbeda tersebut dapat dilihat pada Gambar 7.

Berdasarkan Gambar 7, ketahanan *C. albicans* terhadap ekstrak antimikroba yang diberikan lebih tinggi dibandingkan dengan *A. flavus*. Hal ini dikarenakan *C. albicans* adalah yeast. Yeast mampu memecah atau menghidrolisis senyawa alkana, karena mampu memetabolisme senyawa hidrokarbon. Oleh sebab itu, *C. albicans* lebih dapat beradaptasi dalam lingkungan yang mengandung senyawa lipofilik (Sikkema, 1995). Selain itu, dinding sel *C. albicans* sangat kompleks apabila dibandingkan dengan dinding sel kapang. Dinding sel *C. albicans* mengandung turunan mannoprotein yang bersifat immunosupresif sehingga dapat meningkatkan ketahanan mikroorganisme tersebut terhadap ekstrak antimikroba yang diberikan.

Ketebalan dinding sel *C. albicans* antara 100 hingga 400 nm. Komposisi utama dinding sel *C. albicans* adalah manan dan protein berjumlah 15.2-30% dari berat kering dinding sel, β -1,3-D-glukan dan β -1,6-D-glukan 47-60%, khitin 0.6-9%, protein 6-25% dan lipid 1-7. Membran selnya seperti sel eukariotik lainnya yaitu terdiri dari lapisan fosfo-

lipid ganda. Membran protein ini memiliki aktifitas enzim seperti manan sintase, khitin sintase, glukan sintase, ATPase dan protein yang mentranspor fosfat (Waluyo, 2007).

Berdasarkan uraian yang tersebut diatas, menjadikan *C. albicans* lebih resisten terhadap pemberian ekstrak antimikroba dibandingkan dengan *A. flavus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa diameter zona bening dari *C. albicans* lebih kecil dibandingkan dengan *A. flavus*. Terlepas dari perbedaan diameter zona bening yang dihasilkan oleh *C. albicans* maupun *A. flavus*, ekstraksi menggunakan kloroform menunjukkan hasil maksimal dalam penghambatannya. Baik pada *C. albicans* maupun *A. flavus* ekstrak non-polar tersebut memberikan respon diameter penghambatan yang paling besar. Berdasarkan karakterisasi senyawa menggunakan GC-MS, ekstraksi menggunakan kloroform memang memiliki senyawa antimikroba yang lebih banyak dibandingkan dengan ekstrak metanol maupun aseton, sehingga aktifitas penghambatannya pun lebih maksimal.

SIMPULAN

Perbedaan pelarut dan waktu ekstraksi berpengaruh nyata terhadap rendemen ekstrak antimikroba dari *Tetraselmis chuii*. Rendemen ekstrak paling besar diperoleh dengan ekstraksi menggunakan aseton selama 72 jam yaitu sebesar 29.92%, sedangkan rendemen terendah

didapatkan dari ekstraksi menggunakan kloroform selama 24 jam yaitu 2.01%. Pemberian ranking non parametrik dari masing-masing perlakuan, ekstrak antimikroba terbaik dalam potensinya menghambat mikroorganisme indikator adalah menggunakan pelarut kloroform dan waktu ekstraksi maserasi selama 72 jam. Diameter zona bening yang dihasilkan adalah 14.33 mm pada *E.coli*, 16.3 mm *S.aureus*, 13.33 mm *C.albicans*, dan 14.33 mm pada *A.flavus*, sedangkan jumlah ekstrak yang diberikan untuk bakteri sebanyak 10 µl, dan 20 µl untuk jamur. 3. Senyawa yang terdapat pada *T.chuii* dan berperan aktif sebagai senyawa antimikroba adalah golongan asam lemak, ester, alkana, alkohol, cycloalkena, dan diterpenoid. Setiap pelarut mengekstrak senyawa antimikroba yang berbeda. Senyawa yang larut dalam pelarut methanol adalah 9-Hexadecenoic acid, Hexadecanoic acid, 9-Octadecenoic acid, dan 1,2-Benzenedicarboxylic acid. Pada pelarut kloroform senyawa yang terekstrak antara lain Hexadecanoic acid (palmitic acid), Hexadecanoic acid (ethyl ester), Phytol, 1,2-Benzenedicarboxylic, 9-Octadecenoic acid, Docosane, Tricosane, Eicosane, Nonadecane, Heneicosane, dan 2,6,10-Trimethyl. Pada pelarut aseton adalah Cyclohexene dan 1,2-Benzenedicarboxylic acid, dan Benzyl alcohol.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N, W, S. 2009. *Tetraselmis chuii* mikroalga hijau yang berpotensi sebagai penghasil senyawa antibakteri. *Prosiding Seminar Nasional Pengelolaan dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan-II*, BBRP2B, Jakarta
- Austin, B, Baudet, E, Stobie, M. 1992. Inhibition of bacteria fish pathogens by *Tetraselmis suecica*. *J. Fish. Diseases*. 15(1):55-61
- Chandrasekar, P. 2011. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. *J. Antimicrob. Chemother.* 66(3):457-465
- Charles River Laboratories. 2009.
- Demain, AL, Zhang L. 2005. *Natural products Drug Discovery and Therapeutic Medicine*. Humana Press, Totowa New Jersey
- Dipasqua R, D, Betss, G, Hoskins, S, Edwards, M, Ercolini, D, Mauriello, G. 2007. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 55(12):4863-4870
- Ghomi, J, S, Ghasemzadeh, M, A. 2011. Ultrasound-assisted synthesis of dihydropyrimidine-2-thiones. *J. Serb. Chem. Soc.* 76(5):679-684
- Karaman, I, Sahin, F, Gulluce, M, Ogotcu, H, Sengul, M, Adiguzel, A. 2003 Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of juniperus oxycedrus L. *J. Ethnopharmacol.* 85(2-3):231-235
- Komara. 1991. Mempelajari Ekstraksi Oleoresin dan Karakteristik Mutu Oleoresin dari Bagian Cabe Rawit (*Capsium frutescens*). Skripsi. IPB. Bogor
- Makridis, P, Costa, R, A, Dinis, M, T. 2006. Microbial conditions and antimicrobial activity in cultures of two microalgae species, *Tetraselmis chuii* and *Chlorella minutissima*, and effect on bacterial load of enriched *Artemia metanauplii*. *J. Aquaculture.* 255(1-4):76-81
- Martinez, R, N, M, Peres, N, T, Rossi, A. 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *J. Mycopathologia.* 166(5-6):369-383
- Maulida, D, Zulkarnaen, N. 2010. Ekstraksi Antioksidan (Likopen) dari Buah Tomat dengan Menggunakan Solven Campuran, n-Heksana, Aseton, dan Etanol. Skripsi. Universitas Diponegoro. Semarang
- Mc Kane, Kandeli, J. 1986. *Microbiology Essentials and Applications*. Mc Graw Hill Co, New York
- Nugrahini, NIP. 2011. Isolasi, Uji Aktivitas, dan Purifikasi Parsial Senyawa Antibiotik dari Isolat Jamur dan Aktinomisetes Tanah Kalimantan Timur. Tesis. Universitas Brawijaya, Malang
- Órpez, R, Martínez, M, E, Hodaifa, G, Yousfi, F, E, Jbari, N, Sánchez, S. 2009. Growth of the microalga *Botryococcus Braunii* in secondarily treated sewage. *J. Desalination.* 246(1-3):625-630
- Ocaña, A, Reglero, G. 2012. Effects of thyme Extract Oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus hyemalis*) on Cytokine Production and Gene Expression of oxLDL-Stimulated THP-1-Macrophages. *J. Obes.* 2012:1-11
- Rice, EL. 1984. *Allelopathy 2nd ed.* Academic Press, Orlando FL

- River. 2009. *Staphylococcus aureus* - Technical Sheet. California: Charles River Laboratories International, Inc
- Romero, C, D, Chopin, S, F, Buck, G, Martinez, E, Garcia, M, Bixby, L. 2005. Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. *J. Ethnopharmacol.* 99(2):253-257
- Rostini, I. 2007. Kultur Fitoplankton (*Chlorella sp.* dan *Tetraselmis chuii*) pada skala laboratorium. Karya Ilmiah. Universitas Padjadjaran
- Sikkema, J, de Bont, J, A, Poolman, B. 1994. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.* 269(11):8022-8028
- Spigno, G, De Faveri, D, M. 2007. Antioxidant from grape stalks and mare : influence of extraction procedure on yield, purity, and antioxidant power of The extract. *J. Food Eng.* 78(3):793-801
- Vratnica, D, B, Perović, A, Šuković, D, Perović, D . 2011. Effect of vegetation on chemical content and antibacterial activity of *Satureja Montana* L. *J. Arch. Biol. Sci. Belgrade.* 63(4):1173-1179
- Waluyo, Lud. 2007. *Mikrobiologi Umum*. UMM Press