

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI PIGMEN EKSTRASELULER MARENIN
TERHADAP *Vibrio alginolyticus* DAN *Bacillus cereus* (KAJIAN SUHU DAN
LAMA WAKTU PEMANASAN)**

TUGAS AKHIR

Oleh

AMALIA GITA FITRIANI

NIM 165100501111011



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN

FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2021



**AKTIVITAS ANTIBAKTERI PIGMEN EKSTRASELULER MARENNINE
TERHADAP *Vibrio alginolyticus* DAN *Bacillus cereus* (KAJIAN SUHU DAN
LAMA WAKTU PEMANASAN)**

TUGAS AKHIR

Oleh
AMALIA GITA FITRIANI
NIM 16510050111011

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Bioteknologi



JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG
2021



LEMBAR PERSETUJUAN

Judul Tugas Akhir : Aktivitas Antibakteri Pigmen Ekstraseluler *Marennine* Terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus* (Kajian Suhu dan Lama Waktu Pemanasan)

Nama Mahasiswa : Amalia Gita Fitriani

N I M : 165100501111011

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA
NIP. 19590613 198601 1 001

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D
NIP. 19610523 198703 2 003

Tanggal Persetujuan :



LEMBAR PENGESAHAN

Judul Tugas Akhir : Aktivitas Antibakteri Pigmen Ekstraseluler *Marennine*
Terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus* (Kajian

Suhu dan Lama Waktu Pemanasan)

Nama Mahasiswa : Amalia Gita Fitriani

N I M : 165100501111011

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Dosen Penguji,

Tunjung Mahatmanto STP, M.Si, PhD
NIP. 19810908 200801 1 007

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA
NIP. 195906131986011001

Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D
NIP. 196105231987032003



Dr. Widya Dwi Rukmi P., STP, MP
NIP. 197005041999032002

Tanggal Pengesahan : 08 Juni 2021

RIWAYAT HIDUP

Amalia Gita Fitriani, perempuan lahir di Kabupaten Sidoarjo pada 18 Februari 1998 merupakan anak kedua dari tiga bersaudara. Penulis sebelum diterima menjadi mahasiswi di Universitas Brawijaya telah menyelesaikan jenjang pendidikan formal diantaranya pada tingkat dasar di SD Muhammadiyah 2 Taman lulus tahun 2011, menengah pertama di SMP Negeri 2 Taman lulus tahun 2013, dan menengah atas di SMA Negeri 1 Krian lulus tahun 2016. Masa sekolah oleh penulis dimanfaatkan untuk mengikuti berbagai kegiatan ekstrakurikuler, perlombaan akademik maupun non akademik, serta aktif berorganisasi.

Lulus seleksi SNMPTN di Universitas Brawijaya penulis resmi menjadi mahasiswi Universitas Brawijaya Fakultas Teknologi Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Program Studi Bioteknologi angkatan tahun 2016. Masa perkuliahan dihabiskan penulis dengan aktif tergabung dalam organisasi KSR Universitas Brawijaya sebagai anggota divisi Litbang (Penelitian dan Pengembangan) dan LPM TECHNO Fakultas Teknologi Pertanian sebagai anggota departemen redaksi, Redaktur Pelaksana di tahun kedua, dan Pimpinan Redaksi pada tahun ketiga. Tergabung dalam organisasi mengharuskan penulis juga mengikuti berbagai kepanitian internal dan eksternal organisasi seperti Techno Present tahun 2017 dan 2018, Sowon Deso tahun 2019, DIKLATSAR tahun 2018 dan 2019, orientasi jurusan (OPJH) tahun 2017 dan 2018, Himalogista Mengabdikan tahun 2017, dan lainnya. Penulis juga pernah mendapatkan juara 3 lomba penulisan ilmiah kategori teknologi antar maba di Fakultas Teknologi Pertanian. Semasa berkuliah penulis juga menjalani PKL (Praktik Kerja Lapangan) di Koperasi Agro Niaga Jabung yang merupakan salah satu pengalaman berharga untuk menghadapi dunia kerja.

Malang, Maret 2021

Penulis

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama Mahasiswa : Amalia Gita Fitriani

N I M : 165100501111011

Jurusan : Teknologi Hasil Pertanian

Fakultas : Teknologi Pertanian

Judul Tugas Akhir : Aktivitas Antibakteri Pigmen Ekstraseluler *Marennine*

Terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus* (Kajian Suhu dan Lama Waktu Pemanasan)

Menyatakan bahwa,

TA dengan judul di atas merupakan karya asli penulis tersebut di atas. Apabila di kemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar saya bersedia dituntut sesuai hukum yang berlaku.

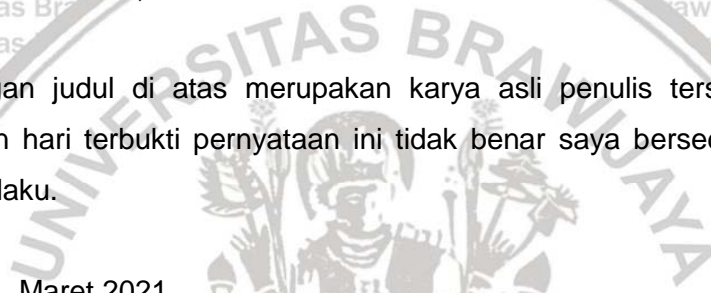
Malang, Maret 2021

Pembuat Pernyataan,



Amalia Gita Fitriani

NIM.165100501111011



PERNYATAAN PEMBIAYAAN SKRIPSI

Penelitian ini merupakan bagian dari Proyek Penelitian a.n:

Nama Dosen : 1. Prof. Dr. Ir. Yuniata, DEA
2. Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D

NIP : 1. 19590613 198601 1 001
2. 19610523 198703 2 003

Nama Penelitian : Genus Haslea, New Marine Resources for Aquaculture

dan penelitian untuk skripsi ini dibiayai dari proyek tersebut.

Pembuat Pernyataan,



Amalia Gita Fitriani
NIM. 165100501111011



Amalia Gita Fitriani. 165100501111011. **Aktivitas Antibakteri Pigmen Ekstraseluler *Marennine* Terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus* (Kajian Suhu dan Lama Waktu Pemanasan). Tugas Akhir. Pembimbing: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA dan Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D.**

RINGKASAN

Tingkat konsumsi produk perikanan setiap tahunnya terus mengalami peningkatan, sehingga pemenuhan kebutuhan banyak dibebankan dari hasil budidaya. Usaha budidaya tidak lepas dari ancaman kerugian akibat timbulnya penyakit hasil infeksi bakteri patogen terlebih pemicu kematian massal seperti vibriosis oleh bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pencarian terhadap senyawa alami sebagai agen antibakteri menjadi opsi setelah diketahui penggunaan antibiotik memiliki banyak kerugian diantaranya harga yang relatif mahal, dapat meninggalkan senyawa berbahaya dalam tubuh organisme, menyebabkan polusi lingkungan, dan berpotensi mengembangkan resistensi pada bakteri. Penelitian *in vitro* terhadap ekstraseluler *marennine* yang dihasilkan *Haslea ostrearia* membuktikan adanya aktivitas biologis antibakteri bahkan pada konsentrasi rendah.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui kemampuan antibakteri *marennine*, menguji konsentrasi terendah *marennine* dalam menghambat dan membunuh bakteri, serta mengetahui stabilitas dan efektivitas *marennine* ketika diberi perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan. Metode penelitian yang digunakan diantaranya uji aktivitas antibakteri, uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok Faktorial dengan 2 faktor perlakuan untuk uji antibakteri yaitu suhu pemanasan 30°C, 40°C, 50°C dan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan terbaik untuk menghasilkan aktivitas antibakteri *marennine* berada pada faktor perlakuan suhu pemanasan 40°C dengan lama waktu pemanasan 20-30 menit yang menghasilkan rentangan rerata diameter zona hambat sebesar $2,00 \pm 0,00 - 2,17 \pm 0,29$ mm untuk bakteri *Bacillus cereus* dan $1,93 \pm 0,12 - 2,17 \pm 0,29$ mm untuk bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pengujian konsentrasi terendah pada kedua bakteri uji berada pada konsentrasi tertinggi pengujian yaitu 1 ppm diikuti dengan hasil keseluruhan sampel berwarna keruh yang artinya masih terjadi pertumbuhan bakteri. Adanya bakteri uji yang tumbuh pada media agar pengujian MBC menyimpulkan bahwa *marennine* memiliki aktivitas antibakteri bersifat bakteriostatik bukan bakterisidal.

Kata Kunci: Antibakteri, Ekstraseluler *Marennine*, Senyawa Fenolik

Amalia Gita Fitriani. 165100501111011. Antibacterial Activity of Extracellular Marennine Pigment Against *Vibrio alginolyticus* and *Bacillus cereus* (Study of Temperature and Length of Heating Time). Undergraduate Thesis. Supervisors: Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA and Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph. D.

SUMMARY

The trend of consumption of fishery products continues to increase from year to year. So to fulfillment of the stock needs of fishery products is much charged from the cultivation. Cultivation efforts can not be separated from the threat of losses due to the onset of diseases resulting from pathogenic bacterial infections, especially triggering mass death such as vibriosis by *Vibrio alginolyticus* bacteria. The search for natural compounds as antibacterial agents became an option after discovered that antibiotic use has many disadvantages are relatively expensive, can leave harmful compounds in the body of organisms, cause environmental pollution, and potentially develop resistance to bacteria. *In vitro* research on marennine produced by *Haslea ostrearia* proves the antibacterial biological activity has present even at low concentrations.

The purpose of this study was to find out the antibacterial capabilities of marennine, test the lowest concentrations of marennine in inhibiting and killing bacteria, as well as knowing the stability and effectiveness of marennine when given a temperature treatment and length of heating time. The research methods used are the antibacterial activity test, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test, and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test. The experimental design used is a Randomized Design of Factorial Groups with 2 treatment factors namely heating temperature (30°C, 40°C, and 50°C) and heating time length (5, 10, 15, 20, 25, 30 minutes).

The results have shown that the best treatment to produce antibacterial activity marennine is in the treatment factor of heating temperature 40°C with a heating time 20-30 minutes which results in an average range of the diameter of the clear zone was $2.00 \pm 0.00 - 2.0.17 \pm 0.29$ mm for *Bacillus cereus* bacteria and $1.93 \pm 0.12 - 2.17 \pm 0.29$ mm for *Vibrio alginolyticus* bacteria. The lowest concentration test on both test bacteria was at the highest concentration of 1 ppm followed by the overall result of the murky sample which means there is still bacteria growth. The presence of test bacteria that grow on the media for MBC testing to conclude that marennine has antibacterial activity is bacteriostatic rather than bactericidal.

Keywords: Antibacterial, Extracellular Marennine, Phenolic Compounds

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas berkat rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul **Aktivitas Antibakteri Pigmen Ekstraseluler *Marennine* Terhadap *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus* (Kajian Suhu dan Lama Waktu Pemanasan)** dengan baik. Perkenankan penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Orang tua penulis yang tanpa henti terus memberikan dukungan berupa doa dan materil yang tak terhingga
2. Prof. Dr. Ir. Yunianta, DEA dan Prof. Ir. Yenny Risjani, DEA, Ph.D selaku dosen pembimbing Tugas Akhir sekaligus sosok yang telah memberikan kesempatan penulis hingga tergabung dalam kelompok proyek penelitian ini
3. Teman-teman yang telah membantu selama masa penelitian, seminar proposal, pengerjaan laporan, hingga seminar hasil. Sahabat perjuangan dari Maba. Teman-teman kelas RE angkatan 2016 yang senantiasa terus memacu semangat belajar penulis
4. Hansol Vernon Chwe sebagai *role model* sekaligus penyemangat penulis agar tetap bertahan disegala kondisi sulit. Grup musik KPOP SEVENTEEN yang telah memberikan sedikit cinta melalui musik, canda tawa, persaudaraan, mimpi dan ambisi dalam mencapai tujuan yang mereka sajikan.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun guna perbaikan dikemudian hari. Selain itu penulis berharap Tugas Akhir ini dapat memberikan penjelasan yang lengkap tentang proses penelitian Tugas Akhir sehingga dapat memberikan manfaat untuk banyak pihak.

Malang, 27 Oktober 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
RIWAYAT HIDUP	iv
PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR	v
PERNYATAAN PEMBIAYAAN SKRIPSI	vi
RINGKASAN	vii
SUMMARY	viii
KATA PENGANTAR	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	2
1.4 Manfaat.....	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteri Patogen.....	3
2.1.1 <i>Bacillus cereus</i>	3
2.1.2 <i>Vibrio alginolyticus</i>	4
2.2 <i>Haslea ostrearia</i>	5
2.3 <i>Marennine</i> sebagai Senyawa Antibakteri.....	6
2.4 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	7
2.5 Uji Aktivitas Antibakteri Metode <i>Disk Diffusion Agar</i>	7
2.6 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration (MIC)</i>	8
2.7 Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration (MBC)</i>	8
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	9
3.2 Alat dan Bahan.....	9
3.2.1 Alat.....	9
3.2.2 Bahan.....	9
3.3 Metode Penelitian.....	9
3.3.1 Uji Antibakteri Metode <i>Disk Diffusion Agar</i>	10
3.3.2 Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration (MIC)</i>	11
3.4 Tahapan Penelitian.....	16



3.4.1	Penentuan Konsentrasi Sampel <i>Marennine</i>	16
3.4.2	Sterilisasi Alat dan Bahan	17
3.4.3	Pembuatan Media	17
3.4.4	Persiapan Suspensi Bakteri	18
3.4.5	Pembuatan Larutan Sampel.....	18
3.4.6	Uji Aktivitas Antibakteri Metode <i>Disk Diffusion Agar</i>	18
3.4.7	Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)	20
3.4.8	Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	21
3.5	Pengamatan dan Analisa Data	22
3.5.1	Uji Antibakteri Metode <i>Disk Diffusion Agar</i>	22
3.5.2	Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC)	22
BAB IV PEMBAHASAN		
4.1	Konsentrasi Sampel <i>Marennine</i>	23
4.2	Uji Aktivitas Antibakteri Metode <i>Disk Diffusion Agar</i>	24
4.2.1	Aktivitas Antibakteri <i>Marennine</i> Terhadap Bakteri <i>Bacillus cereus</i>	25
4.2.2	Aktivitas Antibakteri <i>Marennine</i> Terhadap Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	27
4.2.3	Perbandingan Aktivitas Antibakteri <i>Marennine</i> pada Bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Vibrio alginolyticus</i>	30
4.3	Uji <i>Minimum Inhibitor Concentration</i> (MIC)	33
4.3.1	Uji MIC pada Bakteri <i>Bacillus cereus</i>	34
4.3.2	Uji MIC pada Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>	37
4.3.3	Perbandingan Pengujian MIC pada Bakteri <i>Bacillus cereus</i> dan <i>Vibrio alginolyticus</i>	40
4.4	Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	41
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan	43
5.2	Saran	43
DAFTAR PUSTAKA		44
LAMPIRAN		50

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1 Rancangan percobaan uji antibakteri metode *disk diffusion agar* 10

Tabel 3.2 Rancangan percobaan uji *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* 12

Tabel 4.1 Hasil analisa konsentrasi stok pigmen ekstraseluler *marennine*..... 23

Tabel 4.2 Pengaruh suhu pemanasan pada ekstraseluler *marennine* terhadap rerata diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus*..... 26

Tabel 4.3 Pengaruh lama waktu pemanasan ekstraseluler *marennine* terhadap rerata diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus*..... 27

Tabel 4.4 Rerata diameter zona bening *marennine* dengan perlakuan Interaksi suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* 29

Tabel 4.5 Perbandingan aktivitas antibakteri *marennine* terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* 31

Tabel 4.6 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan konsentrasi *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus* 35

Tabel 4.7 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi suhu dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Bacillus cereus*..... 36

Tabel 4.8 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi suhu dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* 38

Tabel 4.9 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi lama waktu pemanasan dan konsentrasi *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus*..... 39

Tabel 4.10 Perbandingan rerata nilai absorbansi pengujian MIC *marennine* dengan perlakuan besar konsentrasi pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*..... 40

Tabel 4.11 Hasil Pengamatan uji MBC pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*..... 41

Tabel 4.12 Perbandingan Nilai MIC dan MBC dari Berbagai Pigmen Mikroorganismen 42



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Bacillus cereus* 4

Gambar 2.2 *Vibrio alginolyticus* 4

Gambar 2.3 *Haslea ostrearia* 5

Gambar 2.4 Efek penghijauan tiram pasifik (a), *scallop* (b), *cockle* (c), *clam* (d) 6

Gambar 3.1 Perhitungan Diameter Zona Bening 19

Gambar 3.2 Peta Peletakan Sampel Uji MIC 20

Gambar 4.1 *Marennine* dalam bentuk “*Blue Water*” 23

Gambar 4.2 Grafik Diameter Zona Bening pada Bakteri *Bacillus cereus* 25

Gambar 4.3 Grafik Diameter Zona Bening pada Bakteri *Vibrio alginolyticus* 28



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Analisa 50

Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi Stok Pigmen *Marennine* 57

Lampiran 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Bacillus cereus* 58

Lampiran 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*..... 62

Lampiran 5. Hasil Uji MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*..... 66

Lampiran 6. Hasil Uji MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*..... 79

Lampiran 7. Dokumentasi Hasil Penelitian..... 93



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tren tingkat konsumsi produk perikanan setiap tahunnya terus mengalami peningkatan, sehingga pemenuhan kebutuhan produk hasil perikanan banyak dibebankan dari hasil budidaya. Usaha budidaya tidak lepas dari ancaman kerugian, salah satunya berasal dari timbulnya penyakit. Munculnya penyakit pada produk akuakultur, terlebih yang dapat menyebabkan kematian massal berakibat langsung pada kerugian besar produksi, profitabilitas, keberlangsungan industri, hingga berpotensi mengancam keamanan pangan perairan termasuk juga kesehatan manusia (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Masalah penyakit ini banyak timbul akibat kondisi lingkungan kurang baik, kualitas indukan dan pakan buruk, dan dapat berasal dari agen pembawa penyakit seperti bakteri patogen, virus, dan parasit lain di lingkungan (Rameshkumar *et al.*, 2017). Penyakit akibat infeksi bakteri patogen merupakan kasus yang paling sering ditemukan pada sektor akuakultur, salah satunya adalah penyakit vibriosis yang disebabkan oleh bakteri dari genus vibrio. Patogen *Vibrio alginolyticus* ditemukan bebas di lingkungan perairan dan menginfeksi hewan laut maupun produk akuakultur diantaranya ikan kerapu dan kakap. Kondisi kolam budidaya yang padat memungkinkan cepatnya penularan infeksi bakteri, karenanya kerugian akibat kematian massal dalam waktu singkat baik pada benih maupun indukan sangat sulit untuk dikendalikan (Mustapha *et al.*, 2013).

Pencarian terhadap senyawa alami sebagai agen antibakteri menjadi opsi setelah diketahui penggunaan antibiotik memiliki banyak kerugian diantaranya harganya relatif mahal, dapat meninggalkan senyawa berbahaya dalam tubuh organisme, menyebabkan polusi lingkungan, dan berpotensi mengembangkan resistensi pada bakteri (Permatasari *et al.*, 2019). Tertinggalnya antibiotik dalam tubuh organisme juga bisa berakibat buruk bagi manusia apabila dikonsumsi. Paparan antibiotik tingkat kronis dapat menyebabkan steatosis, anemia apalastik, dan leukemia (Sibero *et al.*, 2019). Pengaplikasian senyawa yang dihasilkan mikroalga terlebih yang berasal dari hasil metabolit sekunder telah banyak diteliti memiliki sifat antibakteri. Mikroalga dipilih untuk membantu produksi bahkan hingga skala industri karena pertumbuhannya cepat dengan kebutuhan nutrisi sederhana, mampu beradaptasi pada lingkungan ekstrem, dan produksi metabolit sekunder dapat dimanipulasi dengan pengendalian kondisi kultur (Falaise *et al.*, 2016).

Penelitian *in vitro* terhadap *marennine* yang dihasilkan *Haslea ostrearia* membuktikan adanya aktivitas biologis antibakteri bahkan pada konsentrasi rendah. Pigmen ini diyakini menunjukkan interaksi yang baik pada organisme perairan sebagai bagian dari sifat protektif dan kompetitif (Turcotte *et al.*, 2016). Diatom *Haslea ostrearia* mensintesis pigmen *hidrosoluble marennine* di ujung apikal dengan dua bentuk intraseluler dan

ekstraseluler. Penelitian terhadap *marennine* dilaksanakan guna mengetahui kemampuan antibakteri, menguji konsentrasi terendah *marennine* dalam menghambat dan membunuh bakteri, serta mengetahui stabilitas dan efektivitas *marennine* ketika diberikan perlakuan suhu dan waktu pemanasan. Pengaplikasian *marennine* sebagai antibakteri diantaranya untuk kebutuhan nutrasetika, obat antibakteri, pewarna makanan dan kosmetik, serta aditif atau pengawet makanan (Prasetya *et al.*, 2017).

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan memiliki pengaruh terhadap kemampuan antibakteri dibuktikan dengan terbentuknya zona bening menggunakan metode *Disk Diffusion Agar*?
2. Bagaimana hasil penentuan konsentrasi terendah *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus*?
3. Bagaimana hasil penentuan konsentrasi terendah *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan dalam membunuh bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus*?

1.3 Tujuan

1. Mengetahui pengaruh pemberian perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan *marennine* terhadap kemampuan antibakteri yang dibuktikan dengan terbentuknya zona bening menggunakan metode *Disk Diffusion Agar*.
2. Mengetahui hasil penentuan konsentrasi terendah *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus*.
3. Mengetahui hasil penentuan konsentrasi terendah *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan dalam membunuh bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus*.

1.4 Manfaat

1. Meningkatkan pengetahuan dan kemampuan praktis peneliti.
2. Bahan referensi pengembangan penelitian dengan tema sama.

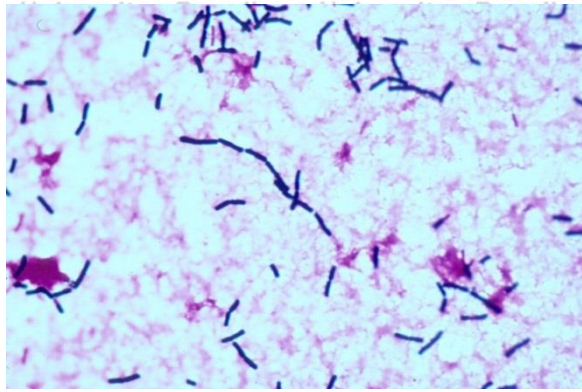
BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Patogen

Bakteri patogen merupakan bakteri yang bersifat patogenitas atau dapat menyebabkan kerusakan dan penyakit pada inang (Mohammad *et al.*, 2018). Bakteri patogen dapat bertahan hidup dan berkembang biak dengan memasuki tubuh inang, kemudian menemukan bagian kaya nutrisi pada inang, tahan terhadap sistem imun bawaan inang, mampu mereplikasi diri, dan berakhir lepas untuk menemukan inang baru. Cara bakteri patogen dapat menyebabkan penyakit diantaranya masuk untuk merusak langsung sel dan jaringan inang selama proses replikasi atau dengan memproduksi racun. Infeksi bakteri sangat berbahaya karena dapat menyebabkan penyakit serius dan memicu *foodborne illness*. Upaya untuk mengatasi adanya infeksi akibat bakteri patogen salah satunya dengan menggunakan antibiotik. Namun, upaya ini menyebabkan masalah baru yaitu resisten bakteri terhadap antibiotik yang diberikan (Pratiwi, 2017).

2.1.1 *Bacillus cereus*

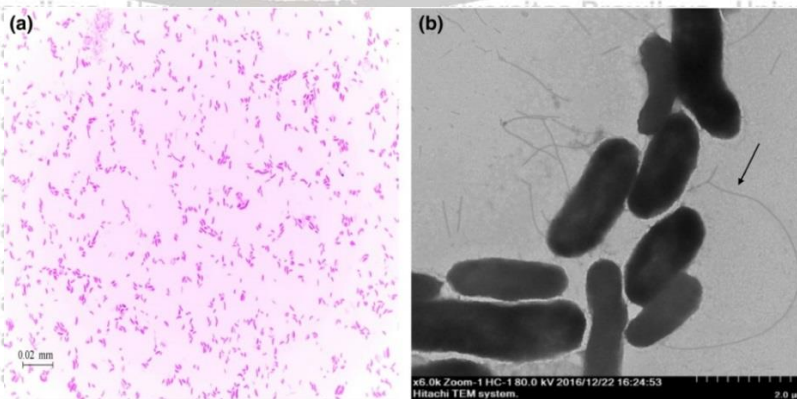
Bacillus cereus merupakan bakteri patogen pembusuk gram positif, aerob, fakultatif anaerob, berbentuk batang, dan dapat membentuk endospora. Bakteri ini tumbuh pada suhu pertumbuhan 10°C-42°C dengan suhu optimum 30°C-37°C dan pH 4.75-9.3. *B. cereus* sensitif terhadap panas sedangkan endospora yang dihasilkan dapat sangat tahan terhadap panas (Pexara and Govaris, 2010). Bakteri ini dapat menyebabkan *foodborne illness* jenis intoksikasi yang dapat menyebabkan penyakit apabila racun yang dihasilkan masuk dalam tubuh (Mohammad *et al.*, 2018). Penyakit akibat bakteri ini juga dapat timbul apabila sel atau spora tertelan dan menghasilkan enterotoksin dalam usus halus. Enterotoksin yang dihasilkan diantaranya *Haemolysin BL* (HBL), *Nonhemolytic enterotoxin* (Nhe), *Cytotoxin K* (CytK), *Enterotoxin T* (BceT), *Enterotoxin FM* (EntFM) dan satu *emetic toxin*. Infeksi bakteri pada tubuh dapat menyebabkan diare, mual, muntah, kram perut, nyeri, hingga penyakit yang tidak berkaitan dengan makanan seperti *endocarditis* dan *endophthalmitis* (Tewari and Abdullah, 2015).



Gambar 2.1 *Bacillus cereus* (Bottone, 2010).

2.1.2 *Vibrio alginolyticus*

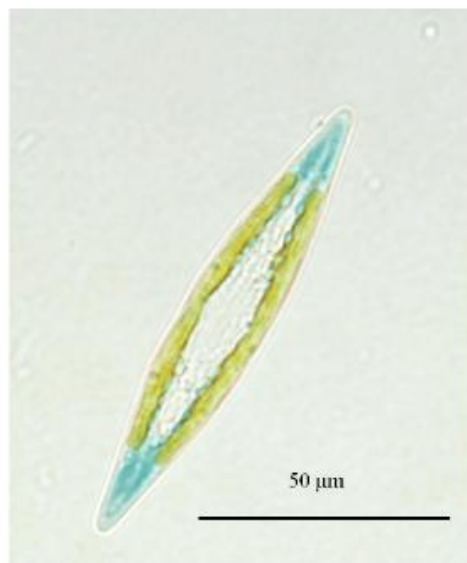
Vibrio alginolyticus merupakan bakteri patogen gram negatif, fakultatif anaerob, berbentuk melengkung, halofilik. Bakteri ini hidup bebas di lingkungan perairan maupun menjadi parasit pada vertebrata atau invertebrata perairan. *V. alginolyticus* tumbuh pada suhu 10°C-40°C dan pH 7.5-9 (Mustapha *et al.*, 2013). Infeksi pada hewan perairan terlebih budidaya baik melalui air yang terkontaminasi maupun kontak langsung sangat merugikan karena dapat menyebabkan penyakit vibriosis yang sering menjadi penyebab kematian dalam waktu singkat pada benih maupun indukan. Penularan pada manusia juga dapat terjadi akibat konsumsi makanan laut mentah atau setengah matang. Infeksi pada manusia menyebabkan peradangan serius pada gastroenteritis dan ekstraintestinal seperti otitis, infeksi mata, infeksi intrakranial peritonitis, dan osteomyelitis. Selain itu, sifat patogen oportunistik bakteri menyebabkan penularan pada *immunocompromised* lebih berisiko karena dapat menyebabkan *Necrotizing Soft Tissue Infection* (NSTIs), bakteremia, syok septik, dan beberapa kegagalan organ (Fu *et al.*, 2016). Bakteri ini menghasilkan banyak ekstraseluler protease yang bertanggung jawab pada interaksi antara bakteri dan sel inang dan sebagai penyebab infeksi pada manusia maupun hewan laut (Kang *et al.*, 2016).



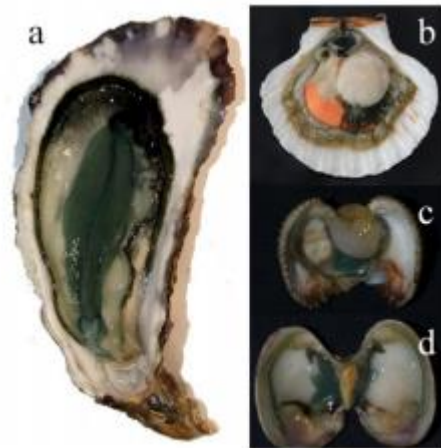
Gambar 2.2 *Vibrio alginolyticus* (Cao *et al.*, 2018).

2.2 *Haslea ostrearia*

Haslea ostrearia merupakan mikroalga diatom uniseluler, fotoautotrof obligat, dan memiliki bentuk benthik, epifit, atau planctonik (Gastineau *et al.*, 2014b). Suhu pertumbuhan untuk mikroalga ini berkisar $-11-30^{\circ}\text{C}$, dengan suhu optimalnya adalah $12-18^{\circ}\text{C}$ (Davidovich *et al.*, 2018). *Haslea ostrearia* dapat mensintesis pigmen biru-hijau larut air *marennine* pada fase eksponensial pertumbuhan dan penuaan. Diatom ini sering ditemukan di perairan dangkal kolam budidaya tiram (Mouget *et al.*, 2005). Keberadaannya di wilayah perairan menjadi penyebab munculnya warna kehijauan pada organisme laut seperti tiram, kerang, kepiting, anemon laut, dll. Jumlah *marennine* yang dilepaskan pada perairan berkisar $1-15\ \mu\text{g m}^{-1}$ (Falaise *et al.*, 2019). Habitatnya di kolam tiram yang dangkal membuat *Haslea ostrearia* beradaptasi pada perubahan kualitas cahaya dikenal dengan sifat *euryhaline* artinya dapat berkembang di lingkungan dengan cahaya tinggi. Selain itu juga mampu menyesuaikan dari tingginya radiasi dan tekanan akibat sinar UV. Mikroalga ini umumnya berukuran $20-140\ \mu\text{m}$ dengan bagian tubuhnya tersusun dari karbohidrat (50 mg), protein (200 mg), lipid (60-200 mg), asam lemak, *glycolipid*, dan lemak netral (Gastineau *et al.*, 2014a).



Gambar 2.3 *Haslea ostrearia* (Pouvreau *et al.*, 2006b).



Gambar 2.4 Efek penghijauan bivalvia (a) tiram pasifik, (b) scallop, (c) cockle, (d) clam

(Gastineau *et al.*, 2014b).

2.3 *Marennine* sebagai Senyawa Antibakteri

Pigmen biru-hijau hidrosoluble *marennine* merupakan hasil sintesis diatom *Haslea ostrearia*. Pigmen ini dihasilkan selama proses pertumbuhan dan penuaan melalui jalur sintesis sitoplasma yang distimulasi oleh kadar cahaya tinggi dan panjang, pantulan cahaya biru, dan terbatasnya nutrisi. Selain merupakan penyebab penghijauan tiram pigmen ini juga diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis seperti alelopati, antioksidan, antibakteri, antivirus, dan penghambat pertumbuhan (Gastineau *et al.*, 2012a). Terdapat dua jenis *marennine* yaitu *Intracellular Marennine* (Imn) yang terletak pada apikal sel dan *Extracellular Marennine* (Emn) hasil dari proses sekresi karena ditemukan di media luar pertumbuhan. Kedua jenis *marennine* ini berbeda berat molekul dan karakteristik spektroskopinya. Karakteristik awal pigmen disebutkan merupakan polifenol tak terhidrolisa atau molekul kompleks unit glikosidik yang berikatan dengan satu atau beberapa macam cincin aromatik dengan berat molekul antara 3-10 kDA (Falaise *et al.*, 2019). Polifenol diketahui memiliki aktivitas biologis sebagai antibakteri. Polifenol mampu menghambat atau membunuh bakteri dengan menyebabkan kerusakan pada permeabilitas membran sel, mengganggu membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme intraseluler akibat ikatan hidrogen dari senyawa fenolik ke enzim (Chibane *et al.*, 2019). Penelitian sifat antibakteri pada bakteri gram negatif *Escherichia coli* oleh senyawa mirip *marennine* diketahui terjadi akibat interaksi yang dilakukan dengan lipopolisakarida (LPS) pada membran luar (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Warna pigmen dapat berubah bergantung pada pH pertumbuhan semakin asam pH maka warna violet akan berubah menjadi biru dan akan berubah kembali menjadi hijau pada pH basa (Gastineau *et al.*, 2018). Secara singkat dijelaskan cara memurnikan baik intra maupun ekstraseluler *marennine* yaitu dengan mengekstrak pelet alga untuk intraseluler

marennine dan medium biakan biru sebagai ekstraseluler *marennine*. Kemudian, dilakukan purifikasi menggunakan dua kali ultrafiltrasi dan satu kali *anion-exchange* HPLC. Analisa kemurnian terakhir menggunakan UV-Visible PDA untuk mencapai tingkat kemurnian yang diperlukan (Pouvreau *et al.*, 2006a).

2.4 Mekanisme Kerja Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa dengan sifat bakteristatik dan bakteriosidal. Bakteristatik bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan bakteriosidal membunuh bakteri. Bakteristatik dapat menjadi bersifat bakteriosidal dalam konsentrasi tinggi. Antibakteri dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme kerja merusak permeabilitas dinding sel, mengganggu permeabilitas sel, menghambat sintesis asam nukleat, menginaktivasi enzim, merusak fungsi molekul protein dan asam nukleat (Purnamaningsih *et al.*, 2017). Faktor yang mempengaruhi keefektifan aktivitas antibakteri antara lain konsentrasi senyawa antibakteri, suhu, pH, waktu kontak, jenis dan jumlah mikroorganisme, sifat fisiko-kimia senyawa (Agfadila *et al.*, 2017). Beberapa senyawa kimia yang memiliki sifat antibakteri diantaranya fenol, *phenolic acid*, kuinon, flavon, flavonoid, tanin, kumarin, terpen, alkaloid, dan alkohol (Stefanovic *et al.*, 2012).

2.5 Uji Aktivitas Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar*

Pengujian antibakteri dapat dilakukan salah satunya dengan menggunakan metode *disk diffusion agar*. Keuntungan menggunakan metode ini diantaranya sederhana, murah, mampu menguji berbagai macam mikroorganisme maupun agen antibakteri, dan hasil yang diperoleh mudah untuk diinterpretasi. Metode pengujian antibakteri menggunakan metode *disk diffusion agar* dilaksanakan dengan menginokulasi mikroorganisme uji ke dalam media padat dalam sebuah cawan. Kemudian, kertas cakram berdiameter 6 mm yang berisikan senyawa uji pada konsentrasi yang diinginkan ditempatkan pada permukaan agar. Cawan petri tersebut kemudian diinkubasi dalam kondisi tertentu yang sesuai. Proses penghambatan dapat terjadi karena senyawa antibakteri yang berda di kertas cakram berdifusi ke dalam agar. Hasil penghambatan akan berupa terbentuknya *clear zone* atau zona bening pada sekitar cakram (Balouiri *et al.*, 2016). Semakin luas zona bening yang terbentuk maka semakin tinggi aktivitas antibakterinya. Diameter zona bening ditentukan dengan hasil keseluruhan diameter dikurangi diameter kertas cakram. Diameter zona bening digunakan sebagai respon kemampuan penghambatan senyawa antibakteri dengan klasifikasi lemah (diameter <5 mm), sedang (diameter 5-10 mm), kuat (diameter 10-20 mm), sangat kuat (diameter >20 mm) (Sungkar *et al.*, 2018).

2.6 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Pengujian MIC dilaksanakan untuk mengetahui konsentrasi terendah agen antibakteri dalam melakukan penghambatan pertumbuhan bakteri. MIC dapat diketahui dengan metode pengenceran berseri dua kali lipat makro atau mikrodilusi (Reller *et al.*, 2009). Metode ini dilaksanakan dengan meletakkan media dan agen antibakteri pada sumur kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga konsentrasi yang diinginkan. Kemudian, keseluruhan sumur diinokulasi dengan bakteri sesuai standar, diinkubasi selama 18-24 jam, lalu hasil diperiksa (Owuama, 2017). Hasil MIC dapat berupa kuantitatif dan kualitatif. Hasil kualitatif keruh dan terdapat sedimen menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Sedangkan hasil kuantitatif diperoleh dengan mengukur *Optical Density* (OD) berdasarkan turbiditas menggunakan spektrofotometer untuk makrodilusi maupun *microplate reader* untuk mikrodilusi (Krcic *et al.*, 2020).

2.7 Uji Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Pengujian MBC digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang diperlukan untuk membunuh 99,9% bakteri. MBC ditentukan berdasarkan hasil MIC yang diinokulasikan pada media agar dan diinkubasi 18-24 jam. Hasil MBC ditentukan berdasarkan pengamatan kualitatif jumlah sel yang bertahan hidup setelah dilakukan inkubasi pada konsentrasi terendah. Konsentrasi sampel yang menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri <10 merupakan hasil MBC (Mogana *et al.*, 2020).

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian dilaksanakan pada Februari 2020 sempat terhenti akibat pandemi, hingga dilanjutkan kembali pada Agustus-Januari 2021. Proses penelitian bertempat di Laboratorium Bioteknologi Fakultas Teknologi Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan selama penelitian diantaranya autoklaf, kompor listrik, gelas beker, bunsen, spatula, pengaduk kaca, cawan petri, erlenmeyer 250 ml, gelas ukur 100 ml, *hotplate* (heidolph), inkubator (heratorm), penggaris, *Laminar Air Flow* (LAF), kulkas, jarum ose, mikropipet 100-1000 μ l, mikropipet 10-100 μ l, rak tabung reaksi, tabung reaksi, gunting, pinset, *96-well plate* (costar 96), *micro plate reader* (SPECTROstar Nano), spektrofotometer uv-vis, timbangan digital, *vortex*, *waterbath* (memmert), kapas, kertas sampul cokelat, tip, kertas label, spidol permanen, plastik wrap, aluminium foil, tisu, sarung tangan, dan *spreader*.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan selama penelitian diantaranya alkohol 70%, aquades, bakteri *Vibrio alginolyticus*, bakteri *Bacillus cereus*, kertas cakram (*Blank Disk Oxoid*), media NA (Merck), media NB (Merck), spirtus, *Blue Water* (BW) ekstraseluler *marennine*, dan kloramfenikol 1000 ppm. Stok pigmen ekstraseluler *marennine* berupa *blue-water* (BW) didapatkan dari Laboratorium Sentral Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya Malang. Bakteri *Vibrio alginolyticus* diperoleh dari Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan (FPIK) Universitas Brawijaya. Bakteri *Bacillus cereus* didapatkan dari Fakultas Teknologi Pertanian (FTP) Universitas Brawijaya.

3.3 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode kuantitatif eksperimental. Teknik ini menggunakan metode ilmiah untuk mengidentifikasi hubungan sebab-akibat variabel penelitian. Metode ini juga mengatur variabel independen sehingga dapat menentukan pengaruhnya terhadap variabel dependen (Usman, 2015).

3.3.1 Uji Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar*

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan dua pola faktor dan 3 kali ulangan. Parameter ini digunakan sebagai penentu hubungan antara dua faktor yaitu suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan dengan efisiensi pengukuran aktivitas antibakteri. Suhu pemanasan yang digunakan adalah 30°C, 40°C, dan 50°C, sedangkan lama waktu pemanasan yang digunakan adalah 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit. Penelitian ini juga menggunakan kloramfenikol 1000 ppm sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif.

Tabel 3.1 Rancangan percobaan uji antibakteri metode *disk diffusion agar*

Suhu Pemanasan	Lama Waktu Pemanasan	Ulangan		
		1	2	3
S1	W1	S1W1	S1W1	S1W1
	W2	S1W2	S1W2	S1W2
	W3	S1W3	S1W3	S1W3
	W4	S1W4	S1W4	S1W4
	W5	S1W5	S1W5	S1W5
	W6	S1W6	S1W6	S1W6
S2	W1	S2W1	S2W1	S2W1
	W2	S2W2	S2W2	S2W2
	W3	S2W3	S2W3	S2W3
	W4	S2W4	S2W4	S2W4
	W5	S2W5	S2W5	S2W5
	W6	S2W6	S2W6	S2W6
S3	W1	S3W1	S3W1	S3W1
	W2	S3W2	S3W2	S3W2
	W3	S3W3	S3W3	S3W3
	W4	S3W4	S3W4	S3W4
	W5	S3W5	S3W5	S3W5
	W6	S3W6	S3W6	S3W6

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit

W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

S1W1 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 5 menit

S1W2 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 10 menit

S1W3 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 15 menit

S1W4 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 20 menit

S1W5 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 25 menit

S1W6 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 30°C dan lama waktu 30 menit

S2W1 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 5 menit

S2W2 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 10 menit

S2W3 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 15 menit

S2W4 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 20 menit

S2W5 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 25 menit

S2W6 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 40°C dan lama waktu 30 menit

S3W1 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 5 menit

S3W2 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 10 menit

S3W3 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 15 menit

S3W4 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 20 menit

S3W5 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 25 menit

S3W6 = hasil zona bening *marennine* perlakuan suhu 50°C dan lama waktu 30 menit

3.3.2 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan

Acak Kelompok (RAK) Faktorial dengan tiga pola faktor dan 3 kali ulangan. Parameter ini

digunakan sebagai penentu hubungan antara tiga faktor yaitu konsentrasi, suhu

pemanasan dan lama waktu pemanasan dengan efisiensi pengukuran besar nilai

absorbansi. Suhu pemanasan yang digunakan adalah 30°C, 40°C, dan 50°C. Lama waktu

pemanasan yang digunakan adalah 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit. Konsentrasi yang

digunakan adalah 1; 0,5; 0,25; 0,125 ppm. Penelitian ini juga menggunakan kloramfenikol

1000 ppm yang ditambahkan pada media dengan bakteri uji sebagai kontrol positif.

Marennine konsentrasi 1 ppm tanpa perlakuan yang ditambahkan pada media sebagai

kontrol negatif.

Tabel 3.2 Rancangan percobaan uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Suhu Pemanasan	Lama Waktu Pemanasan	Konsentrasi Marennine	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 3
S1	W1	M1	S1W1M1	S1W1M1	S1W1M1
		M2	S1W1M2	S1W1M2	S1W1M2
		M3	S1W1M3	S1W1M3	S1W1M3
		M4	S1W1M4	S1W1M4	S1W1M4
	W2	M1	S1W2M1	S1W2M1	S1W2M1
		M2	S1W2M2	S1W2M2	S1W2M2
		M3	S1W2M3	S1W2M3	S1W2M3
		M4	S1W2M4	S1W2M4	S1W2M4
	W3	M1	S1W3M1	S1W3M1	S1W3M1
		M2	S1W3M2	S1W3M2	S1W3M2
		M3	S1W3M3	S1W3M3	S1W3M3
		M4	S1W3M4	S1W3M4	S1W3M4
	W4	M1	S1W4M1	S1W4M1	S1W4M1
		M2	S1W4M2	S1W4M2	S1W4M2
		M3	S1W4M3	S1W4M3	S1W4M3
		M4	S1W4M4	S1W4M4	S1W4M4
	W5	M1	S1W5M1	S1W5M1	S1W5M1
		M2	S1W5M2	S1W5M2	S1W5M2
		M3	S1W5M3	S1W5M3	S1W5M3
		M4	S1W5M4	S1W5M4	S1W5M4
W6	M1	S1W6M1	S1W6M1	S1W6M1	
	M2	S1W6M2	S1W6M2	S1W6M2	
	M3	S1W6M3	S1W6M3	S1W6M3	
	M4	S1W6M4	S1W6M4	S1W6M4	
S2	W1	M1	S2W1M1	S2W1M1	S2W1M1
		M2	S2W1M2	S2W1M2	S2W1M2
		M3	S2W1M3	S2W1M3	S2W1M3
		M4	S2W1M4	S2W1M4	S2W1M4
	W2	M1	S2W2M1	S2W2M1	S2W2M1
		M2	S2W2M2	S2W2M2	S2W2M2
		M3	S2W2M3	S2W2M3	S2W2M3
		M4	S2W2M4	S2W2M4	S2W2M4
	W3	M1	S2W3M1	S2W3M1	S2W3M1
		M2	S2W3M2	S2W3M2	S2W3M2
M3		S2W3M3	S2W3M3	S2W3M3	
M4		S2W3M4	S2W3M4	S2W3M4	
W4	M1	S2W4M1	S2W4M1	S2W4M1	
	M2	S2W4M2	S2W4M2	S2W4M2	
	M3	S2W4M3	S2W4M3	S2W4M3	
	M4	S2W4M4	S2W4M4	S2W4M4	
W5	M1	S2W5M1	S2W5M1	S2W5M1	
	M2	S2W5M2	S2W5M2	S2W5M2	

			M3	S2W5M3	S2W5M3	S2W5M3
			M4	S2W5M4	S2W5M4	S2W5M4
		W6	M1	S2W6M1	S2W6M1	S2W6M1
			M2	S2W6M2	S2W6M2	S2W6M2
			M3	S2W6M3	S2W6M3	S2W6M3
			M4	S2W6M4	S2W6M4	S2W6M4
S3	W1		M1	S3W1M1	S3W1M1	S3W1M1
			M2	S3W1M2	S3W1M2	S3W1M2
			M3	S3W1M3	S3W1M3	S3W1M3
			M4	S3W1M4	S3W1M4	S3W1M4
		W2	M1	S3W2M1	S3W2M1	S3W2M1
			M2	S3W2M2	S3W2M2	S3W2M2
			M3	S3W2M3	S3W2M3	S3W2M3
			M4	S3W2M4	S3W2M4	S3W2M4
		W3	M1	S3W3M1	S3W3M1	S3W3M1
			M2	S3W3M2	S3W3M2	S3W3M2
			M3	S3W3M3	S3W3M3	S3W3M3
			M4	S3W3M4	S3W3M4	S3W3M4
		W4	M1	S3W4M1	S3W4M1	S3W4M1
			M2	S3W4M2	S3W4M2	S3W4M2
			M3	S3W4M3	S3W4M3	S3W4M3
			M4	S3W4M4	S3W4M4	S3W4M4
		W5	M1	S3W5M1	S3W5M1	S3W5M1
			M2	S3W5M2	S3W5M2	S3W5M2
			M3	S3W5M3	S3W5M3	S3W5M3
			M4	S3W5M4	S3W5M4	S3W5M4
		W6	M1	S3W6M1	S3W6M1	S3W6M1
			M2	S3W6M2	S3W6M2	S3W6M2
			M3	S3W6M3	S3W6M3	S3W6M3
			M4	S3W6M4	S3W6M4	S3W6M4

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30 °C

S2 = suhu pemanasan 40 °C

S3 = suhu pemanasan 50 °C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit

W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

M1 = konsentrasi *marennine* 1 ppm

M2 = konsentrasi *marennine* 0,5 ppm

M3 = konsentrasi *marennine* 0,25 ppm

M4 = konsentrasi *marennine* 0,125 ppm

S1W1M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 1 ppm

S1W1M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W1M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W1M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,125 ppm

S1W2M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 1 ppm

S1W2M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W2M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W2M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,125 ppm

S1W3M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 1 ppm

S1W3M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W3M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W3M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,125 ppm

S1W4M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 1 ppm

S1W4M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W4M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W4M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,125 ppm

S1W5M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 1 ppm

S1W5M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W5M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W5M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,125 ppm

S1W6M1 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 1 ppm

S1W6M2 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,5 ppm

S1W6M3 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,25 ppm

S1W6M4 = absorbansi perlakuan suhu 30°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,125 ppm

S2W1M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 1 ppm

S2W1M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,5 ppm

S2W1M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,25 ppm

S2W1M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,125 ppm

S2W2M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 1 ppm

S2W2M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,5 ppm

S2W2M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,25 ppm

- S2W2M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S2W3M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 1 ppm
- S2W3M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S2W3M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S2W3M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S2W4M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 1 ppm
- S2W4M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S2W4M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S2W4M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S2W5M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 1 ppm
- S2W5M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S2W5M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S2W5M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S2W6M1 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 1 ppm
- S2W6M2 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S2W6M3 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S2W6M4 = absorbansi perlakuan suhu 40°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S3W1M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 1 ppm
- S3W1M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S3W1M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S3W1M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S3W2M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 1 ppm
- S3W2M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S3W2M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S3W2M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S3W3M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 1 ppm
- S3W3M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,5 ppm
- S3W3M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,25 ppm
- S3W3M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,125 ppm
- S3W4M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 1 ppm
- S3W4M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,5 ppm

S3W4M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,25 ppm

S3W4M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,125 ppm

S3W5M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 1 ppm

S3W5M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,5 ppm

S3W5M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,25 ppm

S3W5M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,125 ppm

S2W6M1 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 1 ppm

S2W6M2 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,5 ppm

S2W6M3 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,25 ppm

S2W6M4 = absorbansi perlakuan suhu 50°C lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,125 ppm

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian dimulai dengan menentukan konsentrasi sampel *marennine* yang digunakan, sterilisasi alat dan bahan, membuat media NA dan NB, peremajaan bakteri, dan pembuatan larutan sampel. Persiapan yang telah dilakukan akan dilanjutkan pada proses pengujian diantaranya uji aktivitas antibakteri metode *disk diffusion agar*, uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC).

3.4.1 Penentuan Konsentrasi Sampel *Marennine*

Konsentrasi *marennine* dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Stok pigmen diambil sebanyak 3 ml, kemudian dicari panjang gelombang maksimum antara 500-700 nm, lalu dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan panjang gelombang maksimum yang telah didapatkan. Kegiatan pengujian dilanjutkan dengan mengambil sebanyak 300 µl stok pigmen ekstraseluler *marennine*, kemudian dilarutkan pada aquades steril 2,7 ml. Larutan hasil pengenceran dicari panjang gelombang maksimum pada rentang 500-700 nm, lalu dilakukan pengukuran nilai absorbansi untuk melengkapi perhitungan nilai konsentrasi. Konsentrasi *marennine* dapat diperoleh menggunakan rumus berikut: (Permatasari, 2019).

$$[C] = \left\{ \frac{A\lambda_{max}}{\epsilon\lambda_{max}.L} \right\}$$

Keterangan:

C = konsentrasi pigmen (mg.L⁻¹)

Aλ_{max} = absorbansi pada λ_{max}

$E_{\lambda_{max}}$ = koefisien absorpsi *marennine* ($12.13 \text{ l g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
L = diameter kuvet (1 cm)

3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Penelitian yang akan dilaksanakan harus dalam keadaan steril, oleh karenanya perlu dilakukan proses sterilisasi pada alat dan bahan yang akan dilakukan. Sterilisasi merupakan proses membunuh mikroorganisme hingga spora yang terdapat pada alat dan bahan agar terhindar dari kontaminasi. Proses sterilisasi alat dan bahan dilakukan menggunakan autoklaf untuk cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, tip kuning, tip biru, mikrotube, kertas cakram, media NA, media NB, dan aquades. Autoklaf merupakan alat yang digunakan untuk sterilisasi metode uap panas bertekanan. Sterilisasi menggunakan autoklaf dilakukan pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm (Istini, 2020). Proses sterilisasi juga dilakukan menggunakan radiasi sinar UV untuk *96-well plate* karena bahan *polypropylene* dan *polystyrene* tidak dapat diautoklaf. Radiasi sinar UV dinyatakan efektif dalam membunuh mikroorganisme karena dapat menyebabkan mutasi dan transformasi pada DNA akibat absorpsi foton pada DNA merangsang pembentukan dimer primidin yang mana aktivitas perbaikan oleh DNA tidak dapat dilakukan. Proses sterilisasi dilakukan dengan penyinaran langsung selama 30 menit (Sharma, 2012).

3.4.3 Pembuatan Media

Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media *Nutrient Agar* (NA) dan *Nutrient Broth* (NB). Media NA digunakan untuk uji antibakteri metode *disk diffusion agar* dan uji MBC. Pembuatan media NA untuk satu kali uji antibakteri dibutuhkan sebanyak 8 gram yang dilarutkan pada 400 ml aquades, sedangkan untuk uji MBC dibutuhkan sebanyak 1,6 gram yang dilarutkan pada 80 ml aquades. Media NA yang digunakan untuk uji antibakteri dan uji MBC setelah ditimbang diletakkan pada erlenmeyer dan diberi aquades sesuai hitungan, lalu media dilarutkan sambil dipanaskan menggunakan kompor listrik dan diaduk menggunakan pengaduk kaca. Mulut erlenmeyer diberi kapas dan dilapisi kertas sampul coklat. Keseluruhan media tersebut dilakukan seterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Ayen *et al.*, 2017).

Media NB dalam penelitian ini digunakan untuk peremajaan bakteri dan uji MIC. Pembuatan media NB untuk satu kali peremajaan bakteri dibutuhkan sebanyak 0,08 gram yang dilarutkan pada 10 ml aquades, sedangkan untuk sekali uji MIC dibutuhkan sebanyak 0,4 gram yang dilarutkan pada 50 ml aquades. Media NB yang digunakan untuk peremajaan bakteri setelah ditimbang diletakkan pada tabung reaksi dan diberi aquades sesuai hitungan, kemudian diaduk hingga larut, lalu bagian mulut tabung ditutup kapas

dan dilapisi kertas sampul cokelat. Penggunaan media NB untuk uji MIC setelah ditimbang diletakkan pada erlenmeyer dan diberi aquades sesuai hitungan, lalu media dilarutkan sambil dipanaskan menggunakan kompor listrik dan diaduk menggunakan pengaduk kaca. Mulut erlenmeyer diberi kapas dan dilapisi kertas sampul cokelat. Keseluruhan media tersebut dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Ayen *et al.*, 2017).

3.4.4 Persiapan Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri dilaksanakan dengan mengambil sebanyak satu ose bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* dari stok kultur, kemudian disuspensi pada 10 ml media NB dalam tabung reaksi. Suspensi bakteri lalu divortex dan dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Proses pembuatan suspensi bakteri dilaksanakan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) (Ayen *et al.*, 2017).

3.4.5 Pembuatan Larutan Sampel

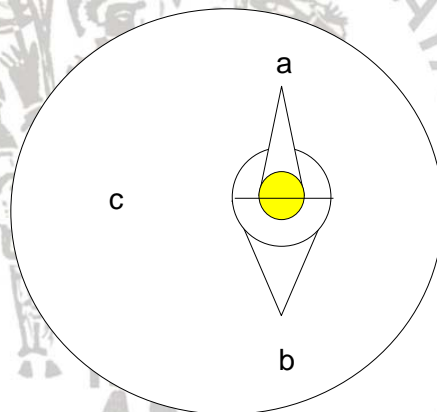
Marennine yang akan digunakan sebagai sampel terlebih dahulu harus diencerkan sesuai konsentrasi yang diinginkan yaitu 1 ppm. Pengenceran dilakukan sesuai dengan rumus menggunakan aquades steril (Sarwendah *et al.*, 2020). Konsentrasi yang digunakan untuk uji antibakteri dan MIC sama-sama menggunakan 1 ppm oleh karenanya pembuatan larutan sampel *marennine* hanya akan dilakukan sekali diawal. Proses pembuatan dilakukan dengan mengambil 519,6 µl dari stok kultur *marennine*, kemudian diencerkan dengan aquades steril sebanyak 54,6 ml, lalu dihomogenkan untuk menghasilkan larutan stok sampel *marennine*. Sampel yang digunakan dalam pengujian ini selain menggunakan *marennine* juga menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif dan aquades steril sebagai kontrol negatif untuk uji antibakteri. Sedangkan, untuk uji MIC digunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif dan media NB yang dicampurkan dengan *marennine* sebagai kontrol negatif.

Proses pembuatan sampel *marennine* setelah diencerkan dilanjutkan dengan pemanasan larutan sampel sesuai faktor pengujian. Stok sampel *marennine* diletakkan pada 6 mikrotube yang masing-masing diisi sebanyak 30 µl untuk uji antibakteri dan 150 µl untuk pengujian MIC. Sampel tersebut kemudian dipanaskan menggunakan *waterbath* sesuai suhu dan lama waktu pemanasan faktor pengujian yaitu suhu 30°C, 40°C, 50°C dan lama waktu pemanasan 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit, 25 menit, 30 menit.

3.4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar*

Pengujian dilakukan dengan metode *disk diffusion agar* pada *Laminar Air Flow* (LAF) dengan hasil berupa terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram setelah waktu inkubasi 1x24 jam. Proses pengujian dilaksanakan dengan terlebih dahulu

menuangkan media NA kedalam cawan petri steril dan ditunggu hingga padat. Cawan petri berisi media diberikan tanda menggunakan spidol permanen berupa garis membagi 3 bagian dan huruf A (aquades steril), K (kloramfenikol), dan M (*marennine*). Suspensi kultur bakteri *Vibrio alginolyticus* atau *Bacillus cereus* yang telah disiapkan dihomogenkan terlebih dahulu menggunakan vortex, lalu diambil sebanyak 50 µl untuk diinokulasikan pada cawan petri berisi media, kemudian dispread menggunakan spreader. Kertas cakram steril berukuran 6 mm disiapkan untuk kemudian direndam pada kloramfenikol, aquades steril, dan sampel *marennine* sesuai jumlah. Setelah itu, kertas cakram yang telah direndam diletakkan pada cawan petri bagian A untuk cawan yang direndam aquades steril, K yang direndam kloramfenikol, dan M untuk cakram yang direndam sampel *marennine* menggunakan pinset. Cawan petri diberi plastik wrap melingkari bagian cawan hingga tertutup, kemudian cawan diberikan label untuk diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Pengujian dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali (Permatasari *et al.*, 2019). Hasil pengujian akan berupa zona bening pada sekitar kertas cakram yang kemudian diukur menggunakan penggaris untuk data kuantitatif. Zona bening dideskripsikan sesuai **Gambar 3.1**.



Gambar 3.1 Perhitungan Diameter Zona Bening

Keterangan:

a = diameter kertas cakram (6 mm)

b = diameter zona bening terbentuk (mm)

c = daerah pertumbuhan bakteri

Perhitungan zona bening:

$$\text{Diameter Zona Bening} = \text{Diameter Zona Bening Terbentuk} - \text{Diameter Kertas Cakram}$$

3.4.7 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Pengujian MIC dilakukan pada *Laminar Air Flow* (LAF) dengan menggunakan *microplate reader* dengan hasil kuantitatif dan kualitatif. Hasil kuantitatif berupa nilai absorbansi, sedangkan nilai kualitatif berupa visual tingkat kekeruhan. Persiapan dilakukan dengan menyiapkan media NB, suspensi bakteri, kloramfenikol, *marennine* (tanpa perlakuan), dan sampel *marennine*. *96-well plate* yang akan digunakan terlebih dahulu digambarkan peta peletakannya. Peta peletakan sampel dapat dilihat pada

Gambar 3.2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
D	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
E	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
F	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
G	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
H	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24

Gambar 3.2 Peta Peletakan Sampel Uji MIC

Keterangan:

N = kontrol negatif

P = kontrol positif

X1 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 5 menit konsentrasi 1 ppm

X2 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,5 ppm

X3 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,25 ppm

X4 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 5 menit konsentrasi 0,125 ppm

X5 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 10 menit konsentrasi 1 ppm

X6 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,5 ppm

X7 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,25 ppm

X8 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 10 menit konsentrasi 0,125 ppm

X9 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 15 menit konsentrasi 1 ppm

X10 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,5 ppm

X11 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,25 ppm

X12 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 15 menit konsentrasi 0,125 ppm

X13 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 20 menit konsentrasi 1 ppm

X14 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,5 ppm
X15 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,25 ppm
X16 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 20 menit konsentrasi 0,125 ppm
X17 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 25 menit konsentrasi 1 ppm
X18 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,5 ppm
X19 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,25 ppm
X20 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 25 menit konsentrasi 0,125 ppm
X21 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 30 menit konsentrasi 1 ppm
X22 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,5 ppm
X23 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,25 ppm
X24 = *marennine* perlakuan suhu X lama pemanasan 30 menit konsentrasi 0,125 ppm
*suhu X dapat berupa suhu 30°C, 40°C, dan 50°C

Kontrol negatif dalam satu lubang diisi dengan 50 µl media NB dan 50 µl *marennine*, sedangkan untuk kontrol positif digunakan 50 µl kloramfenikol dan 50 µl suspensi bakteri. Sampel *marennine* dilakukan pengenceran untuk mendapatkan nilai konsentrasi setengah dari konsentrasi sebelumnya. Proses pengenceran dilakukan sebanyak 4 kali, sehingga didapatkan konsentrasi *marennine* untuk sampel berkisar 1 ppm, 0,5 ppm, 0,25 ppm, dan 0,125 ppm. Pengenceran dikerjakan dengan mengisi keempat lubang dengan 50 µl media NB, kemudian pada lubang pertama diisi dengan *marennine* yang telah diberi perlakuan, lalu dipipeting sebanyak 3-4 kali. Setelah itu, 50 µl homogen media NB dengan *marennine* diambil dan dimasukkan ke lubang kedua, proses yang sama digunakan untuk mengisi lubang ketiga dan keempat, kemudian pada lubang keempat 50 µl homogen dibuang. Pengerjaan diulang sebanyak 3 kali hingga seluruh lubang pada *plate* terisi sesuai ketentuan peta. Suspensi bakteri sebanyak 50 µl dimasukkan dalam seluruh lubang untuk sampel *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu, lama waktu pemanasan, dan pengenceran. *96-well* ditutup, diberi plastik wrap disekitarnya, dan dilabel sesuai perlakuan. *Plate* diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Mogana *et al.*, 2020). Hasil pengujian akan diamati secara langsung terkait kekeruhan dan menggunakan *microplate reader* untuk melihat kepadatan sel melalui nilai absorbansi pada panjang gelombang 625 nm.

3.4.8 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Pengujian MBC dilakukan setelah mendapatkan hasil dari uji MIC. Sebelum dilakukan pengujian terlebih dahulu dilakukan persiapan berupa menuangkan media NA kedalam cawan petri steril dan ditunggu hingga memadat. Proses pengujian dilanjutkan dengan melihat hasil absorbansi MIC, hasil yang menunjukkan angka paling kecil dan mendekati hasil kontrol positif nantinya akan digunakan untuk pengujian. Lubang yang

telah ditandai untuk pengujian MBC diambil larutan homogen didalamnya sebanyak 100 µl untuk diinokulasikan dalam media NA yang telah disiapkan, kemudian larutan dispread menggunakan spreader. Cawan petri kemudian di tutup dengan plastik wrap dan dilakukan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C (Mogana *et al.*, 2020). Hasil pengujian ini akan berupa ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri yang terlihat pada media NA.

3.5 Pengamatan dan Analisis Data

3.5.1 Uji Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar*

Data hasil penelitian dikumpulkan dan ditabulasikan menggunakan Microsoft Excel 2013. Hasil penelitian dilakukan analisa *Fit General Linear Model Analysis Of Variance* (ANOVA) dengan analisa tingkat kepercayaan sebesar 95% menggunakan MiniTab17. Analisa digunakan untuk mengetahui hasil komparasi antara dua faktor yaitu suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan serta untuk melihat interaksi antar kedua faktor dengan respon. Hasil yang menunjukkan pengaruh nyata ($P\text{-value} < 0,05$) dilakukan pengujian lanjut dengan metode Tukey.

3.5.2 Uji *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC)

Hasil penelitian dilakukan analisa *Fit General Linear Model Analysis Of Variance* (ANOVA) dengan analisa tingkat kepercayaan sebesar 95% menggunakan MiniTab17. Analisa digunakan untuk mengetahui hasil komparasi antara tiga faktor yaitu suhu pemanasan, lama waktu pemanasan, dan konsentrasi. Teknik analisa menggunakan metode ini juga digunakan untuk melihat interaksi antara dua dan tiga faktor dengan respon. Hasil yang berpengaruh nyata ($P\text{-value} < 0,05$) dilakukan uji lanjut menggunakan metode Tukey.

BAB IV PEMBAHASAN

4.1 Konsentrasi Sampel *Marennine*

Sampel yang digunakan dalam penelitian berbentuk “*Blue Water*” (Gambar 4.1) dengan jenis *marennine* ekstraseluler yang disekresikan oleh *Haslea ostrearia* pada media pertumbuhan. Tahapan ekstraksi ekstraseluler *marennine* dilakukan dengan mengikuti metode (Pouvreau, 2006a) dengan terlebih dahulu dilakukan sentrifugasi untuk diambil supernatan berwarna biru. Supernatan tersebut kemudian disaring menggunakan GF/F Filter Whatman (0,45 μm) pada suhu 4°C dengan kondisi gelap. Filtrat tanpa badan sel yang dihasilkan berupa larutan “*Blue Water*” (Tahapan tidak dikerjakan oleh penulis).



Gambar 4.1 *Marennine* dalam bentuk “*Blue Water*” (Dokumentasi Pribadi)

Larutan “*Blue Water*” sebagai stok pigmen *marennine* kemudian ditentukan konsentrasinya dengan analisa spektrofotometri dengan blanko aquades yang kemudian dimasukkan dalam rumus perhitungan konsentrasi *marennine*. Hasil analisa konsentrasi stok pigmen *marennine* terdapat pada **Tabel 4.1**.

Tabel 4.1 Hasil analisa konsentrasi stok pigmen ekstraseluler *marennine*

Sampel	λ_{max} (nm)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)
Stok Pigmen <i>Marennine</i>	659,5	1,289	106,2
Stok Pigmen <i>Marennine</i> pengenceran 10x	661	0,128	10,55

Hasil analisa konsentrasi tersebut menunjukkan terdapat perubahan panjang gelombang maksimum pada stok pigmen *marennine* yang telah diencerkan 10x dari yang

sebelumnya sebesar 659,5 nm menjadi 661nm setelah dilakukan pengenceran. Perubahan panjang gelombang setelah dilakukan pengenceran terjadi akibat adanya perubahan pH menjadi lebih basa setelah penambahan aquades. Perubahan nilai pH menyebabkan pergeseran panjang gelombang menjadi lebih besar akibat meningkatnya proton dalam larutan. Proton diketahui dapat menyerap foton lebih tinggi dari elektron sehingga nilai absorbansinya tinggi (Arrohmah, 2007). Pergeseran panjang gelombang menyebabkan nilai konsentrasi *marennine* yang telah diencerkan menjadi 10,55 ppm.

Hasil ini lebih kecil dari perkiraan konsentrasi *marennine* sebesar 10,62 ppm setelah diencerkan.

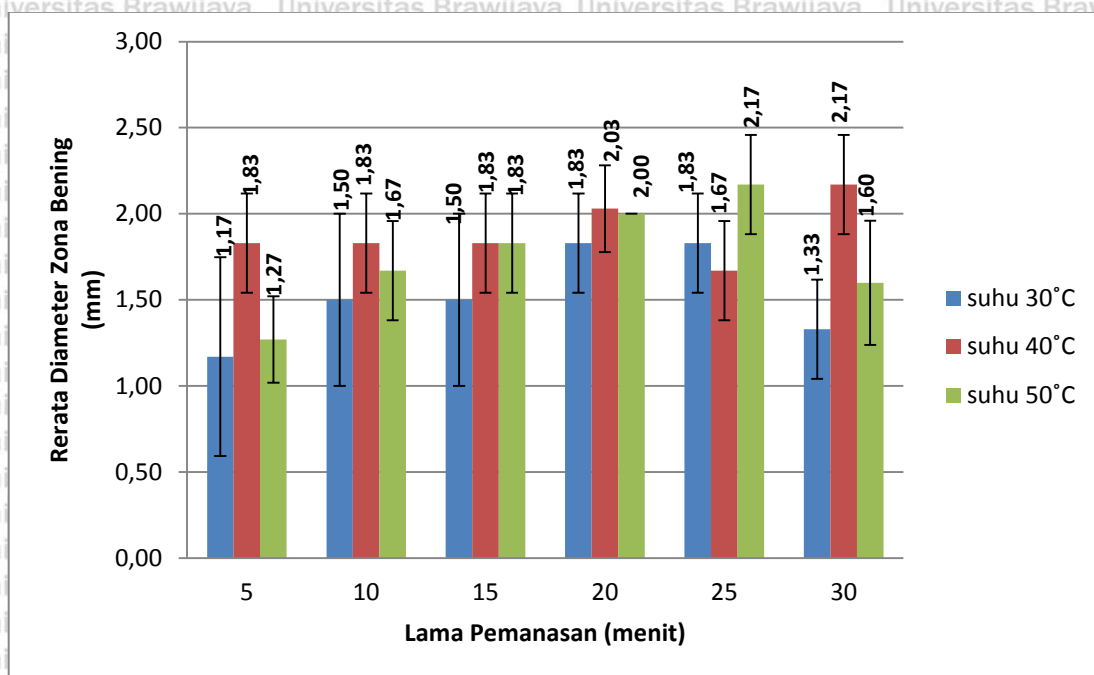
4.2 Uji Aktivitas Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar*

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram dilakukan untuk mengetahui daya hambat yang dihasilkan oleh ekstrak seluler *marennine* dengan perlakuan terhadap dua bakteri patogen yaitu *Bacillus cereus* (Gram positif) dan *Vibrio alginolyticus* (Gram negatif). Hasil pengujian berupa nilai diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang telah diberi larutan uji. Penelitian ini menggunakan suhu pemanasan 30°C, 40°C, dan 50°C dan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit sebagai faktor perlakuan. Kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm dan kontrol negatif aquades steril juga digunakan dalam penelitian.

Alasan dilakukan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan adalah untuk mengetahui stabilitas dan efektivitas pigmen *marennine* ekstraseluler dalam pengujian sifat antibakteri. Penggunaan *range* suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan tersebut didasarkan pada hasil penelitian sebelumnya terkait pengaruh pemanasan pada *marennine* menunjukkan hasil bahwa pada pemanasan suhu 60°C selama 30 menit tidak menunjukkan adanya modifikasi spektral selama pembacaan dengan spektrofotometer UV-Vis (Pouvreau *et al.*, 2006b). Latar belakang penggunaan konsentrasi terendah *marennine* 1 ppm pada uji antibakteri dikarenakan pada penelitian sebelumnya pengujian ini masih efektif dalam menghambat bakteri diketahui berdasarkan terbentuknya zona bening walaupun bersifat lemah (Gastineau *et al.*, 2012b). Kontrol positif berupa antibiotik kloramfenikol digunakan sebagai pembanding karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam spektrum luas baik gram negatif maupun positif. Kloramfenikol diketahui memiliki kemampuan menahan laju pemanjangan rantai protein dengan menghambat peptidil transferase di ribosom sehingga mengganggu sintesis protein (Das and Patra, 2017). Kontrol negatif berupa aquades steril tidak menghasilkan zona bening karena pelarut tidak mempunyai kemampuan membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri (Sari *et al.*, 2020).

4.2.1 Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Bacillus cereus*

Hasil analisa aktivitas antibakteri *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus* menunjukkan adanya proses penghambatan dibuktikan dengan zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram pada keseluruhan sampel yang telah diberi perlakuan. Grafik rerata hasil pengukuran diameter zona bening pada bakteri *Bacillus cereus* yang didapatkan selama penelitian disajikan dalam **Gambar 4.2**.



Gambar 4.2 Grafik Rerata Diameter Zona Bening pada Bakteri *Bacillus cereus*

Grafik pada **Gambar 4.2** menunjukkan perlakuan pemanasan dan lama waktu pemanasan *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus* menghasilkan rerata diameter zona bening berkisar $1,17 \pm 0,58$ hingga $2,17 \pm 0,29$ mm. Rerata diameter zona bening tertinggi terdapat pada perlakuan pemanasan suhu 40°C dengan lama waktu pemanasan 30 menit dan suhu 50°C lama waktu pemanasan 25 menit, sedangkan nilai rerata diameter zona bening terendah terdapat pada perlakuan pemanasan suhu 30°C dengan lama waktu pemanasan 5 menit. Data diatas menunjukkan stabilitas kemampuan aktivitas antibakteri *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus* yang telah diberi perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan, hal ini juga mengonfirmasi efektivitas penghambatan bakteri pada pemanasan suhu <60°C selama 30 menit (Pouvreau *et al.*, 2006b).

Diameter zona bening yang terbentuk pada keseluruhan sampel *marennine* yang telah dilakukan perlakuan dapat dikategorikan memiliki daya antibakteri lemah terhadap bakteri *Bacillus cereus* karena menghasilkan diameter zona bening <5 mm. Kontrol positif berupa kloramfenikol menunjukkan hasil pengamatan berupa rerata diameter zona bening sebesar 20,78 mm yang dapat dikategorikan memiliki daya antibakteri sangat kuat (>20

mm) (Sungkar *et al.*, 2018). Kontrol negatif tidak menghasilkan zona bening (0 mm). Hasil pengamatan menunjukkan sampel *marennine* dan kloramfenikol bersifat bakteriostatik karena bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak cukup kuat untuk membunuh bakteri dibuktikan dengan adanya pertumbuhan bakteri yang teramati pada zona bening jam ke-18 (Gastineau *et al.*, 2012a). Data pengamatan selanjutnya dilakukan analisa ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk melihat pengaruh perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan terhadap diameter zona bening yang terbentuk. Hasil analisa ragam (ANOVA) pada **Lampiran 3** menunjukkan bahwa perlakuan suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan berpengaruh nyata ($P\text{-value} < 0,05$) terhadap aktivitas antibakteri ekstraseluler *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus*. Sedangkan interaksi antar kedua faktor memberikan hasil tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas antibakteri tersebut.

Tabel 4.2 Pengaruh suhu pemanasan pada ekstraseluler *marennine* terhadap rerata diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus*

Suhu Pemanasan (°C)	Rerata Diameter Zona Bening (mm)
30	1,53 ± 0,44 ^b
40	1,89 ± 0,29 ^a
50	1,76 ± 0,38 ^{ab}

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan
 Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi
 Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan suhu pemanasan 40°C terhadap terbentuknya diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus* berbeda nyata terhadap perlakuan pada suhu 30°C namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan suhu 50°C. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa *marennine* efektif sebagai bahan antibakteri dan tetap stabil bahkan setelah dilakukan pemanasan hingga suhu 50°C. *Marennine* diketahui tetap stabil (tidak terjadi modifikasi spektral) setelah dilakukan pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit namun menunjukkan sedikit modifikasi spektral setelah dilakukan inkubasi semalaman pada suhu 55°C (Pouvreau *et al.*, 2006b). Senyawa yang dikenal tahan panas, cahaya, degradasi terhadap asam dan enzim ini belum diketahui strukturnya tetapi karakteristik awal pigmen menjelaskan bahwa *marennine* merupakan polifenol tak terhidrolisa atau molekul kompleks unit glikosidik yang berikatan dengan satu atau beberapa macam cincin aromatik (Falaise *et al.*, 2019). Polifenol dikenal berperan dalam aktivitas antibakteri. Senyawa ini bersifat tidak stabil dan rentan terhadap degradasi salah satunya karena perlakuan pemanasan. Perlakuan pemanasan diketahui mampu meningkatkan kandungan polifenol akibat oksidasi degradasi maupun hidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga efek antibakteri menjadi lebih efektif terhadap mikroorganisme yang diuji (Călinoiu and Vodnar, 2020). Namun aktivitas ini tidak hanya

dipengaruhi oleh jumlah fenolik tetapi juga berkaitan dengan kemampuan molekul mendonorkan elektron (Sun *et al.*, 2017). Perlakuan pemanasan dapat menjadi tidak efektif ketika pemanasan dilakukan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama. Hal ini dikarenakan suhu tinggi, waktu ekstraksi yang lama, lingkungan yang basa dapat menyebabkan degradasi polifenol (Mojzer *et al.*, 2016).

Tabel 4.3 Pengaruh lama waktu pemanasan pada ekstraseluler *marennine* terhadap rerata diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus*

Lama Waktu Pemanasan (menit)	Rerata Diameter Zona Bening (mm)
5	1,42 ± 0,47 ^b
10	1,67 ± 0,35 ^{ab}
15	1,72 ± 0,36 ^{ab}
20	1,96 ± 0,21 ^a
25	1,89 ± 0,33 ^{ab}
30	1,70 ± 0,46 ^{ab}

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan

Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

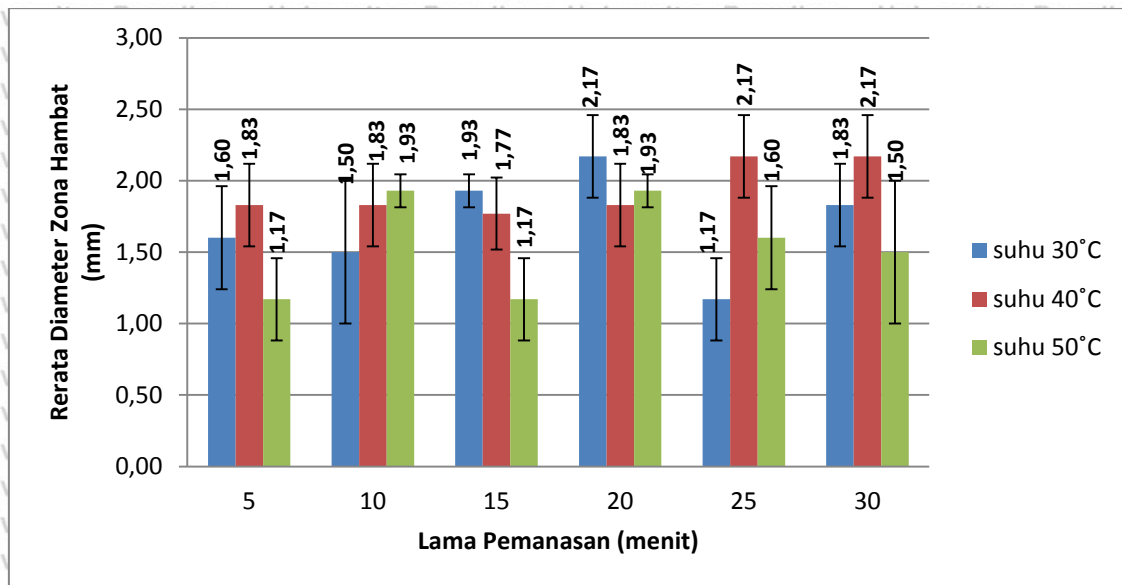
Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan lama waktu pemanasan 20 menit terhadap terbentuknya diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Bacillus cereus* berbeda nyata terhadap perlakuan pada lama waktu pemanasan 5 menit namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan waktu 10, 15, 25, 30 menit. Pemberian perlakuan lama waktu pemanasan secara tidak langsung dipengaruhi oleh suhu pemanasan yang digunakan. Seperti halnya *marennine* mampu tetap stabil tanpa adanya modifikasi spektral setelah dilakukan pemanasan selama 30 menit pada suhu 60°C sedangkan terjadi sedikit perubahan spektral pada suhu 55°C hasil inkubasi semalaman (Pouvreau *et al.*, 2006b). Perlakuan pemanasan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada pigmen (Sun *et al.*, 2017).

4.2.2 Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Hasil analisa aktivitas antibakteri *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus* menunjukkan adanya proses penghambatan dibuktikan dengan zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram pada keseluruhan sampel yang telah diberi perlakuan.

Grafik rerata hasil pengukuran diameter zona bening pada bakteri *Vibrio alginolyticus* yang didapatkan selama penelitian disajikan dalam **Gambar 4.3**.



Gambar 4.3 Grafik Rerata Diameter Zona Bening pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Grafik pada **Gambar 4.3** menunjukkan rerata diameter zona bening pada perlakuan suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* berkisar antara $1,17 \pm 0,29$ hingga $2,17 \pm 0,29$ mm. Rerata diameter zona bening tertinggi terdapat pada perlakuan suhu 30°C dengan lama waktu 20 menit dan suhu 40°C dengan lama waktu pemanasan 25 dan 30 menit. Sedangkan nilai rerata terendah terdapat pada perlakuan suhu 30°C dengan lama waktu pemanasan 25 menit dan suhu 50°C lama waktu pemanasan 5 dan 15 menit. Data menunjukkan stabilitas kemampuan aktivitas antibakteri *marennine* pada *Vibrio alginolyticus* yang telah diberi perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan di angka kurang dari 60°C selama 30 menit (Pouvreau *et al.*, 2006b).

Diameter zona bening yang terbentuk pada keseluruhan sampel *marennine* yang telah dilakukan perlakuan dapat dikategorikan memiliki daya antibakteri lemah terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* karena menghasilkan diameter zona bening <5 mm. Kontrol positif berupa kloramfenikol menunjukkan hasil pengamatan rerata diameter zona bening sebesar 15,28 mm yang dapat dikategorikan memiliki daya antibakteri kuat (10-20 mm) (Sungkar *et al.*, 2018). Kontrol negatif tidak menghasilkan zona bening (0 mm). Hasil pengamatan menunjukkan sampel *marennine* dan kloramfenikol bersifat bakteriostatik karena bekerja dengan menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak cukup kuat untuk membunuh bakteri dibuktikan dengan adanya pertumbuhan bakteri yang teramati pada zona bening jam ke-18 (Gastineau *et al.*, 2012a). Data pengamatan selanjutnya dilakukan analisa ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk melihat pengaruh perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan terhadap diameter zona bening yang terbentuk. Hasil analisa ragam (ANOVA) pada **Lampiran 4** menunjukkan bahwa perlakuan suhu pemanasan, lama waktu pemanasan dan interaksi antar kedua faktor

berpengaruh nyata (P -value < 0,05) terhadap aktivitas antibakteri ekstraseluler *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Tabel 4.4 Rerata diameter zona bening *marennine* dengan perlakuan suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Vibrio alginolyticus*

Suhu Pemanasan (°C)	Waktu Pemanasan (menit)	Rerata Diameter Zona Bening (mm)
30	5	1,60 ± 0,36 ^{ab}
30	10	1,50 ± 0,50 ^{ab}
30	15	1,93 ± 0,12 ^{ab}
30	20	2,17 ± 0,29 ^a
30	25	1,17 ± 0,29 ^b
30	30	1,83 ± 0,29 ^{ab}
40	5	1,83 ± 0,29 ^{ab}
40	10	1,83 ± 0,29 ^{ab}
40	15	1,77 ± 0,25 ^{ab}
40	20	1,83 ± 0,29 ^{ab}
40	25	2,17 ± 0,29 ^a
40	30	2,17 ± 0,29 ^a
50	5	1,17 ± 0,29 ^b
50	10	1,93 ± 0,12 ^{ab}
50	15	1,17 ± 0,29 ^b
50	20	1,93 ± 0,12 ^{ab}
50	25	1,60 ± 0,36 ^{ab}
50	30	1,50 ± 0,50 ^{ab}

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan
 Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi
 Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan suhu pemanasan 40°C terhadap terbentuknya diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* berbeda nyata terhadap perlakuan pada suhu 30°C namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan suhu 50°C. Penjelasan tersebut menunjukkan bahwa *marennine* efektif sebagai bahan antibakteri dan tetap stabil bahkan setelah dilakukan pemanasan hingga suhu 50°C. *Marennine* diketahui tetap stabil (tidak terjadi modifikasi spektral) setelah dilakukan pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit namun menunjukkan sedikit modifikasi spektral setelah dilakukan inkubasi semalaman pada suhu 55°C (Pouvreau *et al.*, 2006b). Senyawa yang dikenal tahan panas, cahaya, degradasi terhadap asam dan enzim ini belum diketahui strukturnya tetapi karakteristik awal pigmen menjelaskan bahwa *marennine* merupakan polifenol tak terhidrolisa atau molekul kompleks unit glikosidik yang berikatan dengan satu atau beberapa macam cincin aromatik (Falaise *et al.*, 2019). Polifenol dikenal berperan dalam aktivitas antibakteri. Senyawa ini bersifat tidak stabil dan rentan terhadap degradasi salah satunya karena perlakuan pemanasan. Perlakuan pemanasan diketahui mampu

meningkatkan kandungan polifenol akibat oksidasi degradasi maupun hidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga efek antibakteri menjadi lebih efektif terhadap mikroorganisme yang diuji (Călinoiu and Vodnar, 2020). Namun aktivitas ini tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah fenolik tetapi juga berkaitan dengan kemampuan molekul mendonorkan elektron (Sun *et al.*, 2017). Perlakuan pemanasan dapat menjadi tidak efektif ketika pemanasan dilakukan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama. Hal ini dikarenakan suhu tinggi, waktu ekstraksi yang lama, lingkungan yang basa dapat menyebabkan degradasi polifenol (Mojzer *et al.*, 2016).

Pemberian faktor perlakuan lama waktu pemanasan 20 menit terhadap terbentuknya diameter zona bening yang dihasilkan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* berbeda nyata terhadap perlakuan pada lama waktu pemanasan 5 menit namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan waktu 10, 15, 25, 30 menit. Hasil ini menggambarkan pemilihan lama waktu pemanasan tersebut tidak cukup berbeda untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda nyata terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pemberian perlakuan lama waktu pemanasan secara tidak langsung dipengaruhi oleh suhu pemanasan yang digunakan. Seperti halnya *marennine* mampu tetap stabil tanpa adanya modifikasi spektral setelah dilakukan pemanasan selama 30 menit pada suhu 60°C sedangkan terjadi sedikit perubahan spektral pada suhu 55°C hasil inkubasi semalaman (Pouvreau *et al.*, 2006b). Perlakuan pemanasan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada pigmen (Sun *et al.*, 2017).

4.2.3 Perbandingan Aktivitas Antibakteri *Marennine* pada Bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Hasil analisa aktivitas antibakteri *marennine* dengan perlakuan suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* menunjukkan adanya perbedaan rerata diameter zona bening yang terbentuk. Perbedaan nilai rerata diameter zona bening pada kedua bakteri uji disajikan dalam **Tabel 4.5**.

Tabel 4.5 Perbandingan aktivitas antibakteri *marennine* terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Suhu Pemanasan (°C)	Lama Waktu Pemanasan (menit)	Rerata Diameter Zona Bening (mm)	
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
30	5	1,17 ± 0,58	1,60 ± 0,36
30	10	1,50 ± 0,50	1,50 ± 0,50
30	15	1,50 ± 0,50	1,93 ± 0,12
30	20	1,83 ± 0,29	2,17 ± 0,29
30	25	1,83 ± 0,29	1,17 ± 0,29
30	30	1,33 ± 0,29	1,83 ± 0,29
40	5	1,83 ± 0,29	1,83 ± 0,29
40	10	1,83 ± 0,29	1,83 ± 0,29
40	15	1,83 ± 0,29	1,77 ± 0,25
40	20	2,03 ± 0,25	1,83 ± 0,29
40	25	1,67 ± 0,29	2,17 ± 0,29
40	30	2,17 ± 0,29	2,17 ± 0,29
50	5	1,27 ± 0,25	1,17 ± 0,29
50	10	1,67 ± 0,29	1,93 ± 0,12
50	15	1,83 ± 0,29	1,17 ± 0,29
50	20	2,00 ± 0,00	1,93 ± 0,12
50	25	2,17 ± 0,29	1,60 ± 0,36
50	30	1,60 ± 0,36	1,50 ± 0,50

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan
 Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Berdasarkan nilai perbandingan pada **Tabel 4.5** dapat diketahui bahwa *marennine* dengan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* tidak terlalu memiliki perbedaan yang cukup signifikan. Hal ini dibuktikan dari nilai rentangan rerata zona bening yang dihasilkan keduanya yang hampir sama. Zona bening yang dihasilkan bakteri *Bacillus cereus* memiliki rentang antara 1,17 ± 0,58 hingga 2,17 ± 0,29 mm, sedangkan pada bakteri *Vibrio alginolyticus* rentangan nilai berkisar 1,17 ± 0,29 hingga 2,17 ± 0,29 mm. Keduanya juga dapat dikategorikan memiliki daya antibakteri lemah karena menghasilkan diameter zona bening < 5 mm (Sungkar *et al.*, 2018). Nilai perbandingan kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm sebesar 20,78 ± 3,93 mm pada bakteri *Bacillus cereus* dan 15,86 ± 1,72 mm untuk bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Perbedaan aktivitas antibakteri pada *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* yang tidak cukup signifikan ini dapat dipengaruhi oleh perbedaan morfologi, kimia, fisiologi, termasuk juga ketahanan dan sensitivitas masing-masing bakteri pada senyawa antibakteri *marennine* (Gastineau *et al.*, 2012a). Penelitian yang dilaksanakan Permatasari (2019), menghasilkan rerata diameter zona bening sebagai aktivitas antibakteri supernatan *Haslea ostrearia* konsentrasi 2 ppm dengan waktu inkubasi 24 jam

pada bakteri *S. aureus* sebesar $7,14 \pm 0,25$ mm dan *V. harveyi* sebesar $6,60 \pm 0,06$ mm. Penelitian ini menjelaskan bahwa daya penghambatan senyawa antibakteri pada bakteri gram positif lebih sensitif jika dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Daya penghambatan pada bakteri gram negatif maupun positif berbeda dikarenakan susunan dinding sel keduanya yang berbeda. Bakteri gram positif memiliki dinding sel dengan struktur tunggal peptidoglikan yang mengandung asam teikoat serta memiliki sifat permeabilitas membran yang relatif sederhana dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang memiliki tiga lapis struktur dinding sel diantaranya membran luar, peptidoglikan, dan ruang periplasma sehingga memudahkan penetrasi senyawa antibakteri dalam perusakan sel (Falaise *et al.*, 2016) (Silhavy *et al.*, 2010).

Hasil yang diperoleh dari *marennine* yang diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan pada kedua bakteri memiliki hasil yang tidak jauh berbeda dan bahkan hampir seimbang dapat juga dikarenakan berbedanya spesies, strain, populasi bakteri, dan efektivitasnya pada bakteri perairan (Falaise *et al.*, 2019). Suhu dan lama waktu pemanasan diyakini tidak cukup berbeda sehingga memberikan pengaruh berbeda nyata yang signifikan pada kemampuan antibakteri. Penelitian menggunakan metode cakram juga dapat berkurang efektivitasnya karena pengaruh beberapa faktor diantaranya konsentrasi larutan antibakteri, jenis dan spesies bakteri yang digunakan, media yang digunakan, metode pengujian, dan kecepatan difusi senyawa antibakteri (Permatasari *et al.*, 2019). Perbandingan hasil dari kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm menggambarkan daya senyawa antibakteri pada bakteri gram positif lebih kuat dibandingkan bakteri gram negatif. Penggunaan kloramfenikol 1000 ppm tidak sebanding dengan aktivitas antibakteri *marennine* dengan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan konsentrasi 1 ppm karena berbedanya besar konsentrasi dan kemurnian senyawa antibakteri (Das and Patra, 2017). Opsi penggunaan konsentrasi 1000 ppm digunakan karena penanganan bakteri *Vibrio alginolyticus* yang tidak mudah dan rentan terjadinya resistensi, sedangkan hasil dari kontrol positif harus didapatkan sebagai pembanding bakteri gram positif dan gram negatif.

Marennine merupakan senyawa yang memiliki spektrum kerja antibakteri yang luas karena mengandung polifenol dan glikosida. Polifenol diketahui berperan dalam aktivitas antibakteri karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel, membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme intraseluler akibat ikatan hidrogen senyawa fenolik ke enzim (Chibane *et al.*, 2019). Selain peran polifenol *marennine* juga mengandung glikosida. Glikosida yang berinteraksi dengan sel bakteri akan membentuk kompleks reseptor glikosida melalui ikatan hidrogen yang akan terurai ketika telah melewati dinding sel. Struktur dinding sel bakteri banyak mengandung protein dan lemak, reaksi senyawa antibakteri dengan

dinding sel akan merusak ikatan hidrogen pada protein sehingga protein terkoagulasi dan dinding sel sekaligus sel bakteri tersebut mengalami lisis (Permatasari *et al.*, 2019). Penelitian antibakteri senyawa mirip *marennine* pada bakteri gram negatif *E. coli* menyatakan kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri terjadi akibat interaksi yang dilakukan dengan lipopolisakarida (LPS) pada membran luar (Tardy-Laporte *et al.*, 2013). Pengujian *marennine* dapat menjadi acuan pengaplikasian dalam bidang budidaya atau industri makanan (Falaise *et al.*, 2019).

4.3 Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan metode *microdilution* menggunakan *96-well microtitration plate* pembacaan pada *microplate reader*. MIC dilaksanakan untuk mengetahui konsentrasi terendah *marennine* sebagai senyawa antibakteri dalam melakukan penghambatan pertumbuhan bakteri. Metode *microdilution* dilakukan dengan meletakkan media dan senyawa antibakteri yang digunakan (*marennine*) pada sumur yang sama kemudian dilakukan pengenceran bertingkat hingga konsentrasi yang diinginkan. *Marennine* yang digunakan terlebih dahulu diberi perlakuan suhu pemanasan 30°C, 40°C, 50°C dan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit sebagai faktor perlakuan. Pengukuran daya hambat dilakukan setelah sumur berisi media dan *marennine* yang telah diencerkan diinokulasikan bakteri uji lalu diinkubasi selama 24 jam. Bakteri uji yang digunakan adalah *Bacillus cereus* (Gram positif) dan *Vibrio alginolyticus* (Gram negatif). Hasil pengujian MIC akan berupa data kuantitatif dan kualitatif. Data kuantitatif akan berupa nilai absorbansi dari pengukuran *microplate reader* sebagai acuan turbiditas, sedangkan data kualitatif berupa gambar dan deskripsi terkait kekeruhan serta ada tidaknya sedimen sebagai bahan acuan penilaian ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri. Semakin besar nilai absorbansi artinya tingkat kekeruhan semakin tinggi maka semakin banyak jumlah sel yang terdeteksi. Hasil absorbansi sampel nantinya akan dibandingkan dengan nilai absorbansi kontrol (Krcce *et al.*, 2020). Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini berupa campuran kloramfenikol 1000 ppm dengan bakteri, sedangkan kontrol negatif menggunakan campuran media dan *marennine* tanpa perlakuan.

Pemilihan penggunaan metode *microdilution* dalam penentuan nilai MIC dikarenakan metode pengenceran tepat untuk memperkirakan konsentrasi senyawa antibakteri uji. Selain itu pengujian dengan metode ini memberi hasil tingkat sensitivitas 30 kali dibanding menggunakan metode difusi dan menghasilkan analisis pengukuran kuantitatif (Aristyawan *et al.*, 2017). Metode *microdilution* dengan pembacaan pada *microplate reader* juga didasarkan pada jumlah sampel yang tersedia sedikit dengan kebutuhan pengujian yang banyak. Terdapat keuntungan dalam penggunaan metode ini diantaranya

praktis karena proses pembacaan dilakukan bersamaan dalam satu waktu, mudah sehingga mengurangi resiko kesalahan akibat pekerja, proses pembacaan dan laporan menggunakan perangkat terkomputerisasi, dan tidak membutuhkan biaya besar untuk media dan reagen (Reller *et al.*, 2009). Panjang gelombang 625 nm yang dipilih untuk pengukuran nilai absorbansi digunakan karena media pertumbuhan berwarna kuning serta terdeteksinya tingkat pertumbuhan sel pada panjang gelombang ini (Rizqi, 2016). Faktor perlakuan berupa suhu dan lama waktu pemanasan digunakan untuk mengetahui stabilitas dan efektivitas pigmen ekstraseluler *marennine* selama pengujian MIC. *Range* suhu dan lama waktu pemanasan yang digunakan berdasarkan penelitian oleh Pouvreau (2006b) yang menunjukkan hasil bahwa *marennine* yang telah diberi pemanasan suhu 60°C selama 30 menit tidak terdapat modifikasi spektral ketika dilakukan pembacaan spektrofotometer UV-Vis. Alasan penggunaan konsentrasi pengujian terbesar 1 ppm adalah karena pada penelitian sebelumnya konsentrasi tersebut masih efektif dalam menghambat bakteri (Gastineau *et al.*, 2012b). Kontrol positif berupa campuran suspensi bakteri dan kloramfenikol digunakan karena antibiotik ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam spektrum yang luas baik bakteri gram positif maupun negatif. Kloramfenikol diketahui memiliki kemampuan menahan laju pemanjangan rantai protein dengan menghambat peptidil transferase di ribosom sehingga mengganggu sintesis protein (Das and Patra, 2017). Semakin nilai pengukuran absorbansi sampel mendekati hasil absorbansi kontrol positif maka konsentrasi tersebut dapat dinyatakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Mogana *et al.*, 2020). Kontrol negatif yang berupa campuran media dengan *marennine* (tanpa perlakuan) digunakan sebagai pembanding hasil pengukuran MIC tanpa aktivitas penghambatan bakteri.

4.3.1 Uji MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*

Hasil pengukuran absorbansi untuk pengujian MIC *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus* disajikan dalam tabel pada **Lampiran 5**. Tabel tersebut menunjukkan hasil rerata nilai absorbansi dengan rentang $1,027 \pm 0,066$ hingga $1,741 \pm 0,228$. Rentang terkecil terdapat pada perlakuan suhu pemanasan 50°C dengan lama waktu pemanasan 30 menit dan konsentrasi 0,125 ppm, sedangkan rentang nilai terbesar berada pada perlakuan suhu pemanasan 30°C dengan lama waktu pemanasan 20 menit dan konsentrasi 0,5 ppm. Hasil rerata nilai absorbansi kontrol negatif yang diperoleh sebesar $0,735 \pm 0,365$ dan kontrol positif sebesar $0,068 \pm 0,019$. Data penelitian tersebut kemudian dilakukan analisa ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk melihat pengaruh perlakuan suhu pemanasan, lama waktu pemanasan, konsentrasi *marennine*, interaksi antara suhu dan lama waktu pemanasan, interaksi suhu dengan konsentrasi, interaksi lama waktu pemanasan dengan konsentrasi, serta interaksi antar ketiga faktor

perlakuan terhadap nilai absorbansi yang dihasilkan. Hasil analisa ragam (ANOVA) pada Lampiran 5 menunjukkan bahwa faktor perlakuan suhu pemanasan, lama waktu pemanasan, konsentrasi *marennine*, interaksi antara suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan berpengaruh nyata ($p\text{-value} < 0,05$) terhadap nilai absorbansi *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus*.

Tabel 4.6 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan konsentrasi *marennine* pada bakteri *Bacillus cereus*

Konsentrasi <i>Marennine</i> (ppm)	Rerata Absorbansi
0,125	1,323 ± 0,279 ^a
0,25	1,346 ± 0,263 ^a
0,5	1,360 ± 0,209 ^a
1	1,192 ± 0,144 ^b

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan

Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Nilai absorbansi digunakan sebagai indikator adanya pertumbuhan bakteri dengan menunjukkan tingkat kekeruhan. Tingkat kekeruhan tinggi maka nilai absorbansinya juga akan semakin besar (Krcce *et al.*, 2020). Pemberian faktor perlakuan konsentrasi *marennine* 1 ppm sebagai penghambatan bakteri *Bacillus cereus* pada pengujian MIC berbeda nyata dengan konsentrasi 0,5; 0,25; 0,125 ppm. Hasil ini mengonfirmasi teori semakin tinggi konsentrasi *marennine* maka daya penghambatan pertumbuhannya semakin tinggi (Gastineau *et al.*, 2012c). Percobaan penggunaan konsentrasi kurang dari 1 ppm telah dilakukan pada *Vibrio splendidus* dan hasilnya proses penghambatan hanya terjadi hingga konsentrasi 1 ppm. Sedangkan dalam percobaan berbeda menggunakan *marennine* konsentrasi 0,1 ppm yang ditambahkan pada kolam pemeliharaan larva kerang biru *Mytilus edulis* yang terpapar *Vibrio splendidus* sebagai penyebab utama kematian larva memberikan hasil berupa kelangsungan hidup larva 30% lebih tinggi dari kontrol (Turcotte, 2014). Namun, percobaan pada kolam pemeliharaan bisa saja lebih disebabkan oleh flora mikroba lain yang bersifat antibakteri dari diatom tersebut daripada hasil metabolitnya (Gastineau *et al.*, 2012c).

Tabel 4.7 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi suhu dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Bacillus cereus*

Suhu Pemanasan (°C)	Lama Waktu Pemanasan (menit)	Rerata Absorbansi
50	30	1,162 ± 0,153 ^{cde}
50	25	1,124 ± 0,098 ^{de}
50	20	1,109 ± 0,098 ^e
50	15	1,220 ± 0,149 ^{bcde}
50	10	1,266 ± 0,148 ^{abcde}
50	5	1,191 ± 0,099 ^{bcde}
40	30	1,201 ± 0,216 ^{bcde}
40	25	1,383 ± 0,180 ^{abcde}
40	20	1,350 ± 0,181 ^{abcde}
40	15	1,239 ± 0,337 ^{bcde}
40	10	1,443 ± 0,272 ^{ab}
40	5	1,386 ± 0,258 ^{abcd}
30	30	1,234 ± 0,255 ^{bcde}
30	25	1,536 ± 0,186 ^a
30	20	1,539 ± 0,260 ^a
30	15	1,252 ± 0,190 ^{bcde}
30	10	1,410 ± 0,202 ^{abc}
30	5	1,449 ± 0,245 ^{ab}

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan

Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan *marennine* suhu pemanasan 50°C untuk mengetahui nilai absorbansi pada pengujian MIC bakteri *Bacillus cereus* berbeda nyata terhadap perlakuan pada suhu 30°C dan 40°C. Pembahasan tersebut menunjukkan bahwa *marennine* yang telah diberikan perlakuan panas masih mampu dan stabil dalam menghambat adanya pertumbuhan bakteri. *Marennine* diketahui tetap stabil (tidak terjadi modifikasi spektral) setelah dilakukan pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit namun menunjukkan sedikit modifikasi spektral setelah dilakukan inkubasi semalaman pada suhu 55°C (Pouvreau *et al.*, 2006b). Senyawa yang dikenal tahan panas, cahaya, degradasi terhadap asam dan enzim ini belum diketahui strukturnya tetapi karakteristik awal pigmen menjelaskan bahwa *marennine* merupakan polifenol tak terhidrolisa atau molekul kompleks unit glikosidik yang berikatan dengan satu atau beberapa macam cincin aromatik (Falaise *et.*, 2019). Polifenol dikenal berperan dalam aktivitas antibakteri. Senyawa ini bersifat tidak stabil dan rentan terhadap degradasi salah satunya karena perlakuan pemanasan. Perlakuan pemanasan diketahui mampu meningkatkan kandungan polifenol akibat oksidasi degradasi maupun hidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga efek antibakteri menjadi lebih efektif terhadap mikroorganisme yang diuji (Călinoiu and Vodnar, 2020). Namun aktivitas ini tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah fenolik tetapi juga berkaitan dengan kemampuan molekul mendonorkan elektron

(Sun *et al.*, 2017). Perlakuan pemanasan dapat menjadi tidak efektif ketika pemanasan dilakukan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama. Hal ini dikarenakan suhu tinggi, waktu ekstraksi yang lama, lingkungan yang basa dapat menyebabkan degradasi polifenol (Mojzer *et al.*, 2016).

Pemberian faktor perlakuan lama waktu pemanasan 30 menit untuk mengetahui nilai absorbansi pada pengujian MIC bakteri *Bacillus cereus* berbeda nyata terhadap perlakuan waktu 10 menit namun tidak berbeda nyata dengan pada perlakuan waktu 5, 15, 20, 25 menit. Hasil ini menggambarkan pemilihan lama waktu pemanasan tersebut tidak cukup berbeda untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda nyata terhadap bakteri *Bacillus cereus*. Pemberian perlakuan lama waktu pemanasan secara tidak langsung dipengaruhi oleh suhu pemanasan yang digunakan. Seperti halnya *marennine* mampu tetap stabil tanpa adanya modifikasi spektral setelah dilakukan pemanasan selama 30 menit pada suhu 60°C sedangkan terjadi sedikit perubahan spektral pada suhu 55°C hasil inkubasi semalaman (Pouvreau *et al.*, 2006b). Perlakuan pemanasan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada pigmen (Sun *et al.*, 2017).

4.3.2 Uji MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Hasil pengukuran absorbansi untuk pengujian MIC *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus* disajikan dalam tabel pada **Lampiran 6**. Tabel tersebut menunjukkan hasil rerata nilai absorbansi dengan rentang $0,765 \pm 0,154$ hingga $1,706 \pm 0,199$. Rentang terkecil terdapat pada perlakuan suhu pemanasan 30°C dengan lama waktu pemanasan 10 menit dan konsentrasi 1 ppm, sedangkan rentang nilai terbesar terdapat pada perlakuan suhu pemanasan 40°C dengan lama waktu pemanasan 30 menit dan konsentrasi 0,5 ppm. Rerata nilai absorbansi kontrol positif sebesar $0,066 \pm 0,022$ dan kontrol negatif sebesar $0,532 \pm 0,339$. Data penelitian tersebut kemudian dilakukan analisa ragam (ANOVA) dengan selang kepercayaan 95% ($\alpha=0,05$) untuk melihat pengaruh perlakuan suhu pemanasan, lama waktu pemanasan, konsentrasi *marennine*, interaksi antara suhu dan lama waktu pemanasan, interaksi suhu dengan konsentrasi, interaksi lama waktu pemanasan dengan konsentrasi, serta interaksi antar ketiga faktor perlakuan terhadap nilai absorbansi yang dihasilkan. Hasil analisa ragam (ANOVA) yang terdapat pada **Lampiran 6** menunjukkan bahwa faktor perlakuan suhu pemanasan, konsentrasi *marennine*, interaksi antara suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan, interaksi lama waktu pemanasan dan konsentrasi berpengaruh nyata ($p\text{-value} < 0,05$) terhadap nilai absorbansi *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Tabel 4.8 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi suhu dan lama waktu pemanasan pada bakteri *Vibrio alginolyticus*

Suhu Pemanasan (°C)	Lama Waktu Pemanasan (menit)	Rerata Absorbansi
50	30	1,011 ± 0,320 ^{cd}
50	25	1,231 ± 0,214 ^{abcd}
50	20	1,201 ± 0,135 ^{abcd}
50	15	1,204 ± 0,172 ^{abcd}
50	10	1,388 ± 0,203 ^{ab}
50	5	1,278 ± 0,255 ^{abcd}
40	30	1,338 ± 0,317 ^{abc}
40	25	1,357 ± 0,220 ^{ab}
40	20	1,186 ± 0,228 ^{abcd}
40	15	1,272 ± 0,169 ^{abcd}
40	10	1,430 ± 0,265 ^a
40	5	1,294 ± 0,306 ^{abcd}
30	30	1,242 ± 0,230 ^{abcd}
30	25	1,161 ± 0,292 ^{abcd}
30	20	1,400 ± 0,364 ^{ab}
30	15	1,178 ± 0,348 ^{abcd}
30	10	0,979 ± 0,262 ^d
30	5	1,084 ± 0,177 ^{bcd}

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan

Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan *marennine* suhu pemanasan 30°C untuk mengetahui nilai absorbansi pada pengujian MIC bakteri *Vibrio alginolyticus* tidak berbeda nyata dengan suhu 50°C namun dengan suhu 40°C berbeda nyata. Pembahasan tersebut menunjukkan bahwa *marennine* yang telah diberikan perlakuan panas masih mampu dan stabil dalam menghambat adanya pertumbuhan bakteri. *Marennine* diketahui tetap stabil (tidak terjadi modifikasi spektral) setelah dilakukan pemanasan pada suhu 60°C selama 30 menit namun menunjukkan sedikit modifikasi spektral setelah dilakukan inkubasi semalaman pada suhu 55°C (Pouvreau *et al.*, 2006b). Senyawa yang dikenal tahan panas, cahaya, degradasi terhadap asam dan enzim ini belum diketahui strukturnya tetapi karakteristik awal pigmen menjelaskan bahwa *marennine* merupakan polifenol tak terhidrolisa atau molekul kompleks unit glikosidik yang berikatan dengan satu atau beberapa macam cincin aromatik (Falaise *et.*, 2019). Polifenol dikenal berperan dalam aktivitas antibakteri. Senyawa ini bersifat tidak stabil dan rentan terhadap degradasi salah satunya karena perlakuan pemanasan. Perlakuan pemanasan diketahui mampu meningkatkan kandungan polifenol akibat oksidasi degradasi maupun hidrolisis menjadi senyawa yang lebih sederhana sehingga efek antibakteri menjadi lebih efektif terhadap mikroorganisme yang diuji (Călinoiu and Vodnar, 2020). Namun aktivitas ini tidak hanya dipengaruhi oleh jumlah fenolik tetapi juga berkaitan dengan kemampuan molekul

mendonorkan elektron (Sun *et al.*, 2017). Perlakuan pemanasan dapat menjadi tidak efektif ketika pemanasan dilakukan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama. Hal ini dikarenakan suhu tinggi, waktu ekstraksi yang lama, lingkungan yang basa dapat menyebabkan degradasi polifenol (Mojzer *et al.*, 2016).

Tabel 4.9 Rerata nilai absorbansi pengujian MIC faktor perlakuan interaksi lama waktu pemanasan dan Konsentrasi *marennine* pada bakteri *Vibrio alginolyticus*

Lama Waktu Pemanasan (menit)	Konsentrasi <i>Marennine</i> (ppm)	Rerata Absorbansi
30	0,125	1,235 ± 0,230 ^{abcd}
30	0,25	1,176 ± 0,238 ^{abcd}
30	0,5	1,426 ± 0,280 ^{ab}
30	1	1,062 ± 0,112 ^{bcd}
25	0,125	1,262 ± 0,250 ^{abcd}
25	0,25	1,322 ± 0,261 ^{abcd}
25	0,5	1,239 ± 0,334 ^{abcd}
25	1	1,174 ± 0,147 ^{abcd}
20	0,125	1,195 ± 0,248 ^{abcd}
20	0,25	1,293 ± 0,277 ^{abcd}
20	0,5	1,442 ± 0,322 ^a
20	1	1,119 ± 0,118 ^{abcd}
15	0,125	1,040 ± 0,294 ^{cd}
15	0,25	1,257 ± 0,197 ^{abcd}
15	0,5	1,360 ± 0,224 ^{abcd}
15	1	1,215 ± 0,133 ^{abcd}
10	0,125	1,413 ± 0,216 ^{abc}
10	0,25	1,337 ± 0,345 ^{abcd}
10	0,5	1,286 ± 0,341 ^{abcd}
10	1	1,025 ± 0,238 ^d
5	0,125	1,294 ± 0,251 ^{abcd}
5	0,25	1,353 ± 0,275 ^{abcd}
5	0,5	1,239 ± 0,242 ^{abcd}
5	1	0,989 ± 0,137 ^d

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan

Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Nilai dengan notasi merupakan hasil uji lanjut Tukey HSD

Pemberian faktor perlakuan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30 menit untuk mengetahui nilai absorbansi pada pengujian MIC bakteri *Vibrio alginolyticus* tidak berbeda nyata. Hal ini menggambarkan pemilihan rentang lama waktu pemanasan tersebut tidak cukup berbeda untuk menghasilkan aktivitas antibakteri yang berbeda nyata terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. Pemberian perlakuan lama waktu pemanasan secara tidak langsung dipengaruhi oleh suhu pemanasan yang digunakan. Seperti halnya *marennine* mampu tetap stabil tanpa adanya modifikasi spektral setelah dilakukan pemanasan selama 30 menit pada suhu 60°C sedangkan terjadi sedikit perubahan

spektral pada suhu 55°C hasil inkubasi semalaman (Pouvreau *et al.*, 2006b). Perlakuan pemanasan pada suhu tinggi dengan jangka waktu yang lama dapat menyebabkan terjadinya degradasi pada pigmen (Sun *et al.*, 2017). Pemberian faktor perlakuan konsentrasi *marennine* 1 ppm untuk mengetahui nilai absorbansi pada pengujian MIC bakteri *Vibrio alginolyticus* berbeda nyata dengan konsentrasi 0,5; 0,25; 0,125 ppm. Hasil ini mengonfirmasi teori semakin tinggi konsentrasi *marennine* maka daya penghambatan pertumbuhannya semakin tinggi (Gastineau *et al.*, 2012c).

4.3.3 Perbandingan Pengujian MIC pada Bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Hasil analisa uji MIC dengan perlakuan suhu pemanasan, lama waktu pemanasan, dan konsentrasi *marennine* terhadap bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* menunjukkan adanya perbedaan nilai absorbansi. Perbedaan rerata nilai absorbansi kedua bakteri ditinjau dari faktor konsentrasi disajikan dalam **Tabel 4.10**.

Tabel 4.10 Perbandingan rerata nilai absorbansi pengujian MIC *marennine* dengan perlakuan besar konsentrasi pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Konsentrasi (ppm)	Rerata Nilai Absorbansi		Warna
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	
Kontrol (+)	0,068 ± 0,019	0,066 ± 0,022	Bening
Kontrol (-)	0,735 ± 0,365	0,532 ± 0,339	Keruh
1	1,192 ± 0,144	1,097 ± 0,167	Keruh
0,5	1,360 ± 0,209	1,332 ± 0,292	Keruh
0,25	1,346 ± 0,263	1,290 ± 0,263	Keruh
0,125	1,323 ± 0,279	1,240 ± 0,263	Keruh

Keterangan: Nilai parameter analisis merupakan hasil rerata dari 3 ulangan
 Nilai di belakang tanda ± merupakan standar deviasi

Berdasarkan nilai perbandingan pada **Tabel 4.10** dapat diketahui bahwa hasil absorbansi dari *marennine* dengan perlakuan suhu pemanasan dan lama waktu pemanasan untuk pengujian MIC menurut konsentrasi tidak terlalu memiliki perbedaan yang signifikan, termasuk dengan hasil rentang bakteri *Bacillus cereus* lebih besar dari bakteri *Vibrio alginolyticus*. Nilai konsentrasi terendah atau MIC dari *marennine* untuk menghambat pertumbuhan kedua bakteri berada pada konsentrasi tertinggi pengujian yaitu 1 ppm diikuti dengan hasil keseluruhan sampel berwarna keruh. Sumur dengan nilai absorbansi yang besar dan berwarna keruh artinya masih terdapatnya pertumbuhan bakteri (Krcce *et al.*, 2020). Hasil ini juga tidak jauh dari pernyataan aktivitas antibakteri dari *marennine* pada konsentrasi terbesar 1 ppm bersifat lemah. Nilai absorbansi sampel *marennine* pada setiap konsentrasi juga jauh berbeda dengan hasil absorbansi baik kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm dan suspensi bakteri ataupun kontrol

negatif berupa media dan *marennine* tanpa bakteri. Penggunaan kloramfenikol 1000 ppm tidak sebanding untuk pengujian MIC *marennine* konsentrasi 1 ppm dikarenakan berbedanya besar konsentrasi dan kemurnian senyawa antibakteri (Das and Patra, 2017). Penelitian lain yang dilakukan Permatasari (2019) menghasilkan nilai MIC *marennine* yang diujikan pada bakteri *S. aureus* dan *V. harveyi* sebesar 0,03 ppm dan 0,06 ppm. Penelitian ini menggambarkan bahwa hasil absorbansi antara bakteri gram positif seharusnya lebih kecil dari bakteri gram negatif karena tingkat sensitivitas bakteri gram positif lebih tinggi dari bakteri gram negatif terhadap senyawa antibakteri. Bakteri gram positif memiliki dinding sel dengan struktur tunggal peptidoglikan yang mengandung asam teikoat serta memiliki sifat permeabilitas membran yang relatif sederhana dibandingkan dengan bakteri gram negatif yang memiliki tiga lapis struktur dinding sel diantaranya membran luar, peptidoglikan, dan ruang periplasma sehingga memudahkan penetrasi senyawa antibakteri dalam perusakan sel (Falaise *et al.*, 2016) (Silhavy *et al.*, 2010). Ketidaksesuaian hasil pengujian dengan teori bisa diakibatkan beberapa faktor diantaranya jumlah bakteri, terjadi kontaminasi, waktu inkubasi yang terlalu lama, kandungan nutrient, dan ukuran bakteri (Mogana *et al.*, 2020).

4.4 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Nilai MBC ditentukan berdasarkan hasil pengujian MIC yang kemudian ditumbuhkan pada media pertumbuhan agar dan dilakukan inkubasi 24-48 jam. MBC atau *Minimum Bactericidal Concentration* merupakan pengujian dalam mengetahui konsentrasi senyawa antibakteri yang dapat membunuh (bakterisidal) 99,9% bakteri setelah dilakukan inkubasi. Nilai 99,9% artinya bakteri yang tumbuh pada media agar harus <10 koloni (Mogana *et al.*, 2020). Hasil analisa MBC yang didapatkan dari hasil pengujian MIC nilai absorbansi terkecil pada *plate* suhu bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus* disajikan dalam **Tabel 4.11**.

Tabel 4.11 Hasil pengamatan uji MBC pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Agar Pertumbuhan	Pertumbuhan Bakteri	
	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
Suhu 30°C	+	+
Suhu 40°C	+	+
Suhu 50°C	+	+

Keterangan: Tanda (+) artinya terdapat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil **Tabel 4.11** dapat disimpulkan bahwa tidak ada bakteri yang dapat dibunuh oleh *marennine* yang telah diberikan perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan pada berbagai konsentrasi termasuk pada konsentrasi maksimal. Sehingga *marennine* merupakan senyawa antibakteri yang hanya bersifat bakteriostatik tidak bakterisidal

artinya senyawa ini hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri namun tidak mampu secara total membunuh bakteri tersebut (Gastineau *et al.*, 2012a). Perbandingan hasil MBC dari pigmen lain yang dihasilkan dari bakteri maupun makroalga disajikan dalam Tabel 4.12.

Tabel 4.12 Perbandingan Nilai MIC dan MBC dari Berbagai Pigmen Mikroorganisme

Jenis Pigmen	Sumber Mikroorganisme	Bakteri	MIC (ppm)	MBC (ppm)	Referensi
Carotenoid	<i>Macrococcus roseus</i> (bakteri)	<i>Bacillus cereus</i>	8.000	16.000	Rostami <i>et al</i> (2016)
		<i>Escherichia coli</i>	32.000	64.000	Rostami <i>et al</i> (2016)
	<i>Rhodotorula glutinis</i> (bakteri)	<i>Bacillus cereus</i>	4.000	16.000	Rostami <i>et al</i> (2016)
		<i>Escherichia coli</i>	16.000	32.000	Rostami <i>et al</i> (2016)
C-phycoyanin	<i>Spirulina platensis</i> (makroalga)	<i>Staphylococcus aureus</i>	100	200	Safari <i>et al</i> (2020)
		<i>Escherichia coli</i>	200	400	Safari <i>et al</i> (2020)
		<i>Aeromonas hydrophila</i>	250	500	Bhuvanewari <i>et al</i> (2013)
Phycocyanin	<i>Arthospira platensis</i> (makroalga)	<i>Polaribacter irgensii</i>	50	-	Gastineau <i>et al</i> (2012c)
		<i>Pseudoalteromonas elyakowii</i>	0,01	-	Gastineau <i>et al</i> (2012c)
		<i>Vibrio aestuarianus</i>	1	-	Gastineau <i>et al</i> (2012c)
		<i>Vibrio splendidus</i>	1	-	Gastineau <i>et al</i> (2014b)
Blue Pigment	<i>Haslea karadagensis</i> (diatom)	<i>Vibrio tasmaniensis</i>	10	-	Falaise <i>et al</i> (2016)
		<i>Vibrio fortis</i>	50	-	Falaise <i>et al</i> (2019)
		<i>Vibrio harveyi</i>	5	-	Falaise <i>et al</i> (2019)

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Perlakuan terbaik untuk mendapatkan hasil maksimal aktivitas antibakteri *marennine* berada pada faktor perlakuan suhu pemanasan 40°C dan lama waktu pemanasan 20-30 menit dengan rentangan rerata diameter zona bening sebesar $2,00 \pm 0,00 - 2,17 \pm 0,29$ mm untuk bakteri *Bacillus cereus* dan $1,93 \pm 0,12 - 2,17 \pm 0,29$ mm untuk bakteri *Vibrio alginolyticus*.
2. Pengujian MIC pada kedua bakteri uji berada pada konsentrasi tertinggi pengujian 1 ppm dengan rerata nilai absorbansi sebesar $1,192 \pm 0,144$ untuk bakteri *Bacillus cereus* dan $1,097 \pm 0,167$ untuk bakteri *Vibrio alginolyticus* diikuti dengan hasil keseluruhan sampel berwarna keruh yang berarti masih terdapat adanya pertumbuhan bakteri.
3. Adanya pertumbuhan bakteri dari hasil MIC (konsentrasi terbesar 1 ppm) pada media agar pengujian MBC menyimpulkan bahwa *marennine* memiliki aktivitas antibakteri bersifat bakteristatik bukan bakterisidal.

5.2 Saran

1. Kandungan *marennine* yang hingga saat ini telah terkonfirmasi adalah polifenol sehingga akan lebih baik jika dilakukan pengujian total fenol sebelum dilakukan uji aktivitas antibakteri.
2. Perlu sebelum pengujian utama terlebih dahulu dilakukan uji pendahuluan.
3. Perlu dilakukan pengukuran absorbansi pada suspensi bakteri untuk memastikan turbiditasnya sudah sesuai dengan standar McFarland.
4. Penggunaan kloramfenikol pada kontrol positif akan lebih baik jika menggunakan konsentrasi lebih rendah dari 1000 ppm atau bisa juga dibuat sama dengan konsentrasi senyawa antibakteri yang digunakan.
5. Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut dengan nilai konsentrasi *marennine* yang lebih besar.
6. Pengukuran OD tidak mencerminkan adanya aktivitas pertumbuhan bakteri karena secara keseluruhan jumlah sel baik hidup atau mati akan tetap terdeteksi, sehingga dibutuhkan metode lain untuk pengukuran salah satunya dapat menggunakan metode TPC

DAFTAR PUSTAKA

- Agfadila, T., W, Putu A. S., dan Puspawati, N. N.. 2017. Kemampuan Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* ATCC 8739. *Jurnal ITEPA* 6(2): hal 21-29
- Aristyawan, A. D., Sugijanto, N. E., dan Suciati. 2017. Potensi Antibakteri dari Ekstrak Etanol Spons *Agelas cavernosa*. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia* 4(1): hal.39-43
- Arrohmah, A., Supriyanto, A., and Kusumandari, K.. 2007. Study of Chlorophyll Characteristic on Leaves As Photodetector Organic Material. *Biofarmasi Journal of Natural Product Biochemistry* 5(2): p.67-72
- Ayen, R. Y., Rahmawati, dan Mukarlina. 2017. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Sembung Rambat (*Mia micrantha* H.B.K) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* IHB B 379 dan *Shigella flexneri*. *Jurnal Protobiont* 6(3): hal.123-129
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibensouda, S. K.. 2016. Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): p.71-79
- Bhuvaneshwari, G. R., Shukla, S. P., Makesh, M., Thirumalaiselvan, S., Sudhagar, S. A., Kothari, D. C., and Singh, A.. 2013. Antibacterial Activity of Spirulina (*Arthospira platensis* Geitler) against Bacterial Pathogens in Aquaculture. *Israeli Journal of Aquaculture* 65: p.1-8
- Bottone, E. J.. 2010. *Bacillus cereus*, A Volatile Human Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2): p.382-398
- Călinoiu, L. F., and Vodnar, D. C.. 2020. Thermal Processing for the Release of Phenolic Compounds from Wheat and Oat Bran. *Biomolecules* 10(21):p.1-14
- Cao, J., Zhang, J., Ma, L., Li, L., Zhang, W., and Li, J.. 2018. Identification of Fish Source *Vibrio alginolyticus* and Evaluation of Its Bacterial Ghosts Vaccine Immune Effects. *MicrobiologyOpen* 7(3): p.e00576
- Chibane-Bouarab, L., Forquet, V., Lanteri, P., Clement, Y., Leonard-Akari, L., Oulahal, N., Degraeve, P., and Bordes, C.. 2019. Antibacterial Properties of Polyphenol: Characterization and QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) Models. *Frontiers In Microbiology* 10: p.829
- Das, B. and Patra, S.. 2017. Antimicrobials: Meeting the Challenges of Antibiotic Resistance Through Nanotechnology. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy Elsevier*. p.1-22

- Davidovich, O., Davidovich, N., and Mouget, J.-L.. 2018. The Effect of Temperature on Vegetative Growth and Sexual Reproduction of Two Diatoms from the Genus *Haslea Simonsen*. *Russian Journal of Marine Biology* 44: p.8-13
- Falaise, C., François, C., Travers, M.-A., Morga, B., Haure, J., Tremblay, R., Turcotte, F., Pasetto, P., Gastineau, R., Hardivillier, Y., Leignel, V., and Mouget, J.-L.. 2016. Antimicrobial Compounds from Eukaryotic Mikroalgae against Human Pathogens and Diseases in Aquaculture. *Marine drug* (14(9): p.159
- Falaise, C., James, A., Travers, M.-A., Zanella, M., Badawi, M., and Mouget, J.-L.. 2019. Complex Relationships Between The Blue Pigment Marennine and Marine Bacteria of the Genus *Vibrio*. *Marine Drug* 17: p.160
- Fu, K., Li, J., Wang, Y., Liu, J., Yan, H., Shi, L., and Zhou, L.. 2016. An Innovative Method For Rapid Identification and Detection of *Vibrio alginolyticus* in Different Infection Models. *Frontiers In Microbiology* 7: p.651
- Gastineau, R., Davidovich, N. A., Bardeau, J.-F., Davidovich, O. I., Rince, Y., Gaudin, P., Cox, E. J., and Mouget, J.-L.. 2012b. *Haslea karadagensis* (Bacillariophyta): A Second Blue Diatom, Recorded From The Black Sea and Producing A Novel Blue Pigment. *European Journal of Phycology* 47(4): p.469-479
- Gastineau, R., Davidovich, N., Hansen, G., Rines, J., Wulff, A., Kaczmariska, I., Ehrman, J., Hermann, D., Maumus, F., and Hardivillier, Y.. 2014a. *Haslea ostrearia*-like diatoms: Biodiversity Out of The Blue. *Advances in Botanical Research*. Elsevier
- Gastineau, R., Hardiviller, Y., Leignel, V., Tekaya, N., Morançais, M., Fleurence, J., Davidovich, N., Jacquette, B., Gaudin, P., Hellio, C., Bourgoungnon, N., and Mouget, J.-L.. 2012c. Greening Effect on Oyster and Biological Activities of the Pigments Produced by the Diatom *Haslea karadagensis* (Naviculaceae). *Aquaculture* 368: p. 61-67
- Gastineau, R., Pouvreau, J.-B., Hellio, C., Morançais, M., Fleurence, J., Gaudin, P., Bourgoungnon, N., and Mouget, J.-L.. 2012a. Biological Activities of Purified Marennine, the Blue Pigment Responsible for the Greening of Oysters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60(14): p.3599-3605
- Gastineau, R., Turcotte, F., Pouvreau, J.-B., Morançais, M., Fleurence, J., Windarto, E., Prasetya, F. S., Arsad, S., Jaouen, P., and Babin, M.. 2014b. Marennine, Promising Blue Pigments From A Widespread *Haslea* Diatom Species Complex. *Marine Drugs* 12: p.3161-3189
- Ina-Salwany, M. Y., Al-saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F.-A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., and Zamri-Saad, M.. 2019. Vibriosis in

- Fish: A Review on Disease Development and Prevention. *Journal of Aquatic Animal Health* 31(1): p.3-22
- Istini. 2020. Pemanfaatan Plastik Polipropilen Standing *Pouch* Sebagai Salah Satu Kemasan Sterilisasi Peralatan Laboratorium. *Indonesian Journal of Laboratory* 2(3): hal 41-46
- Kang, C.H., Shin, Y., Jang, S., Jung, Y., and So, J.S.. 2016. Antimicrobial Susceptibility of *Vibrio alginolyticus* Isolated from Oyster in Korea. *Environmental Science and Pollution Research* 23(20): p.21106-21112
- Krce, L., Sprung, M., Maravic, A., Umek, P., Salamon, K., Krstulovic, N., and Aviani, I.. 2020. Bacteria Exposed to Silver Nanoparticles Synthesized by Laser Ablation in Water: Modelling *E. coli* Growth and Inactivation. *Materials* 13(3): p.653
- Laferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., and Saksida, S. M.. 2015. Infectious Diseases Affect Marine Fisheries and Aquaculture Economics. *Annual Review of Marine Science* 7(4): p.71-96
- Mogana, R., Adhikari, A., Tzar, M. N., Ramliza, R., and Wiart, C.. 2020. Antibacterial Activities of the Extracts, Fractions and Isolated Compounds from *Canarium patentinervium* Miq. Against Bacterial Clinical Isolates. *BMC Complementandary Medicine and Therapies* 20(1): p.1-11
- Mohammad, A. M., Chowdhury, T., Biswas, B., and Absar, N.. 2018. Food Poisoning and Intoxication: A Global Leading Concern for Human Health. *Food Safety and Preservation* (pp. 307-352). Academic Press
- Mojzer, E. B., Hrnčič, M. K., Škerget, M., Knez, Ž., and Bren, U.. 2016. Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules* 21(7): p.901
- Mouget, J.-L., Rosa, P., Vachoux, C., and Tremblin, G.. 2005. Enhancement of Marine Production By Blue Light in the Diatom *Haslea ostrearia*. *Jornal of Applied Phycology* 17: p.437-445
- Mustapha, S., Mustapha, E. M., and Nozha, C.. 2013. *Vibrio alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Food Borne Diseases. *International Journal of Science and Technology* 2(4): p.302-309
- Owuama, C. I.. 2017. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bacterical Concentration (MBC) using a Novel Dilution Tube Method. *African Journal of Microbiology Research* 11(23): p.977-980
- Permatasari, I., Agung, M. U. K., Liviawaty, E., Risjani, Y., Arsad, S., Mouget, J.-L., and Prasetya, F. S.. 2019. Antibacterial Activity of *Haslea ostrearia* Supernatant

- Adapted In Indonesia Against Pathogenic Bacteria Relevant to Mariculture (*In-vitro Study*). *Omni-Akuatika* 15(1): p.30-38
- Pexara, A. and Govaris, A.. 2010. *Bacillus cereus*: An Important Foodborne Pathogen. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society* 61(2): p.127-133
- Pouvreau, J.-B., Morancais, M., Fleury, F., Rosa, P., Thion, L., Cahingt, B., Zal, F., Florence, J., and Pondaven, P.. 2006b. Preliminary Characterisation of The Blue-green Pigment "Marennine" from The Marine Tychopelagic Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology* 18: p.757-767
- Pouvreau, J.-B., Morancais, M., Masse, G., Rosa, P., Robert, J.-M., Florence, J., and Pondaven, P.. 2006a. Purification of The Blue-Green Pigment "Marennine" from The Marine Tychopelagic Diatom *Haslea ostrearia* (Gaillon/Bory) Simonsen. *Journal of Applied Phycology* 18: p.769-781
- Prasetya, F. S., Comeau, L. A., Gastineau, R., Decottignies, P., Cognie, B., Morancais, M., Turcotte, F., Mouget, J.-L., and Tremblay, R.. 2017. Effect of Marennine Produced by The Blue Diatom *Haslea ostrearia* on Behavioral, Physiological and Biochemical Traits of Juvenile *Mytilus edulis* and *Crassostrea virginica*. *Aquaculture* 467: p.138-148
- Pratiwi, R. H. 2017. Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik. *Jurnal Pro-Life* 4: hal 418-429
- Purnamaningsih, N., Kalor, H., dan Atun, S.. 2017. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 11229 dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Penelitian Saintek* 22: hal 140-147
- Rameshkumar, P., Nazar, A. K. A., Pradeep, M. A., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A. K., Sirajudeen, S., Venkatesan, V., and Nazeera, B. M.. 2017. Isolation and Characterization of Pathogenic *Vibrio alginolyticus* from Sea Cage Cultured Cobia (*Rachycetron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in Applied Microbiology* 65(5): p.423-430
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H., and Ferraro, M. J.. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practice. *Clinical Infectious Diseases* 49(11): p.1749-1755
- Rizqi, H. D.. 2016. Pengaruh Penambahan Bakteri Terhadap Biodegradasi DDT oleh *Daedalea dickinsii*. Tesis. Institut Teknologi Sepuluh November Surabaya
- Rostami, H., Hamed, H., and Yolmeh, M.. 2016. Some Biological Activities of Pigments Extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 29(4): p.684-695

- Safari, R., Raftani, A. Z., and Esmailzadeh, K. R.. 2020. Antioxidant and Antibacterial Activities of *C-phycoerythrin* from Common Name *Spirulina platensis*. *Journal of Fisheries Sciences* 19(4): p.1911-1927
- Said, N. I. dan Marsidi, R.. 2011. Mekanisme Pertahanan dan Parasit di dalam Air Limbah Domestik serta Alternatif Teknologi Pengolahan. *Jurnal Air Indonesia*: hal 1
- Sari, D. P., Aspriyanto, D., and Taufiqurrahman, I.. 2020. Antibacterial Effectivity of Kasturi Leaf Extract (*Mangifera casturi*) Against The Growth of *Streptococcus sanguinis* Bacteria. *Dentino Jurnal Kedokteran Gigi* 5(1): p.33-38
- Sarwendah, S., Yusliana, Y., Laia, H. C. G., Daely, P. J., dan Chiuman, L.. 2020. Uji Daya Hambat Antibakteri Air Perasan Daging Buah Nanas (*Ananas comosus* (L) Merr Var. Queen) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Biologi Tropis* 20(1): hal.87-93
- Sharma, A. 2012. An Ultraviolet-Sterilization Protocol for Microtitre Plates. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 16: p.144-147
- Sibero, T. M., Herdikiawan, D., Radjasa, O. K., sabdono, A., Trianto, A., and Triningsih, D. W.. 2018. Antibacterial Activity of Sponge Associated Fungi Against Vibriosis Agent in Shrimp and Its Toxicity to *Litopenaeus vannamei*. *AACL Bioflux* 11(1): p. 10-18
- Silhavy, T. J., Kahne, D., and Walker, S.. 2010. The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspective in Biology* 2(5): p.414
- Sun, H. N., Mu, T. H., and Xi, L. S.. 2017. Effect of pH, Heat, and Light Treatments on the Antioxidant Activity of Sweet Potato Leaf Polyphenols. *International Journal of Food Properties* 20(2): p.318-332
- Sungkar, O. F., Khanza, S., dan Pangestu, R. A.. 2018. Aktivitas Antibakteri Bedak yang Diperkaya dengan Konsentrasi Ekstrak Buah (*Rhizopora mucronata*) *Jurnal Teknologi Pangan* 2(2): hal 135-140
- Tardy-Laporte, C., Arnold, A. A., Genard, B., Gastineau, R., Morançais, M., Mouget, J.-L., Tremblay, R., and Marcotte, I.. 2013. A ²H Solid-state NMR Study of The Effect of Antimicrobial Agent on Intact *Escherichia coli* Without Mutating. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Biomembranes* 1828(2): p.614-622
- Tewari, A. and Abdullah, S.. 2015. *Bacillus cereus* Food Poisoning: International and Indian Perspective. *Journal of Food Science and Technology* 52(5): p.2500-2511
- Turcotte, F., Mouget, J.-L., Genard, B., Lemarchand, K., Deschenes, J.-S., and Tremblay, R.. 2016. Prophylactic Effect of *Haslea ostrearia* Culture Supernatant Containing The Pigment Marennine to Stabilize Bivalve Hatchery Production. *Aquatic Living Resources* 29(4): p. 401

Turcotte, F.. 2014. Effet protecteur d'un pigment (marennime) de diatomée bleue contre la bactérie pathogène *Vibrio splendidus* chez les larves de moule bleue *Mytilus edulis*: utilisation potentielle en écloséries de bivalves. *Doctoral Disertation, Université du Québec à Rimouski*

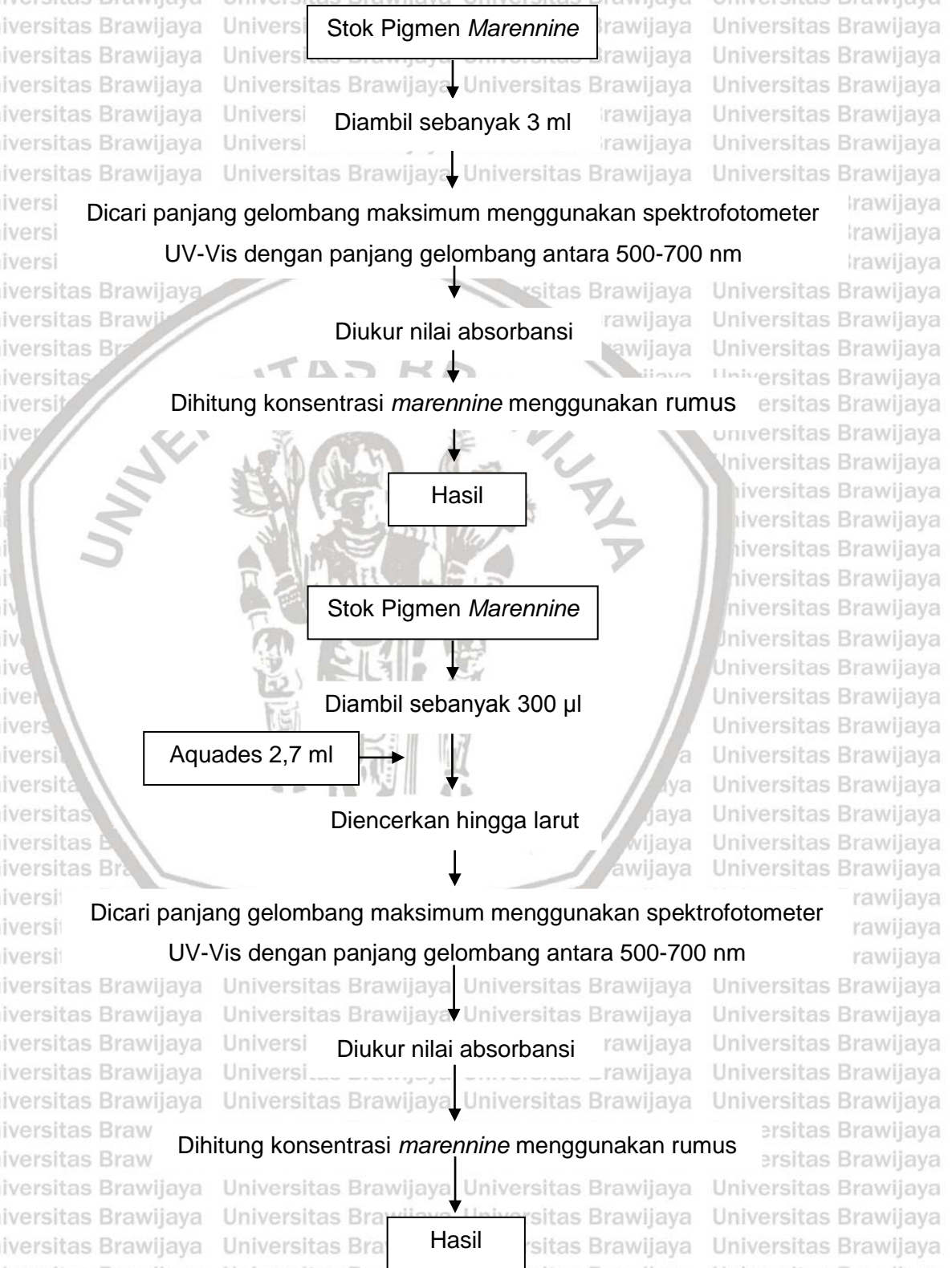
Usman, M. 2015. Experimental Design Issues In Conduction Quantitative Research. *Pearl Research Jornal* 1(3): p. 56-59



LAMPIRAN

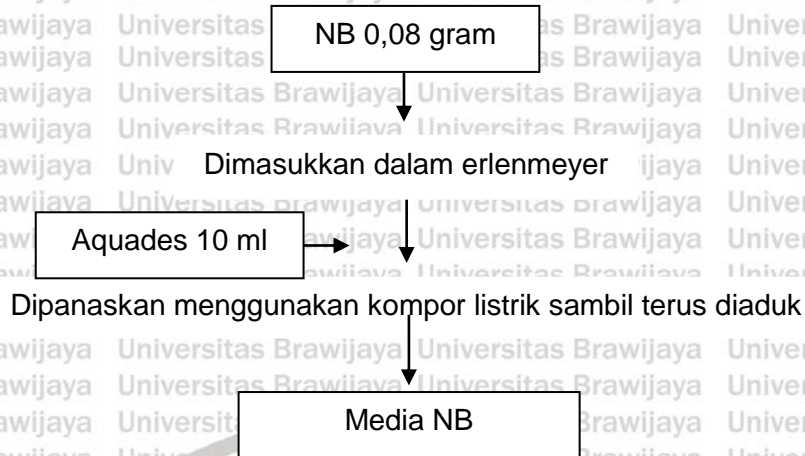
Lampiran 1. Diagram Alir Prosedur Analisa

1. Penentuan Konsentrasi Sampel *marennine* (Permatasari, 2019).

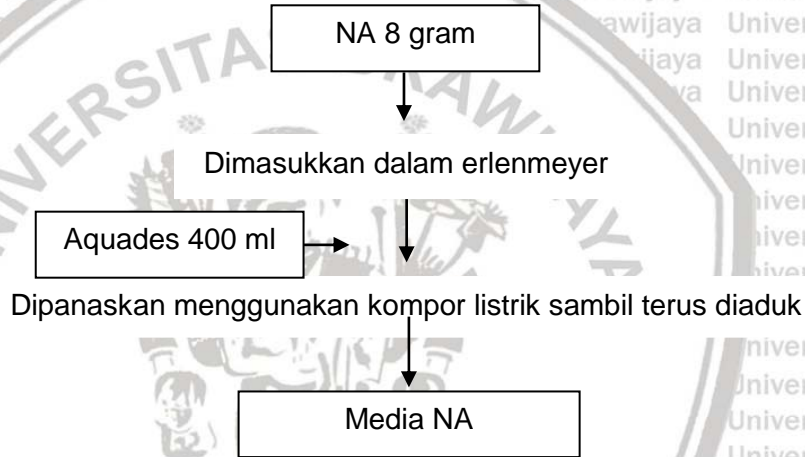


2. Pembuatan Media (Ayen et al., 2017).

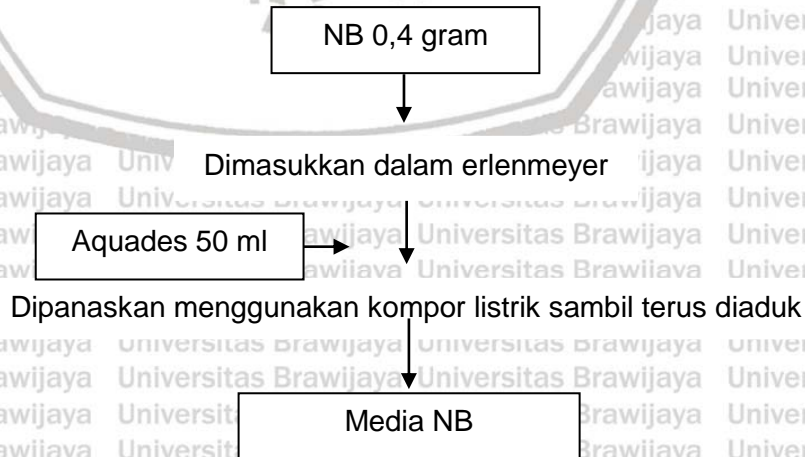
- Peremajaan Bakteri



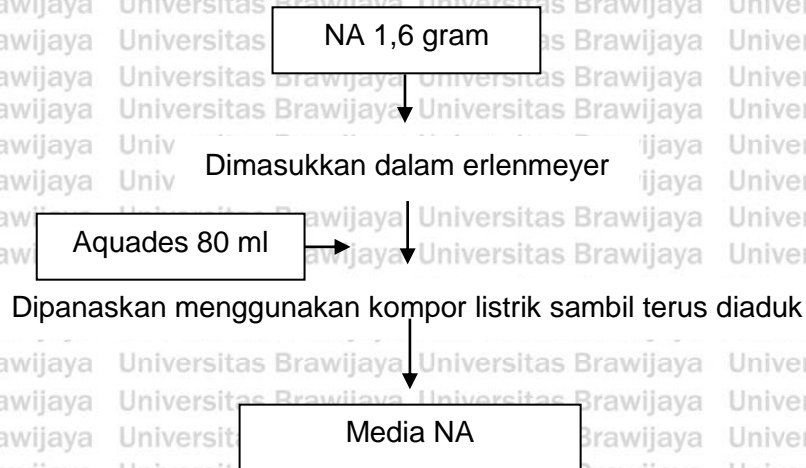
- Uji Antibakteri *Disk Diffusion Agar*



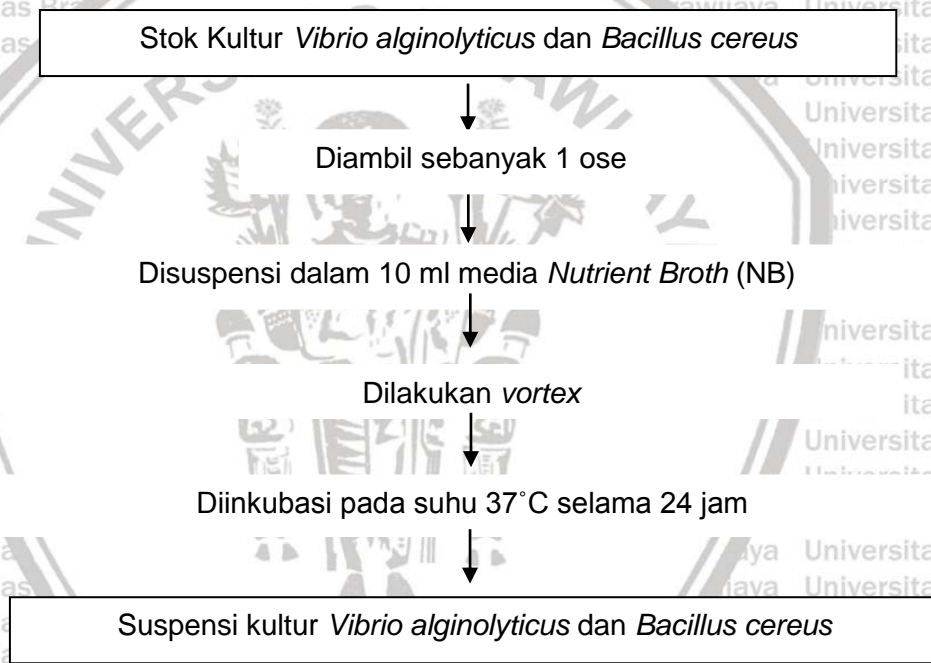
- Uji MIC



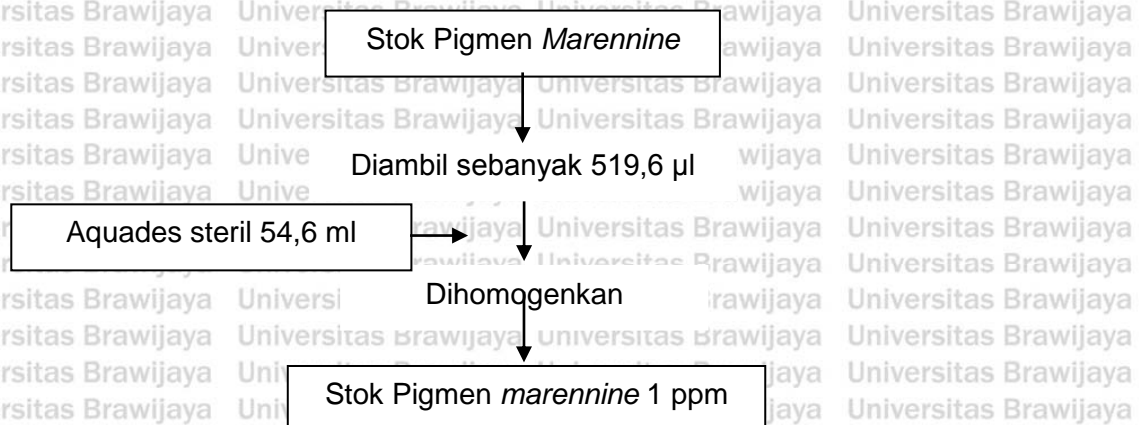
• Uji MBC



3. Persiapan Suspensi Bakteri (Ayen et al., 2017).



4. Pembuatan Larutan Sampel (Sarwendah et al., 2020).



5. Pembuatan Sampel *Marennine*

- Uji Antibakteri

Stok Pigmen *Marennine* 1 ppm

Diletakkan pada 6 mikrotube yang masing-masing diisi dengan 30 μ l *marennine*

Dipanaskan menggunakan *waterbath* sesuai suhu dan lama waktu pemanasan (suhu 30°C, 40°C, 50°C dan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30)

Sampel *Marennine*

- Uji MIC

Stok Pigmen *Marennine* 1 ppm

Diletakkan pada 6 mikrotube yang masing-masing diisi dengan 150 μ l *marennine*

Dipanaskan menggunakan *waterbath* sesuai suhu dan lama waktu pemanasan (suhu 30°C, 40°C, 50°C dan lama waktu pemanasan 5, 10, 15, 20, 25, 30)

Sampel *Marennine*

6. Uji Aktivitas Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar* (Permatasari et al., 2019).

Suspensi kultur bakteri *Vibrio alginolyticus* dan *Bacillus cereus*

Diambil sebanyak 50 µl menggunakan mikropipet

Diinokulasikan pada media NA padat

Dispread menggunakan *spreader* pada permukaan padat media NA

Kertas Cakram ukuran 6 mm

Direndam dengan sampel *marennine* yang telah diberi perlakuan, kontrol positif, dan kontrol negatif

Diletakkan kertas cakram di atas media berisi bakteri menggunakan pinset

Diinkubasi cawan petri pada suhu 37°C selama 18-24 jam

Diukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram menggunakan penggaris

Hasil

7. Uji MIC (Mogana et al., 2020).

96-well plate

Disiapkan peta peletakan sampel

Diisi baris A nomor 1-12 dengan kontrol negatif berupa stok sampel *marennine* (1 ppm) tanpa perlakuan 50 µl + media NB 50 µl

Diisi baris B nomor 1-12 dengan kontrol positif berupa kloramfenikol (1000 ppm) 50µl + suspensi kultur bakteri 50 µl

Diisi baris C-H nomor 1-12 dengan media NB sebanyak 50 µl

Diisi baris C-H nomor 1, 5, 9 dengan sampel *marennine* yang telah diberi perlakuan suhu dan lama waktu pemanasan sesuai ketentuan sebanyak 50 µl

Dilakukan pengenceran bertingkat pada baris C-H nomor 1-4, 5-8, 9-12 dengan sisa pengenceran pada lubang nomor 4, 8, 12 dibuang

Diisi baris C-H nomor 1-12 dengan suspensi kultur bakter 50 µl

Diinkubasi 96-well plate selama 18-24 jam pada suhu 37 °C

Diamati kekeruhan yang nampak pada plate

Hasil

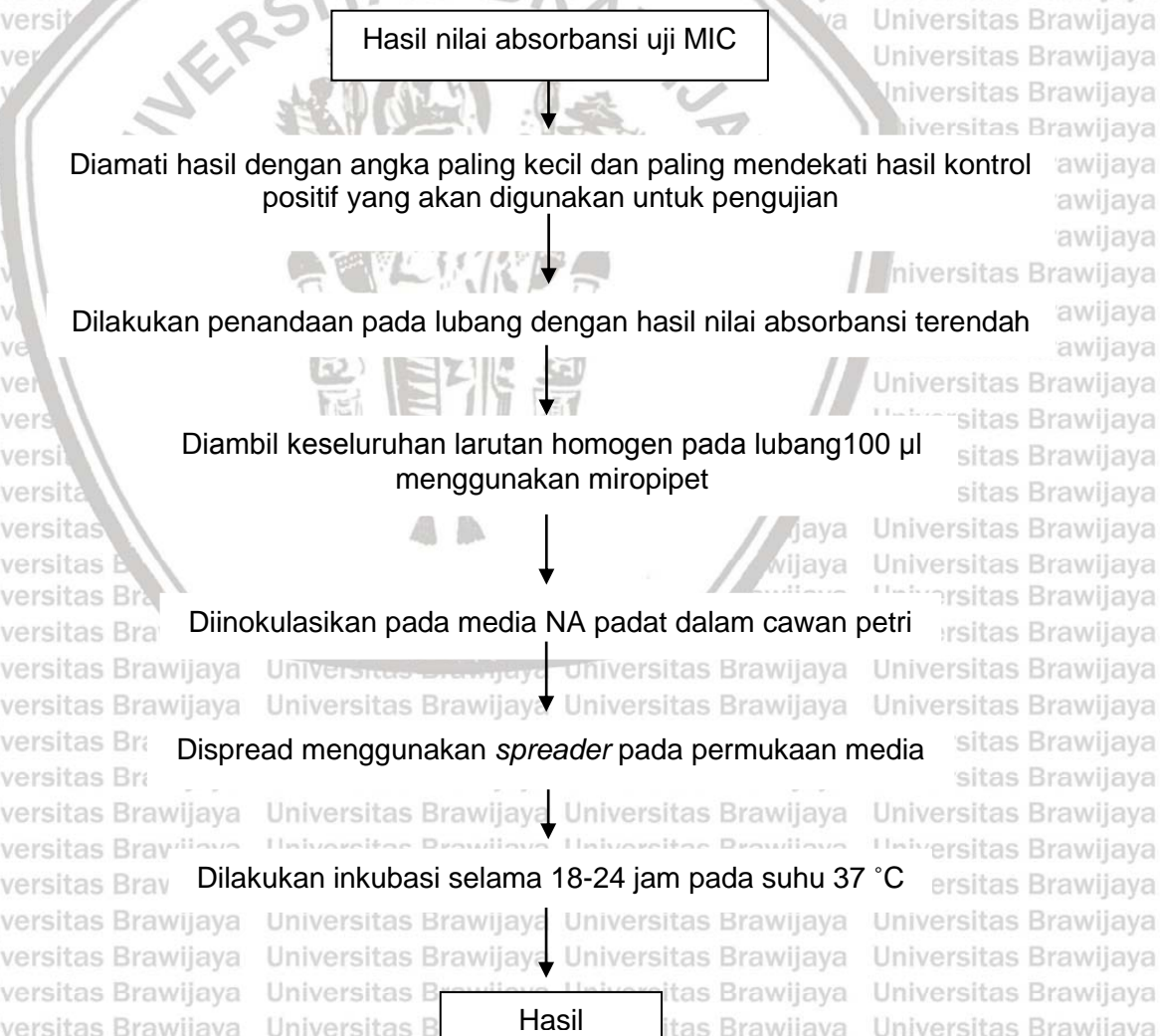
Dilakukan pembacaan *microplate reader* untuk mengetahui nilai absorbansi pada panjang gelombang 625 nm

Hasil

• **Peta peletakan uji MIC pada 96-well plate**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
B	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
C	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
D	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
E	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
F	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
G	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24
H	X13	X14	X15	X16	X17	X18	X19	X20	X21	X22	X23	X24

8. Uji MBC (Mogana et al., 2020).



Lampiran 2. Perhitungan Konsentrasi Stok Pigmen *Marennine*

1. Konsentrasi Stok Pigmen *Marennine* Ekstraseluler

λ_{max} = 695,5 nm
Absorbansi = 1,289 AU

$$C = \frac{A \lambda_{max}}{\epsilon \lambda_{max}} \times 1$$

$$C = \frac{1,289}{12,3} \times 1$$

$$C = 0,1062 \text{ g/l} = 106,2 \text{ ppm}$$

2. Konsentrasi Stok Pigmen *Marennine* Ekstraseluler Pengenceran 10X

λ_{max} = 661 nm
Absorbansi = 0,128 AU

$$C = \frac{A \lambda_{max}}{\epsilon \lambda_{max}} \times 1$$

$$C = \frac{0,128}{12,3} \times 1$$

$$C = 0,01055 \frac{\text{g}}{\text{l}} = 10,55 \text{ ppm}$$



Lampiran 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Bacillus cereus*

Data Keseluruhan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Bacillus cereus*

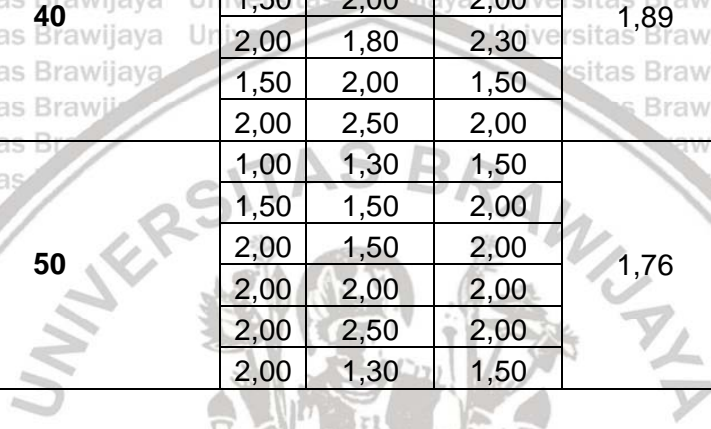
Perlakuan	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV	Kontrol Positif (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3			1	2	3		
S1W1	1,50	1,50	0,50	1,17	0,58	22,00	22,00	16,00	20,00	3,46
S1W2	1,00	2,00	1,50	1,50	0,50	16,00	22,00	23,00	20,33	3,79
S1W3	2,00	1,50	1,00	1,50	0,50	23,00	22,00	21,00	22,00	1,00
S1W4	2,00	2,00	1,50	1,83	0,29	22,00	21,00	18,00	20,33	2,08
S1W5	2,00	1,50	2,00	1,83	0,29	23,00	26,00	26,00	25,00	1,73
S1W6	1,50	1,50	1,00	1,33	0,29	15,00	17,00	20,00	17,33	2,52
S2W1	1,50	2,00	2,00	1,83	0,29	23,00	29,00	25,00	25,67	3,06
S2W2	2,00	1,50	2,00	1,83	0,29	22,00	20,00	17,00	19,67	2,52
S2W3	1,50	2,00	2,00	1,83	0,29	28,00	20,00	15,00	21,00	6,56
S2W4	2,00	1,80	2,30	2,03	0,25	18,00	20,00	22,00	20,00	2,00
S2W5	1,50	2,00	1,50	1,67	0,29	22,00	20,00	23,00	21,67	1,53
S2W6	2,00	2,50	2,00	2,17	0,29	18,00	19,00	16,00	17,67	1,53
S3W1	1,00	1,30	1,50	1,27	0,25	19,00	23,00	19,00	20,33	2,31
S3W2	1,50	1,50	2,00	1,67	0,29	17,00	12,00	21,00	16,67	4,51
S3W3	2,00	1,50	2,00	1,83	0,29	29,00	28,00	25,00	27,33	2,08
S3W4	2,00	2,00	2,00	2,00	0,00	12,00	22,00	26,00	20,00	7,21
S3W5	2,00	2,50	2,00	2,17	0,29	22,00	22,00	22,00	22,00	0,00
S3W6	2,00	1,30	1,50	1,60	0,36	17,00	16,00	18,00	17,00	1,00

Keterangan:

- Kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm
- S1 = suhu pemanasan 30 °C
- S2 = suhu pemanasan 40 °C
- S3 = suhu pemanasan 50 °C
- W1 = lama waktu pemanasan 5 menit
- W2 = lama waktu pemanasan 10 menit
- W3 = lama waktu pemanasan 15 menit
- W4 = lama waktu pemanasan 20 menit
- W5 = lama waktu pemanasan 25 menit
- W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

Pengaruh Suhu Pemanasan Terhadap Aktivitas Antibakteri *Marennine* pada *Bacillus cereus*

Suhu Pemanasan (°C)	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3		
30	1,50	1,50	0,50	1,53	0,44
	1,00	2,00	1,50		
	2,00	1,50	1,00		
	2,00	2,00	1,50		
	2,00	1,50	2,00		
	1,50	1,50	1,00		
40	1,50	2,00	2,00	1,89	0,29
	2,00	1,50	2,00		
	1,50	2,00	2,00		
	2,00	1,80	2,30		
	1,50	2,00	1,50		
	2,00	2,50	2,00		
50	1,00	1,30	1,50	1,76	0,38
	1,50	1,50	2,00		
	2,00	1,50	2,00		
	2,00	2,00	2,00		
	2,00	2,50	2,00		
	2,00	1,30	1,50		



Pengaruh Lama Waktu Pemanasan Terhadap Aktivitas Antibakteri *Marennine* pada *Bacillus cereus*

Lama Waktu Pemanasan (menit)	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3		
5	1,50	1,50	0,50	1,42	0,47
	1,50	2,00	2,00		
	1,00	1,30	1,50		
10	1,00	2,00	1,50	1,67	0,35
	2,00	1,50	2,00		
	1,50	1,50	2,00		
15	2,00	1,50	1,00	1,72	0,36
	1,50	2,00	2,00		
	2,00	1,50	2,00		
20	2,00	2,00	1,50	1,96	0,21
	2,00	1,80	2,30		
	2,00	2,00	2,00		
25	2,00	1,50	2,00	1,89	0,33
	1,50	2,00	1,50		
	2,00	2,50	2,00		
30	1,50	1,50	1,00	1,70	0,46
	2,00	2,50	2,00		
	2,00	1,30	1,50		

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Suhu Pemanasan (°C)	2	1,234	0,6169	5,53	0,008
Lama Waktu Pemanasan (menit)	5	1,581	0,3163	2,84	0,029
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	10	1,475	0,1475	1,32	0,256
Error	36	4,013	0,1115		
Total	53	8,304			

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)	N	Mean	Grouping
40	18	1,89444	A
50	18	1,75556	A B
30	18	1,52778	B

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Lama Waktu Pemanasan (menit)
 Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Lama Waktu Pemanasan (menit)	N	Mean	Grouping
20	9	1,95556	A
25	9	1,88889	A B
15	9	1,72222	A B
30	9	1,70000	A B
10	9	1,66667	A B
5	9	1,42222	B

Means that do not share a letter are significantly different



Lampiran 4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Data Keseluruhan Hasil Uji Aktivitas Antibakteri *Marennine* Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

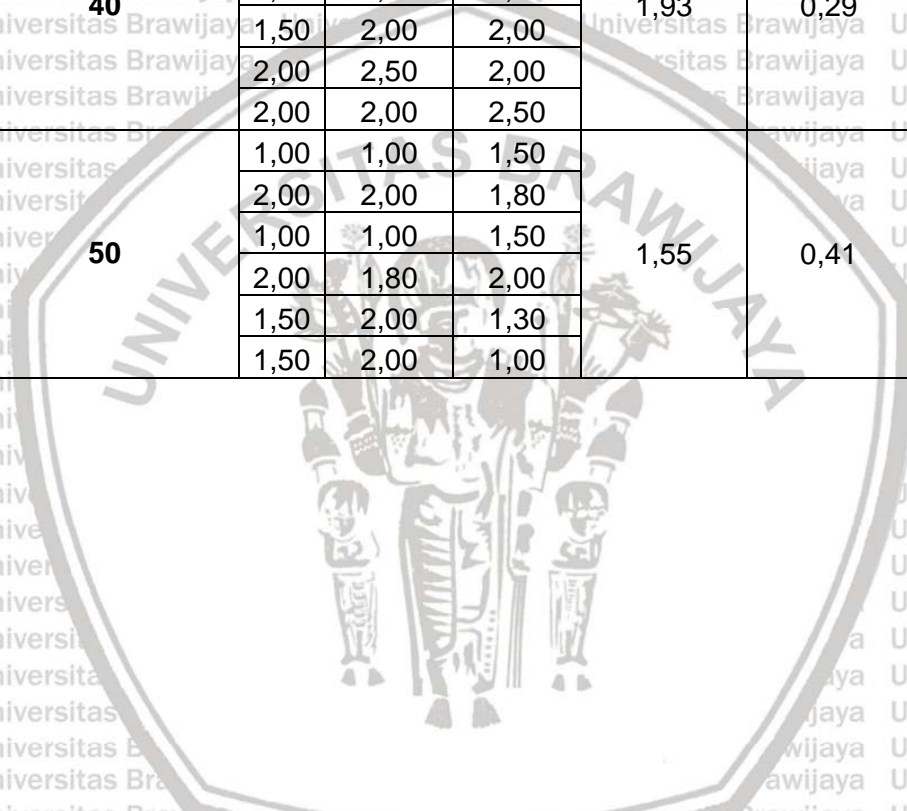
Perlakuan	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV	Kontrol Positif (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3			1	2	3		
S1W1	1,50	2,00	1,30	1,60	0,36	16,00	14,00	13,00	14,33	1,53
S1W2	1,50	1,00	2,00	1,50	0,50	15,00	15,00	13,00	14,33	1,15
S1W3	2,00	1,80	2,00	1,93	0,12	17,00	18,00	17,00	17,33	0,58
S1W4	2,50	2,00	2,00	2,17	0,29	15,00	15,00	16,00	15,33	0,58
S1W5	1,50	1,00	1,00	1,17	0,29	16,00	17,00	18,00	17,00	1,00
S1W6	2,00	2,00	1,50	1,83	0,29	16,00	15,00	15,00	15,33	0,58
S2W1	2,00	2,00	1,50	1,83	0,29	13,00	16,50	15,00	14,83	1,76
S2W2	2,00	2,00	1,50	1,83	0,29	16,00	18,00	17,00	17,00	1,00
S2W3	1,50	1,80	2,00	1,77	0,25	14,00	16,00	16,00	15,33	1,15
S2W4	1,50	2,00	2,00	1,83	0,29	17,00	14,00	17,00	16,00	1,73
S2W5	2,00	2,50	2,00	2,17	0,29	18,00	17,00	17,00	17,33	0,58
S2W6	2,00	2,00	2,50	2,17	0,29	19,00	10,00	16,00	15,00	4,58
S3W1	1,00	1,00	1,50	1,17	0,29	18,00	17,00	16,00	17,00	1,00
S3W2	2,00	2,00	1,80	1,93	0,12	14,00	19,00	14,00	15,67	2,89
S3W3	1,00	1,00	1,50	1,17	0,29	17,00	15,00	16,00	16,00	1,00
S3W4	2,00	1,80	2,00	1,93	0,12	17,00	16,00	17,00	16,67	0,58
S3W5	1,50	2,00	1,30	1,60	0,36	16,00	14,00	13,00	14,33	1,53
S3W6	1,50	2,00	1,00	1,50	0,50	16,00	16,00	18,00	16,67	1,15

Keterangan:

- Kontrol positif berupa kloramfenikol 1000 ppm
- S1 = suhu pemanasan 30 °C
- S2 = suhu pemanasan 40 °C
- S3 = suhu pemanasan 50 °C
- W1 = lama waktu pemanasan 5 menit
- W2 = lama waktu pemanasan 10 menit
- W3 = lama waktu pemanasan 15 menit
- W4 = lama waktu pemanasan 20 menit
- W5 = lama waktu pemanasan 25 menit
- W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

Pengaruh Suhu Pemanasan Terhadap Aktivitas Antibakteri *Marennine* pada *Vibrio alginolyticus*

Suhu Pemanasan (°C)	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3		
30	1,50	2,00	1,30	1,70	0,43
	1,50	1,00	2,00		
	2,00	1,80	2,00		
	2,50	2,00	2,00		
	1,50	1,00	1,00		
	2,00	2,00	1,50		
40	2,00	2,00	1,50	1,93	0,29
	2,00	2,00	1,50		
	1,50	1,80	2,00		
	1,50	2,00	2,00		
	2,00	2,50	2,00		
	2,00	2,00	2,50		
50	1,00	1,00	1,50	1,55	0,41
	2,00	2,00	1,80		
	1,00	1,00	1,50		
	2,00	1,80	2,00		
	1,50	2,00	1,30		
	1,50	2,00	1,00		



Pengaruh Lama Waktu Pemanasan Terhadap Aktivitas Antibakteri *Marennine* pada *Vibrio alginolyticus*

Lama Waktu Pemanasan (menit)	Ulangan (mm)			Rerata (mm)	STDEV
	1	2	3		
5	1,50	2,00	1,30	1,53	0,40
	2,00	2,00	1,50		
	1,00	1,00	1,50		
10	1,50	1,00	2,00	1,76	0,35
	2,00	2,00	1,50		
	2,00	2,00	1,80		
15	2,00	1,80	2,00	1,62	0,40
	1,50	1,80	2,00		
	1,00	1,00	1,50		
20	2,50	2,00	2,00	1,98	0,26
	1,50	2,00	2,00		
	2,00	1,80	2,00		
25	1,50	1,00	1,00	1,64	0,51
	2,00	2,50	2,00		
	1,50	2,00	1,30		
30	2,00	2,00	1,50	1,83	0,43
	2,00	2,00	2,50		
	1,50	2,00	1,00		

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Suhu Pemanasan (°C)	2	1,343	0,67167	7,13	0,002
Lama Waktu Pemanasan (menit)	5	1,173	0,23456	2,49	0,049
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	10	2,979	0,29789	3,16	0,005
Error	36	3,393	0,09426		
Total	53	8,888			

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)	N	Mean	Grouping
40	18	1,93333	A
30	18	1,70000	A B
50	18	1,55000	B

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Lama Waktu Pemanasan (menit)
Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Lama Waktu Pemanasan (menit)	N	Mean	Grouping
20	9	1,97778	A
30	9	1,83333	A B
10	9	1,75556	A B
25	9	1,64444	A B
15	9	1,62222	A B
5	9	1,53333	B

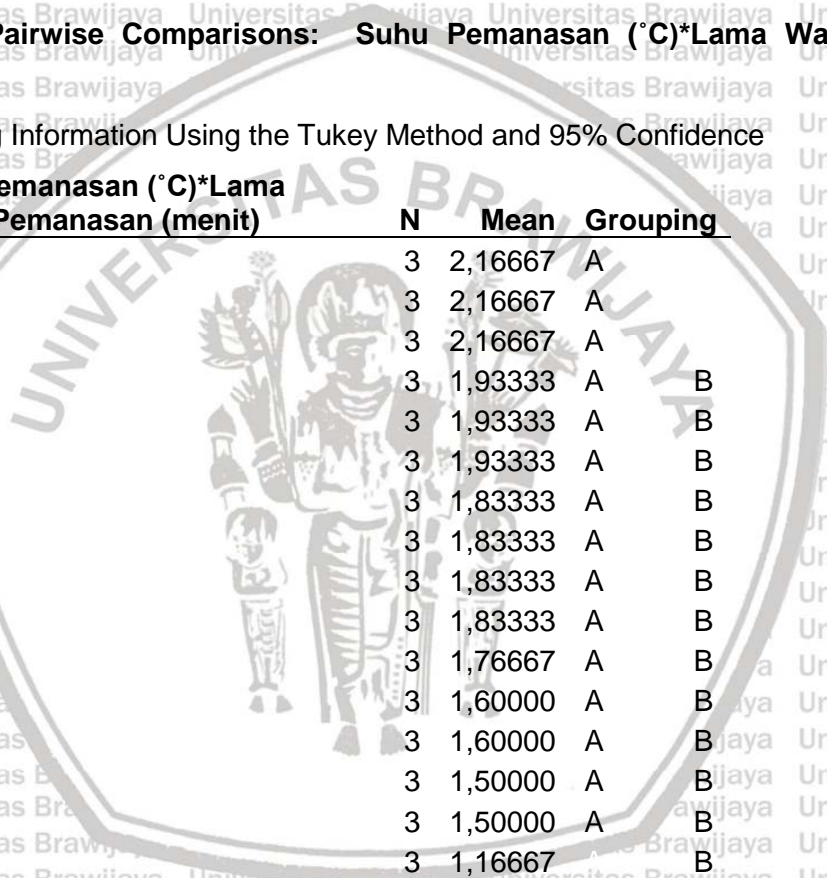
Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	N	Mean	Grouping
40 30	3	2,16667	A
40 25	3	2,16667	A
30 20	3	2,16667	A
50 10	3	1,93333	A B
50 20	3	1,93333	A B
30 15	3	1,93333	A B
40 5	3	1,83333	A B
40 10	3	1,83333	A B
30 30	3	1,83333	A B
40 20	3	1,83333	A B
40 15	3	1,76667	A B
30 5	3	1,60000	A B
50 25	3	1,60000	A B
50 30	3	1,50000	A B
30 10	3	1,50000	A B
30 25	3	1,16667	B
50 5	3	1,16667	B
50 15	3	1,16667	B

Means that do not share a letter are significantly different



Lampiran 5. Hasil Uji MIC *Marennine* pada Bakteri *Bacillus cereus*

Data Hasil Uji MIC *Marennine* Terhadap Bakteri *Bacillus cereus*

Perlakuan	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
S1W1M1	1,276	1,262	1,106	1,215	0,094
S1W1M2	1,300	1,535	1,624	1,486	0,167
S1W1M3	1,687	1,218	1,487	1,464	0,235
S1W1M4	1,293	1,931	1,673	1,632	0,321
S1W2M1	1,167	1,303	1,089	1,186	0,108
S1W2M2	1,256	1,366	1,473	1,365	0,109
S1W2M3	1,304	1,489	1,608	1,467	0,153
S1W2M4	1,570	1,807	1,493	1,623	0,164
S1W3M1	1,317	1,272	1,236	1,275	0,041
S1W3M2	1,108	1,399	1,327	1,278	0,152
S1W3M3	1,049	1,025	1,204	1,093	0,097
S1W3M4	0,992	1,493	1,602	1,362	0,325
S1W4M1	1,377	1,109	1,388	1,291	0,158
S1W4M2	1,777	1,497	1,949	1,741	0,228
S1W4M3	1,961	1,473	1,300	1,578	0,343
S1W4M4	1,584	1,671	1,387	1,547	0,146
S1W5M1	1,361	1,474	1,237	1,357	0,119
S1W5M2	1,408	1,458	1,612	1,493	0,106
S1W5M3	1,868	1,589	1,383	1,613	0,243
S1W5M4	1,637	1,589	1,818	1,681	0,121
S1W6M1	1,321	1,409	1,227	1,319	0,091
S1W6M2	0,954	1,237	1,606	1,266	0,327
S1W6M3	1,382	1,353	0,621	1,119	0,431
S1W6M4	1,269	1,369	1,056	1,231	0,160
S2W1M1	1,061	1,044	1,265	1,123	0,123
S2W1M2	1,708	1,390	1,171	1,423	0,270
S2W1M3	1,616	1,621	1,061	1,433	0,322
S2W1M4	1,706	1,444	1,545	1,565	0,132
S2W2M1	1,430	1,193	1,008	1,210	0,212
S2W2M2	1,480	1,585	1,632	1,566	0,078
S2W2M3	1,932	1,699	1,083	1,571	0,439
S2W2M4	1,539	1,209	1,525	1,424	0,187
S2W3M1	1,066	0,964	1,117	1,049	0,078
S2W3M2	1,347	1,419	1,556	1,441	0,106
S2W3M3	1,715	0,911	1,386	1,337	0,404
S2W3M4	1,747	0,921	0,720	1,129	0,544
S2W4M1	1,469	1,182	1,141	1,264	0,179
S2W4M2	0,970	1,332	1,316	1,206	0,205
S2W4M3	1,401	1,444	1,566	1,470	0,086

S2W4M4	1,541	1,304	1,529	1,458	0,134
S2W5M1	1,212	1,208	1,064	1,161	0,084
S2W5M2	1,313	1,466	1,613	1,464	0,150
S2W5M3	1,732	1,420	1,400	1,517	0,186
S2W5M4	1,412	1,423	1,333	1,389	0,049
S2W6M1	1,232	1,063	1,661	1,319	0,308
S2W6M2	1,059	1,216	1,377	1,217	0,159
S2W6M3	1,113	1,157	1,307	1,192	0,102
S2W6M4	0,876	1,401	0,952	1,076	0,284
S3W1M1	1,187	1,061	1,051	1,100	0,076
S3W1M2	1,230	1,067	1,106	1,134	0,085
S3W1M3	1,243	1,336	1,205	1,261	0,067
S3W1M4	1,229	1,321	1,261	1,270	0,047
S3W2M1	1,212	1,198	1,081	1,164	0,072
S3W2M2	1,333	1,101	1,456	1,297	0,180
S3W2M3	1,301	1,464	1,522	1,429	0,115
S3W2M4	1,197	1,163	1,160	1,173	0,021
S3W3M1	1,172	1,168	1,059	1,133	0,064
S3W3M2	1,407	1,421	1,413	1,414	0,007
S3W3M3	1,178	1,393	1,207	1,259	0,117
S3W3M4	1,031	1,085	1,103	1,073	0,037
S3W4M1	1,021	1,165	1,261	1,149	0,121
S3W4M2	1,296	1,016	1,112	1,141	0,142
S3W4M3	1,136	1,066	1,101	1,101	0,035
S3W4M4	1,097	0,959	1,073	1,043	0,074
S3W5M1	1,090	0,979	1,058	1,042	0,057
S3W5M2	1,149	1,042	1,360	1,184	0,162
S3W5M3	1,198	1,094	1,209	1,167	0,063
S3W5M4	1,119	1,109	1,084	1,104	0,018
S3W6M1	1,214	1,096	0,988	1,099	0,113
S3W6M2	1,358	1,331	1,416	1,368	0,043
S3W6M3	1,260	1,152	1,042	1,151	0,109
S3W6M4	1,090	1,033	0,958	1,027	0,066

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit

- W6 = lama waktu pemanasan 30 menit
- M1 = konsentrasi *marennine* 1 ppm
- M2 = konsentrasi *marennine* 0,5 ppm
- M3 = konsentrasi *marennine* 0,25 ppm
- M4 = konsentrasi *marennine* 0,125 ppm



Data Hasil Kontrol Positif dan Negatif Uji MIC *Marennine* Terhadap Bakteri *Bacillus cereus*

Nilai Absorbansi	Kontrol Negatif	Kontrol Positif
		0,963
	0,972	0,048
	0,952	0,049
	0,834	0,052
	0,829	0,049
	0,968	0,046
	0,781	0,046
	1,005	0,053
	0,872	0,050
	0,920	0,051
	0,947	0,042
	0,950	0,043
	0,716	0,067
	1,196	0,067
	1,049	0,095
	0,906	0,072
	1,180	0,085
	0,942	0,068
	1,163	0,067
	0,992	0,087
	1,059	0,081
	1,090	0,102
	0,827	0,084
	1,067	0,085
	0,312	0,068
	0,127	0,061
	0,536	0,068
	0,160	0,072
	0,140	0,067
	0,735	0,138
	0,195	0,070
	0,089	0,071
	0,175	0,068
	0,176	0,074
	0,489	0,071
	0,128	0,073
Rerata	0,735	0,068
STDEV	0,365	0,019

Keterangan :

- Kontrol positif berupa campuran suspensi bakteri 50 µl dengan kloramfenikol 1000 ppm
- Kontrol negatif berupa campuran media pertumbuhan dengan *marennine* tanpa perlakuan

Pengaruh Suhu Pemanasan *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*

Suhu Pemanasan (°C)	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
30	1,276	1,262	1,106	1,404	0,250
	1,300	1,535	1,624		
	1,687	1,218	1,487		
	1,293	1,931	1,673		
	1,167	1,303	1,089		
	1,256	1,366	1,473		
	1,304	1,489	1,608		
	1,570	1,807	1,493		
	1,317	1,272	1,236		
	1,108	1,399	1,327		
	1,049	1,025	1,204		
	0,992	1,493	1,602		
	1,377	1,109	1,388		
	1,777	1,497	1,949		
	1,961	1,473	1,300		
	1,584	1,671	1,387		
	1,361	1,474	1,237		
	1,408	1,458	1,612		
	1,868	1,589	1,383		
	40	1,637	1,589		
1,321		1,409	1,227		
0,954		1,237	1,606		
1,382		1,353	0,621		
1,269		1,369	1,056		
1,061		1,044	1,265		
1,708		1,390	1,171		
1,616		1,621	1,061		
1,706		1,444	1,545		
1,430		1,193	1,008		
1,480		1,585	1,632		
1,932		1,699	1,083		
1,539		1,209	1,525		
1,066		0,964	1,117		
1,347	1,419	1,556			
1,715	0,911	1,386			
1,747	0,921	0,720			
1,469	1,182	1,141			
0,970	1,332	1,316			
1,401	1,444	1,566			
1,541	1,304	1,529			

	1,212	1,208	1,064	
	1,313	1,466	1,613	
	1,732	1,420	1,400	
	1,412	1,423	1,333	
	1,232	1,063	1,661	
	1,059	1,216	1,377	
	1,113	1,157	1,307	
	0,876	1,401	0,952	
	1,187	1,061	1,051	
	1,230	1,067	1,106	
	1,243	1,336	1,205	
	1,229	1,321	1,261	
	1,212	1,198	1,081	
	1,333	1,101	1,456	
	1,301	1,464	1,522	
	1,197	1,163	1,160	
	1,172	1,168	1,059	
	1,407	1,421	1,413	
	1,178	1,393	1,207	
	1,031	1,085	1,103	
	1,021	1,165	1,261	
	1,296	1,016	1,112	
	1,136	1,066	1,101	
	1,097	0,959	1,073	
	1,090	0,979	1,058	
	1,149	1,042	1,360	
	1,198	1,094	1,209	
	1,119	1,109	1,084	
	1,214	1,096	0,988	
	1,358	1,331	1,416	
	1,260	1,152	1,042	
	1,090	1,033	0,958	
50			1,179	0,134

Pengaruh Lama Waktu Pemanasan *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*

Lama Waktu Pemanasan (menit)	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
5	1,276	1,262	1,106	1,342	0,2350919
	1,300	1,535	1,624		
	1,687	1,218	1,487		
	1,293	1,931	1,673		
	1,061	1,044	1,265		
	1,708	1,390	1,171		
	1,616	1,621	1,061		
	1,706	1,444	1,545		
	1,187	1,061	1,051		
	1,230	1,067	1,106		
10	1,243	1,336	1,205	1,373	0,2216749
	1,229	1,321	1,261		
	1,167	1,303	1,089		
	1,256	1,366	1,473		
	1,304	1,489	1,608		
	1,570	1,807	1,493		
	1,430	1,193	1,008		
	1,480	1,585	1,632		
	1,932	1,699	1,083		
	1,539	1,209	1,525		
15	1,212	1,198	1,081	1,237	0,2326708
	1,333	1,101	1,456		
	1,301	1,464	1,522		
	1,197	1,163	1,160		
	1,317	1,272	1,236		
	1,108	1,399	1,327		
	1,049	1,025	1,204		
	0,992	1,493	1,602		
	1,066	0,964	1,117		
	1,347	1,419	1,556		
20	1,715	0,911	1,386	1,333	0,2578134
	1,747	0,921	0,720		
	1,172	1,168	1,059		
	1,407	1,421	1,413		
	1,178	1,393	1,207		
1,031	1,085	1,103			
20	1,377	1,109	1,388	1,333	0,2578134
	1,777	1,497	1,949		
	1,961	1,473	1,300		
	1,584	1,671	1,387		

		1,469	1,182	1,141		
		0,970	1,332	1,316		
		1,401	1,444	1,566		
		1,541	1,304	1,529		
		1,021	1,165	1,261		
		1,296	1,016	1,112		
		1,136	1,066	1,101		
		1,097	0,959	1,073		
		1,361	1,474	1,237		
		1,408	1,458	1,612		
		1,868	1,589	1,383		
		1,637	1,589	1,818		
		1,212	1,208	1,064		
	25	1,313	1,466	1,613	1,348	0,2318365
		1,732	1,420	1,400		
		1,412	1,423	1,333		
		1,090	0,979	1,058		
		1,149	1,042	1,360		
		1,198	1,094	1,209		
		1,119	1,109	1,084		
		1,321	1,409	1,227		
		0,954	1,237	1,606		
		1,382	1,353	0,621		
		1,269	1,369	1,056		
		1,232	1,063	1,661		
	30	1,059	1,216	1,377	1,199	0,2082057
		1,113	1,157	1,307		
		0,876	1,401	0,952		
		1,214	1,096	0,988		
		1,358	1,331	1,416		
		1,260	1,152	1,042		
		1,090	1,033	0,958		

Pengaruh Konsentrasi *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*

Konsentrasi <i>Marennine</i> (ppm)	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
1	1,276	1,262	1,106	1,192	0,144
	1,167	1,303	1,089		
	1,317	1,272	1,236		
	1,377	1,109	1,388		
	1,361	1,474	1,237		
	1,321	1,409	1,227		
	1,061	1,044	1,265		
	1,430	1,193	1,008		
	1,066	0,964	1,117		
	1,469	1,182	1,141		
	1,212	1,208	1,064		
	1,232	1,063	1,661		
	1,187	1,061	1,051		
	1,212	1,198	1,081		
	1,172	1,168	1,059		
1,021	1,165	1,261			
1,090	0,979	1,058			
1,214	1,096	0,988	1,360	0,209	
1,300	1,535	1,624			
1,256	1,366	1,473			
1,108	1,399	1,327			
1,777	1,497	1,949			
1,408	1,458	1,612			
0,954	1,237	1,606			
1,708	1,390	1,171			
1,480	1,585	1,632			
1,347	1,419	1,556			
0,970	1,332	1,316			
1,313	1,466	1,613			
1,059	1,216	1,377			
1,230	1,067	1,106			
1,333	1,101	1,456			
1,407	1,421	1,413			
1,296	1,016	1,112			
1,149	1,042	1,360			
1,358	1,331	1,416	1,346	0,263	
1,687	1,218	1,487			
1,304	1,489	1,608			
1,049	1,025	1,204			
1,961	1,473	1,300			

	1,868	1,589	1,383	
	1,382	1,353	0,621	
	1,616	1,621	1,061	
	1,932	1,699	1,083	
	1,715	0,911	1,386	
	1,401	1,444	1,566	
	1,732	1,420	1,400	
	1,113	1,157	1,307	
	1,243	1,336	1,205	
	1,301	1,464	1,522	
	1,178	1,393	1,207	
	1,136	1,066	1,101	
	1,198	1,094	1,209	
	1,260	1,152	1,042	
	1,293	1,931	1,673	
	1,570	1,807	1,493	
	0,992	1,493	1,602	
	1,584	1,671	1,387	
	1,637	1,589	1,818	
	1,269	1,369	1,056	
	1,706	1,444	1,545	
	1,539	1,209	1,525	
0,125	1,747	0,921	0,720	1,323
	1,541	1,304	1,529	0,279
	1,412	1,423	1,333	
	0,876	1,401	0,952	
	1,229	1,321	1,261	
	1,197	1,163	1,160	
	1,031	1,085	1,103	
	1,097	0,959	1,073	
	1,119	1,109	1,084	
	1,090	1,033	0,958	



Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Pemanasan *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Bacillus cereus*

Perlakuan	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
S1W1	1,276	1,262	1,106	1,449	0,245
	1,300	1,535	1,624		
	1,687	1,218	1,487		
	1,293	1,931	1,673		
S1W2	1,167	1,303	1,089	1,410	0,202
	1,256	1,366	1,473		
	1,304	1,489	1,608		
	1,570	1,807	1,493		
S1W3	1,317	1,272	1,236	1,252	0,190
	1,108	1,399	1,327		
	1,049	1,025	1,204		
	0,992	1,493	1,602		
S1W4	1,377	1,109	1,388	1,539	0,260
	1,777	1,497	1,949		
	1,961	1,473	1,300		
	1,584	1,671	1,387		
S1W5	1,361	1,474	1,237	1,536	0,186
	1,408	1,458	1,612		
	1,868	1,589	1,383		
	1,637	1,589	1,818		
S1W6	1,321	1,409	1,227	1,234	0,255
	0,954	1,237	1,606		
	1,382	1,353	0,621		
	1,269	1,369	1,056		
S2W1	1,061	1,044	1,265	1,386	0,258
	1,708	1,390	1,171		
	1,616	1,621	1,061		
	1,706	1,444	1,545		
S2W2	1,430	1,193	1,008	1,443	0,272
	1,480	1,585	1,632		
	1,932	1,699	1,083		
	1,539	1,209	1,525		
S2W3	1,066	0,964	1,117	1,239	0,337
	1,347	1,419	1,556		
	1,715	0,911	1,386		
	1,747	0,921	0,720		
S2W4	1,469	1,182	1,141	1,350	0,181
	0,970	1,332	1,316		
	1,401	1,444	1,566		
	1,541	1,304	1,529		

S2W5	1,212	1,208	1,064	1,383	0,180
	1,313	1,466	1,613		
	1,732	1,420	1,400		
S2W6	1,412	1,423	1,333	1,201	0,216
	1,232	1,063	1,661		
	1,059	1,216	1,377		
	1,113	1,157	1,307		
S3W1	0,876	1,401	0,952	1,191	0,099
	1,187	1,061	1,051		
	1,230	1,067	1,106		
	1,243	1,336	1,205		
S3W2	1,229	1,321	1,261	1,266	0,148
	1,212	1,198	1,081		
	1,333	1,101	1,456		
	1,301	1,464	1,522		
S3W3	1,197	1,163	1,160	1,220	0,149
	1,172	1,168	1,059		
	1,407	1,421	1,413		
	1,178	1,393	1,207		
S3W4	1,031	1,085	1,103	1,109	0,097
	1,021	1,165	1,261		
	1,296	1,016	1,112		
	1,136	1,066	1,101		
S3W5	1,097	0,959	1,073	1,124	0,098
	1,090	0,979	1,058		
	1,149	1,042	1,360		
	1,198	1,094	1,209		
S3W6	1,119	1,109	1,084	1,162	0,153
	1,214	1,096	0,988		
	1,358	1,331	1,416		
	1,260	1,152	1,042		
	1,090	1,033	0,958		

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit

W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Suhu Pemanasan (°C)	2	1,9092	0,9546	26,56	0,000
Lama Waktu Pemanasan (menit)	5	0,8826	0,1765	4,91	0,000
Konsentrasi (ppm)	3	0,9600	0,3200	8,90	0,000
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	10	0,9350	0,0935	2,60	0,006
Suhu Pemanasan (°C)*Konsentrasi (ppm)	6	0,4511	0,0752	2,09	0,058
Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)	15	0,9335	0,0622	1,73	0,051
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)	30	0,9095	0,0303	0,84	0,700
Error	144	5,1755	0,0359		
Total	215	12,1564			

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)	N	Mean	Grouping
30	72	1,40350	A
40	72	1,33362	A
50	72	1,17853	B

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Lama Waktu Pemanasan (menit)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Lama Waktu Pemanasan (menit)	N	Mean	Grouping
10	36	1,37300	A
25	36	1,34781	A B
5	36	1,34225	A B
20	36	1,33253	A B
15	36	1,23694	B C
30	36	1,19878	C

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi (ppm)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi (ppm)	N	Mean	Grouping
0,5	54	1,36019	A
0,25	54	1,34578	A
0,125	54	1,32283	A
1	54	1,19207	B

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	N	Mean	Grouping
30 20	12	1,53942	A
30 25	12	1,53617	A
30 5	12	1,44933	A B
40 10	12	1,44292	A B
30 10	12	1,41042	A B C
40 5	12	1,38600	A B C D
40 25	12	1,38300	A B C D E
40 20	12	1,34958	A B C D E
50 10	12	1,26567	A B C D E
30 15	12	1,25200	B C D E
40 15	12	1,23908	B C D E
30 30	12	1,23367	B C D E
50 15	12	1,21975	B C D E
40 30	12	1,20117	B C D E
50 5	12	1,19142	B C D E
50 30	12	1,16150	C D E
50 25	12	1,12425	D E
50 20	12	1,10858	E

Means that do not share a letter are significantly different

Lampiran 6. Hasil Uji MIC *Marennine* pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Data Hasil Uji MIC *Marennine* Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Perlakuan	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
S1W1M1	0,879	1,160	0,856	0,965	0,169
S1W1M2	0,919	1,426	1,140	1,162	0,254
S1W1M3	1,264	1,035	1,153	1,151	0,115
S1W1M4	1,254	0,960	0,965	1,060	0,168
S1W2M1	0,820	0,883	0,591	0,765	0,154
S1W2M2	0,927	0,838	0,885	0,883	0,045
S1W2M3	0,765	0,979	0,933	0,892	0,113
S1W2M4	1,501	1,302	1,319	1,374	0,110
S1W3M1	1,243	1,233	1,165	1,214	0,042
S1W3M2	0,920	1,685	1,192	1,266	0,388
S1W3M3	1,176	1,599	1,324	1,366	0,215
S1W3M4	0,320	0,965	1,310	0,865	0,503
S1W4M1	1,177	1,202	1,045	1,141	0,084
S1W4M2	1,963	1,790	0,965	1,573	0,533
S1W4M3	1,575	1,796	0,920	1,430	0,456
S1W4M4	1,777	1,263	1,330	1,457	0,279
S1W5M1	1,359	1,115	0,964	1,146	0,199
S1W5M2	1,176	1,081	0,556	0,938	0,334
S1W5M3	1,051	1,137	1,396	1,195	0,180
S1W5M4	1,804	1,090	1,197	1,364	0,385
S1W6M1	0,932	1,157	0,852	0,980	0,158
S1W6M2	1,480	1,540	1,142	1,387	0,215
S1W6M3	1,328	1,195	1,336	1,286	0,079
S1W6M4	1,188	1,614	1,142	1,315	0,260
S2W1M1	0,968	0,887	0,930	0,928	0,041
S2W1M2	1,138	1,713	1,432	1,428	0,288
S2W1M3	1,493	1,644	1,003	1,380	0,335
S2W1M4	1,678	1,399	1,242	1,440	0,221
S2W2M1	0,982	1,351	1,013	1,115	0,205
S2W2M2	1,439	1,847	1,487	1,591	0,223
S2W2M3	1,498	1,557	1,514	1,523	0,031
S2W2M4	1,540	1,755	1,173	1,489	0,294
S2W3M1	1,148	1,176	1,506	1,277	0,199
S2W3M2	1,423	1,373	1,434	1,410	0,033
S2W3M3	1,470	1,201	0,984	1,218	0,243
S2W3M4	1,267	1,055	1,225	1,182	0,112
S2W4M1	1,029	0,967	0,993	0,996	0,031
S2W4M2	1,722	1,325	1,162	1,403	0,288
S2W4M3	1,412	1,023	1,341	1,259	0,207

S2W4M4	0,999	1,049	1,204	1,084	0,107
S2W5M1	1,152	1,192	1,204	1,183	0,027
S2W5M2	1,520	1,193	1,792	1,502	0,300
S2W5M3	1,512	1,385	1,627	1,508	0,121
S2W5M4	1,397	1,067	1,238	1,234	0,165
S2W6M1	1,152	1,106	1,157	1,138	0,028
S2W6M2	1,905	1,507	1,705	1,706	0,199
S2W6M3	1,577	0,907	0,864	1,116	0,400
S2W6M4	1,523	1,325	1,323	1,390	0,115
S3W1M1	0,910	1,073	1,239	1,074	0,165
S3W1M2	1,058	1,115	1,210	1,128	0,077
S3W1M3	1,489	1,808	1,284	1,527	0,264
S3W1M4	1,607	1,373	1,167	1,382	0,220
S3W2M1	1,128	1,240	1,216	1,195	0,059
S3W2M2	1,359	1,524	1,280	1,388	0,125
S3W2M3	1,639	1,679	1,468	1,595	0,112
S3W2M4	1,635	1,397	1,092	1,375	0,272
S3W3M1	1,110	1,305	1,045	1,153	0,135
S3W3M2	1,262	1,354	1,593	1,403	0,171
S3W3M3	1,036	1,192	1,333	1,187	0,149
S3W3M4	1,132	1,066	1,016	1,071	0,058
S3W4M1	1,108	1,292	1,254	1,218	0,097
S3W4M2	1,424	1,366	1,258	1,349	0,084
S3W4M3	1,286	1,211	1,075	1,191	0,107
S3W4M4	1,093	1,034	1,009	1,045	0,043
S3W5M1	1,417	1,157	1,002	1,192	0,210
S3W5M2	1,212	1,303	1,317	1,277	0,057
S3W5M3	1,000	1,092	1,700	1,264	0,380
S3W5M4	1,448	1,054	1,067	1,190	0,224
S3W6M1	1,045	1,151	1,005	1,067	0,075
S3W6M2	1,131	1,343	1,078	1,184	0,677
S3W6M3	1,318	1,109	0,951	1,126	0,184
S3W6M4	1,024	1,012	0,963	1,000	0,032

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit



- W6 = lama waktu pemanasan 30 menit
- M1 = konsentrasi *marennine* 1 ppm
- M2 = konsentrasi *marennine* 0,5 ppm
- M3 = konsentrasi *marennine* 0,25 ppm
- M4 = konsentrasi *marennine* 0,125 ppm



Data Hasil Kontrol Positif dan Negatif Uji MIC *Marennine* Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*

	Kontrol Negatif	Kontrol Positif
	0,944	0,042
	0,889	0,049
	1,069	0,039
	0,763	0,039
	1,167	0,035
	1,045	0,054
	0,402	0,056
	1,552	0,037
	0,628	0,045
	0,555	0,044
	0,817	0,042
	0,987	0,043
	0,373	0,055
	0,590	0,057
	0,376	0,071
	0,273	0,063
	0,682	0,074
Nilai Absorbansi	0,252	0,068
	0,509	0,092
	0,243	0,063
	0,638	0,083
	0,510	0,058
	0,567	0,061
	0,466	0,064
	0,275	0,130
	0,244	0,072
	0,272	0,096
	0,188	0,091
	0,234	0,097
	0,232	0,102
	0,187	0,082
	0,239	0,072
	0,242	0,074
	0,242	0,069
	0,216	0,073
	0,279	0,100
Rerata	0,532	0,066
STDEV	0,339	0,022

Keterangan :

- Kontrol positif berupa campuran suspensi bakteri 50 µl dengan kloramfenikol 1000 ppm
- Kontrol negatif berupa campuran media pertumbuhan dengan *marennine* tanpa perlakuan

Pengaruh Suhu Pemanasan *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Suhu Pemanasan (°C)	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
30	0,879	1,160	0,856	1,174	0,306
	0,919	1,426	1,140		
	1,264	1,035	1,153		
	1,254	0,960	0,965		
	0,820	0,883	0,591		
	0,927	0,838	0,885		
	0,765	0,979	0,933		
	1,501	1,302	1,319		
	1,243	1,233	1,165		
	0,920	1,685	1,192		
	1,176	1,599	1,324		
	0,320	0,965	1,310		
	1,177	1,202	1,045		
	1,963	1,790	0,965		
	1,575	1,796	0,920		
	1,777	1,263	1,330		
	1,359	1,115	0,964		
	1,176	1,081	0,556		
	1,051	1,137	1,396		
	40	1,804	1,090		
0,932		1,157	0,852		
1,480		1,540	1,142		
1,328		1,195	1,336		
1,188		1,614	1,142		
0,968		0,887	0,930		
1,138		1,713	1,432		
1,493		1,644	1,003		
1,678		1,399	1,242		
0,982		1,351	1,013		
1,439		1,847	1,487		
1,498		1,557	1,514		
1,540	1,755	1,173			
1,148	1,176	1,506			
1,423	1,373	1,434			
1,470	1,201	0,984			
1,267	1,055	1,225			
1,029	0,967	0,993			
1,722	1,325	1,162			
1,412	1,023	1,341			
0,999	1,049	1,204			

	1,152	1,192	1,204	
	1,520	1,193	1,792	
	1,512	1,385	1,627	
	1,397	1,067	1,238	
	1,152	1,106	1,157	
	1,905	1,507	1,705	
	1,577	0,907	0,864	
	1,523	1,325	1,323	
	0,910	1,073	1,239	
	1,058	1,115	1,210	
	1,489	1,808	1,284	
	1,607	1,373	1,167	
	1,128	1,240	1,216	
	1,359	1,524	1,280	
	1,639	1,679	1,468	
	1,635	1,397	1,092	
	1,110	1,305	1,045	
	1,262	1,354	1,593	
	1,036	1,192	1,333	
	1,132	1,066	1,016	
	1,108	1,292	1,254	
	1,424	1,366	1,258	
	1,286	1,211	1,075	
	1,093	1,034	1,009	
	1,417	1,157	1,002	
	1,212	1,303	1,317	
	1,000	1,092	1,700	
	1,448	1,054	1,067	
	1,045	1,151	1,005	
	1,131	1,343	1,078	
	1,318	1,109	0,951	
	1,024	1,012	0,963	
50				1,233
				0,203



Pengaruh Konsentrasi *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Konsentrasi <i>Marennine</i> (ppm)	Ulangan (AU)			Rerata (AU)	STDEV
	1	2	3		
1	0,879	1,160	0,856	1,097	0,167
	0,820	0,883	0,591		
	1,243	1,233	1,165		
	1,177	1,202	1,045		
	1,359	1,115	0,964		
	0,932	1,157	0,852		
	0,968	0,887	0,930		
	0,982	1,351	1,013		
	1,148	1,176	1,506		
	1,029	0,967	0,993		
	1,152	1,192	1,204		
	1,152	1,106	1,157		
	0,910	1,073	1,239		
	1,128	1,240	1,216		
	1,110	1,305	1,045		
0,5	1,108	1,292	1,254	1,332	0,292
	1,417	1,157	1,002		
	1,045	1,151	1,005		
	0,919	1,426	1,140		
	0,927	0,838	0,885		
	0,920	1,685	1,192		
	1,963	1,790	0,965		
	1,176	1,081	0,556		
	1,480	1,540	1,142		
	1,138	1,713	1,432		
	1,439	1,847	1,487		
	1,423	1,373	1,434		
	1,722	1,325	1,162		
	1,520	1,193	1,792		
	1,905	1,507	1,705		
0,25	1,058	1,115	1,210	1,290	0,263
	1,359	1,524	1,280		
	1,262	1,354	1,593		
	1,424	1,366	1,258		
	1,212	1,303	1,317		
	1,131	1,343	1,078		
	1,264	1,035	1,153		
0,765	0,979	0,933			
1,176	1,599	1,324	1,290	0,263	
1,575	1,796	0,920			
1,051	1,137	1,396			

1,328	1,195	1,336		
1,493	1,644	1,003		
1,498	1,557	1,514		
1,470	1,201	0,984		
1,412	1,023	1,341		
1,512	1,385	1,627		
1,577	0,907	0,864		
1,489	1,808	1,284		
1,639	1,679	1,468		
1,036	1,192	1,333		
1,286	1,211	1,075		
1,000	1,092	1,700		
1,318	1,109	0,951		
1,254	0,960	0,965		
1,501	1,302	1,319		
0,320	0,965	1,310		
1,777	1,263	1,330		
1,804	1,090	1,197		
1,188	1,614	1,142		
1,678	1,399	1,242		
1,540	1,755	1,173		
1,267	1,055	1,225		
0,125	0,999	1,049	1,240	0,263
1,397	1,067	1,238		
1,523	1,325	1,323		
1,607	1,373	1,167		
1,635	1,397	1,092		
1,132	1,066	1,016		
1,093	1,034	1,009		
1,448	1,054	1,067		
1,024	1,012	0,963		



Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Pemanasan *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Perlakuan	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
S1W1	0,879	1,160	0,856	1,084	0,177
	0,919	1,426	1,140		
	1,264	1,035	1,153		
	1,254	0,960	0,965		
S1W2	0,820	0,883	0,591	0,979	0,262
	0,927	0,838	0,885		
	0,765	0,979	0,933		
	1,501	1,302	1,319		
S1W3	1,243	1,233	1,165	1,178	0,348
	0,920	1,685	1,192		
	1,176	1,599	1,324		
	0,320	0,965	1,310		
S1W4	1,177	1,202	1,045	1,400	0,364
	1,963	1,790	0,965		
	1,575	1,796	0,920		
	1,777	1,263	1,330		
S1W5	1,359	1,115	0,964	1,161	0,292
	1,176	1,081	0,556		
	1,051	1,137	1,396		
	1,804	1,090	1,197		
S1W6	0,932	1,157	0,852	1,242	0,230
	1,480	1,540	1,142		
	1,328	1,195	1,336		
	1,188	1,614	1,142		
S2W1	0,968	0,887	0,930	1,294	0,306
	1,138	1,713	1,432		
	1,493	1,644	1,003		
	1,678	1,399	1,242		
S2W2	0,982	1,351	1,013	1,430	0,265
	1,439	1,847	1,487		
	1,498	1,557	1,514		
	1,540	1,755	1,173		
S2W3	1,148	1,176	1,506	1,272	0,169
	1,423	1,373	1,434		
	1,470	1,201	0,984		
	1,267	1,055	1,225		
S2W4	1,029	0,967	0,993	1,186	0,228
	1,722	1,325	1,162		
	1,412	1,023	1,341		
	0,999	1,049	1,204		

S2W5	1,152	1,192	1,204	1,357	0,220
	1,520	1,193	1,792		
	1,512	1,385	1,627		
S2W6	1,397	1,067	1,238	1,338	0,317
	1,152	1,106	1,157		
	1,905	1,507	1,705		
	1,577	0,907	0,864		
S3W1	1,523	1,325	1,323	1,278	0,255
	0,910	1,073	1,239		
	1,058	1,115	1,210		
	1,489	1,808	1,284		
S3W2	1,607	1,373	1,167	1,388	0,203
	1,128	1,240	1,216		
	1,359	1,524	1,280		
	1,639	1,679	1,468		
S3W3	1,635	1,397	1,092	1,204	0,172
	1,110	1,305	1,045		
	1,262	1,354	1,593		
	1,036	1,192	1,333		
S3W4	1,132	1,066	1,016	1,201	0,135
	1,108	1,292	1,254		
	1,424	1,366	1,258		
	1,286	1,211	1,075		
S3W5	1,093	1,034	1,009	1,231	0,214
	1,417	1,157	1,002		
	1,212	1,303	1,317		
	1,000	1,092	1,700		
S3W6	1,448	1,054	1,067	1,094	0,127
	1,045	1,151	1,005		
	1,131	1,343	1,078		
	1,318	1,109	0,951		
	1,024	1,012	0,963		

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

W1 = lama waktu pemanasan 5 menit

W2 = lama waktu pemanasan 10 menit

W3 = lama waktu pemanasan 15 menit

W4 = lama waktu pemanasan 20 menit

W5 = lama waktu pemanasan 25 menit

W6 = lama waktu pemanasan 30 menit

Pengaruh Lama Waktu Pemanasan dan Konsentrasi *Marennine* Terhadap Nilai Absorbansi Pengujian MIC pada Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Perlakuan	Nilai Absorbansi			Rerata	STDEV
	1	2	3		
W1M1	0,879	1,160	0,856	0,989	0,137
	0,968	0,887	0,930		
	0,910	1,073	1,239		
W1M2	0,919	1,426	1,140	1,239	0,242
	1,138	1,713	1,432		
	1,058	1,115	1,210		
W1M3	1,264	1,035	1,153	1,353	0,275
	1,493	1,644	1,003		
	1,489	1,808	1,284		
W1M4	1,254	0,960	0,965	1,294	0,251
	1,678	1,399	1,242		
	1,607	1,373	1,167		
W2M1	0,820	0,883	0,591	1,025	0,238
	0,982	1,351	1,013		
	1,128	1,240	1,216		
W2M2	0,927	0,838	0,885	1,287	0,341
	1,439	1,847	1,487		
	1,359	1,524	1,280		
W2M3	0,765	0,979	0,933	1,337	0,345
	1,498	1,557	1,514		
	1,639	1,679	1,468		
W2M4	1,501	1,302	1,319	1,413	0,216
	1,540	1,755	1,173		
	1,635	1,397	1,092		
W3M1	1,243	1,233	1,165	1,215	0,133
	1,148	1,176	1,506		
	1,110	1,305	1,045		
W3M2	0,920	1,685	1,192	1,360	0,224
	1,423	1,373	1,434		
	1,262	1,354	1,593		
W3M3	1,176	1,599	1,324	1,257	0,197
	1,470	1,201	0,984		
	1,036	1,192	1,333		
W3M4	0,320	0,965	1,310	1,040	0,294
	1,267	1,055	1,225		
	1,132	1,066	1,016		
W4M1	1,177	1,202	1,045	1,119	0,118
	1,029	0,967	0,993		
	1,108	1,292	1,254		
W4M2	1,963	1,790	0,965	1,442	0,322

	1,722	1,325	1,162		
	1,424	1,366	1,258		
	1,575	1,796	0,920		
W4M3	1,412	1,023	1,341	1,293	0,277
	1,286	1,211	1,075		
	1,777	1,263	1,330		
W4M4	0,999	1,049	1,204	1,195	0,248
	1,093	1,034	1,009		
	1,359	1,115	0,964		
W5M1	1,152	1,192	1,204	1,174	0,147
	1,417	1,157	1,002		
	1,176	1,081	0,556		
W5M2	1,520	1,193	1,792	1,239	0,334
	1,212	1,303	1,317		
	1,051	1,137	1,396		
W5M3	1,512	1,385	1,627	1,322	0,261
	1,000	1,092	1,700		
	1,804	1,090	1,197		
W5M4	1,397	1,067	1,238	1,262	0,250
	1,448	1,054	1,067		
	0,932	1,157	0,852		
W6M1	1,152	1,106	1,157	1,062	0,112
	1,045	1,151	1,005		
	1,480	1,540	1,142		
W6M2	1,905	1,507	1,705	1,426	0,280
	1,131	1,343	1,078		
	1,328	1,195	1,336		
W6M3	1,577	0,907	0,864	1,176	0,238
	1,318	1,109	0,951		
	1,188	1,614	1,142		
W6M4	1,523	1,325	1,323	1,235	0,230
	1,024	1,012	0,963		

Keterangan:

S1 = suhu pemanasan 30°C

S2 = suhu pemanasan 40°C

S3 = suhu pemanasan 50°C

M1 = konsentrasi *marennine* 1 ppm

M2 = konsentrasi *marennine* 0,5 ppm

M3 = konsentrasi *marennine* 0,25 ppm

M4 = konsentrasi *marennine* 0,125 ppm

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Suhu Pemanasan (°C)	2	0,6971	0,34857	7,44	0,001
Lama Waktu Pemanasan (menit)	5	0,0869	0,01738	0,37	0,868
Konsentrasi (ppm)	3	1,6934	0,56448	12,05	0,000
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)	10	2,1203	0,21203	4,53	0,000
Suhu Pemanasan (°C)*Konsentrasi (ppm)	6	0,5904	0,09840	2,10	0,057
Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)	15	1,4945	0,09964	2,13	0,012
Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)	30	1,5861	0,05287	1,13	0,311
Error	144	6,7464	0,04685		
Total	215	16,3338			

Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)	N	Mean	Grouping
40	72	1,31251	A
50	72	1,23254	A B
30	72	1,17390	B

Means that do not share a letter are significantly different

Tukey Pairwise Comparisons: Konsentrasi (ppm)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Konsentrasi (ppm)	N	Mean	Grouping
0,5	54	1,33202	A
0,25	54	1,28970	A
0,125	54	1,23980	A
1	54	1,09709	B

Means that do not share a letter are significantly different

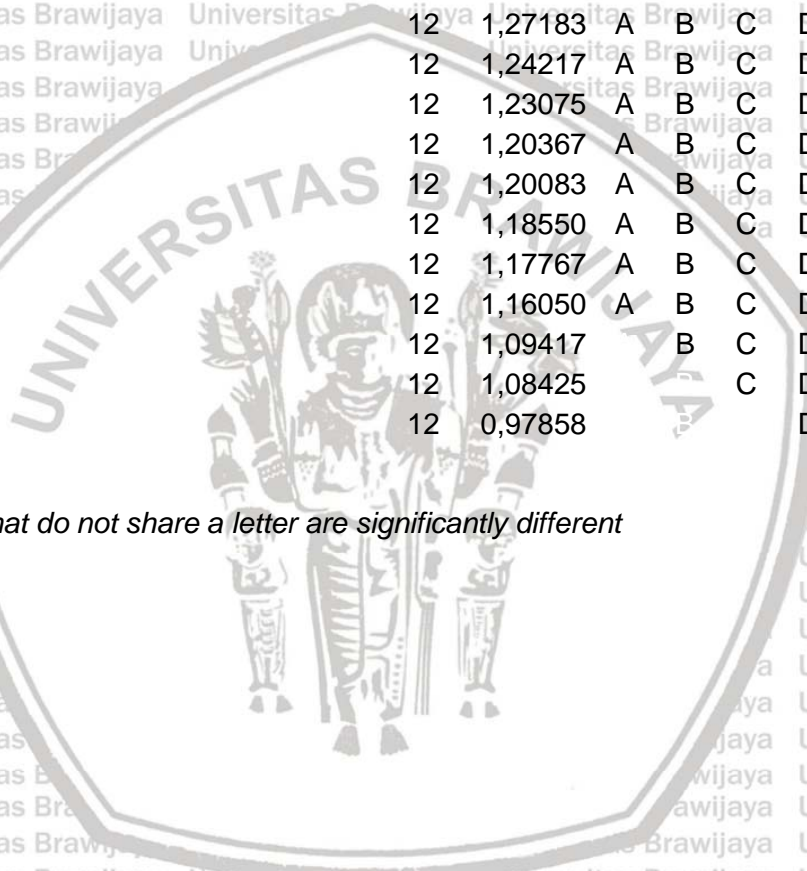
Tukey Pairwise Comparisons: Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Suhu Pemanasan (°C)*Lama Waktu Pemanasan (menit)

	N	Mean	Grouping			
40 10	12	1,42967	A			
30 20	12	1,40025	A	B		
50 10	12	1,38808	A	B	C	
40 25	12	1,35658	A	B	C	
40 30	12	1,33758	A	B	C	
40 5	12	1,29392	A	B	C	
50 5	12	1,27775	A	B	C	D
40 15	12	1,27183	A	B	C	D
30 30	12	1,24217	A	B	C	D
50 25	12	1,23075	A	B	C	D
50 15	12	1,20367	A	B	C	D
50 20	12	1,20083	A	B	C	D
40 20	12	1,18550	A	B	C	D
30 15	12	1,17767	A	B	C	D
30 25	12	1,16050	A	B	C	D
50 30	12	1,09417	B	C	D	
30 5	12	1,08425		C	D	
30 10	12	0,97858			D	

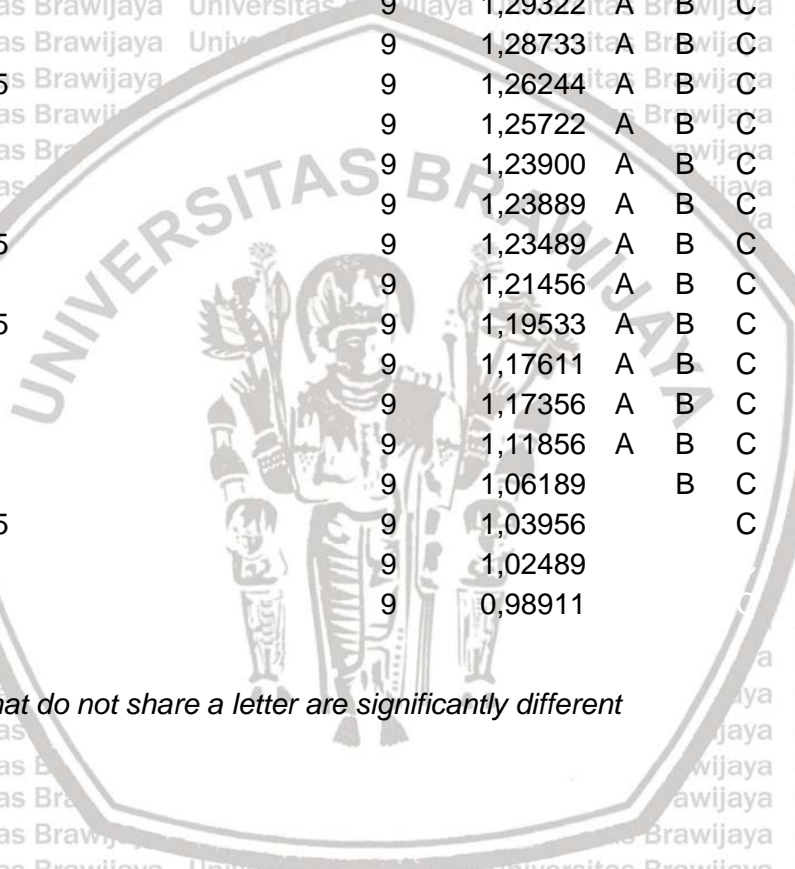
Means that do not share a letter are significantly different



Tukey Pairwise Comparisons: Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)
 Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Lama Waktu Pemanasan (menit)*Konsentrasi (ppm)	N	Mean	Grouping
20 0,5	9	1,44167	A
30 0,5	9	1,42567	A B
10 0,125	9	1,41267	A B C
15 0,5	9	1,35956	A B C D
5 0,25	9	1,35256	A B C D
10 0,25	9	1,33689	A B C D
25 0,25	9	1,32222	A B C D
5 0,125	9	1,29389	A B C D
20 0,25	9	1,29322	A B C D
10 0,5	9	1,28733	A B C D
25 0,125	9	1,26244	A B C D
15 0,25	9	1,25722	A B C D
5 0,5	9	1,23900	A B C D
25 0,5	9	1,23889	A B C D
30 0,125	9	1,23489	A B C D
15 1	9	1,21456	A B C D
20 0,125	9	1,19533	A B C D
30 0,25	9	1,17611	A B C D
25 1	9	1,17356	A B C D
20 1	9	1,11856	A B C D
30 1	9	1,06189	B C D
15 0,125	9	1,03956	C D
10 1	9	1,02489	D
5 1	9	0,98911	D

Means that do not share a letter are significantly different



Lampiran 7. Dokumentasi Hasil Penelitian

1. Uji Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar* Bakteri *Bacillus cereus*

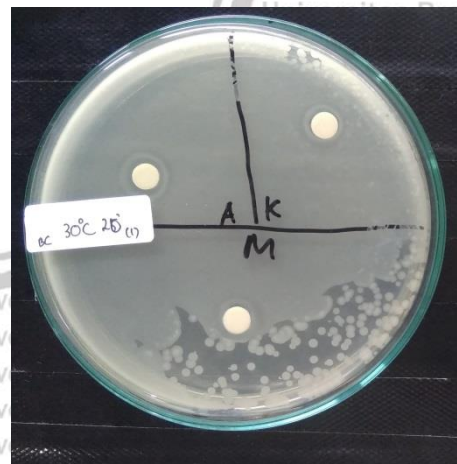
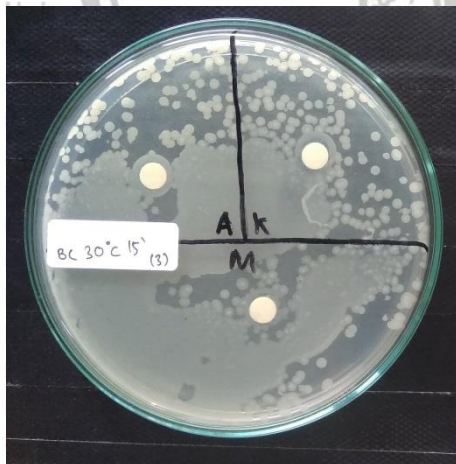
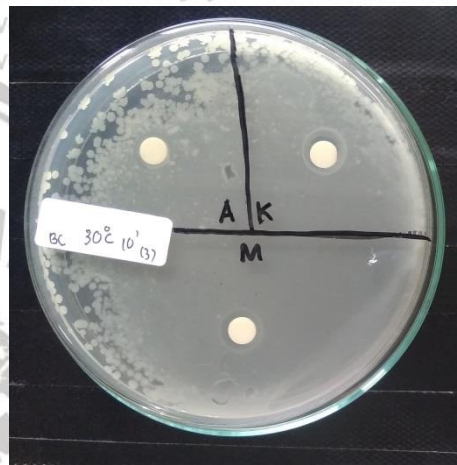
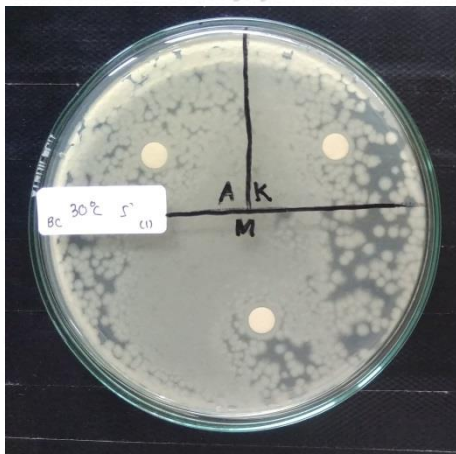
Keterangan Gambar

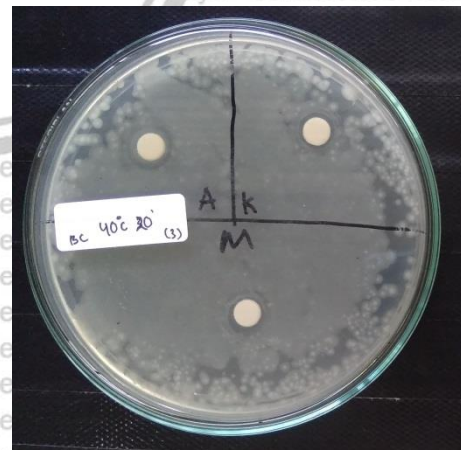
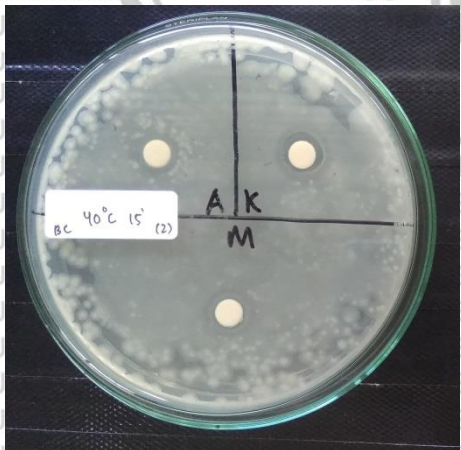
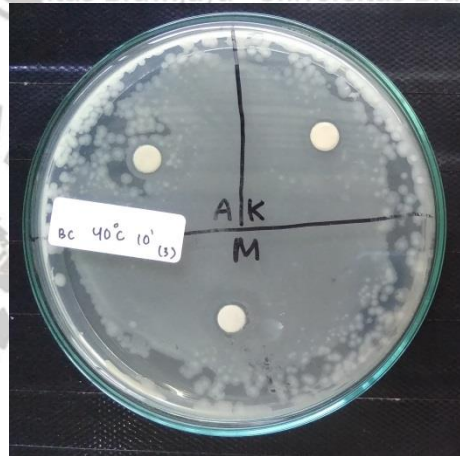
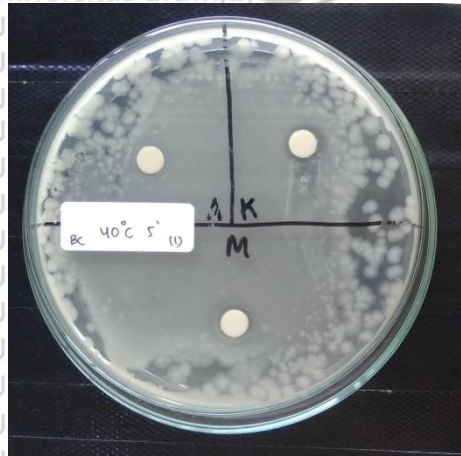
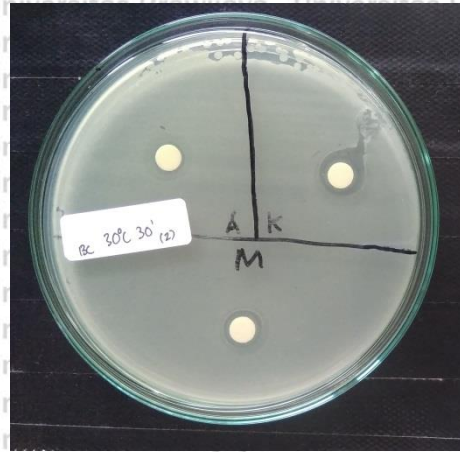
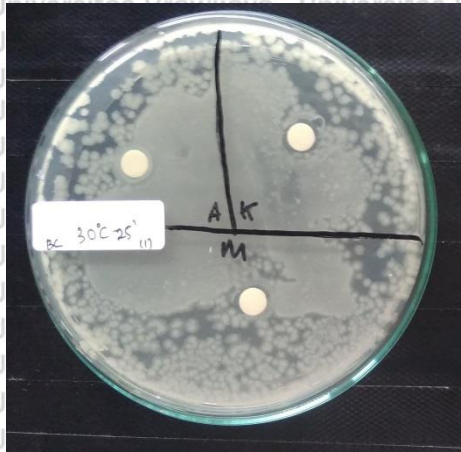
A = perlakuan kontrol negatif dengan aquades

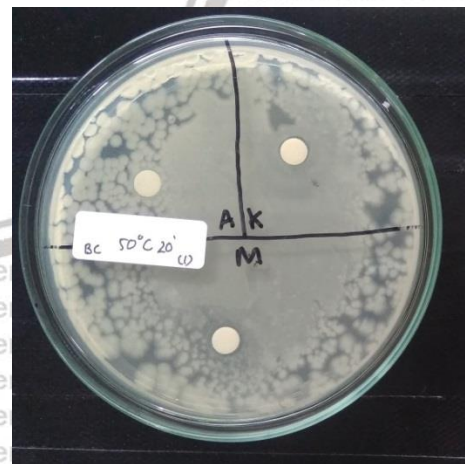
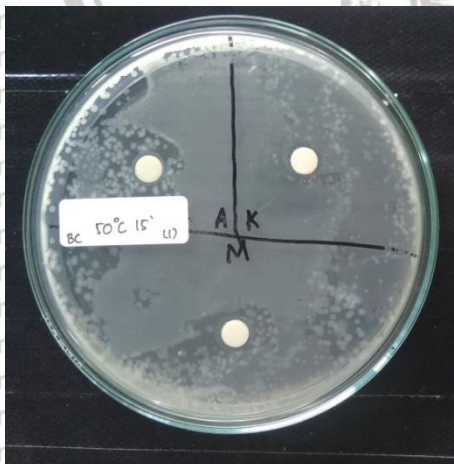
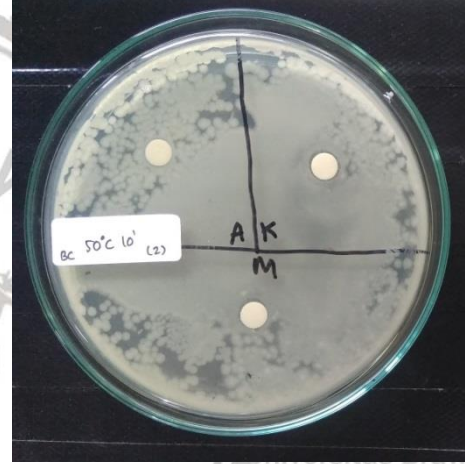
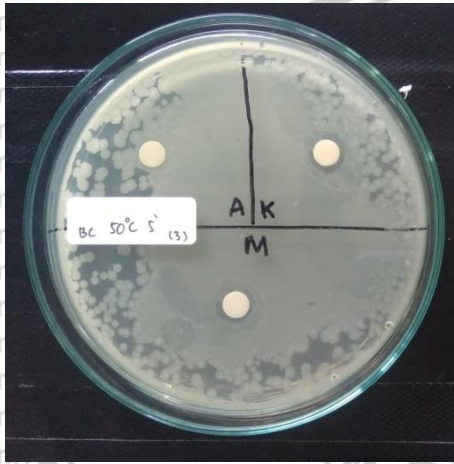
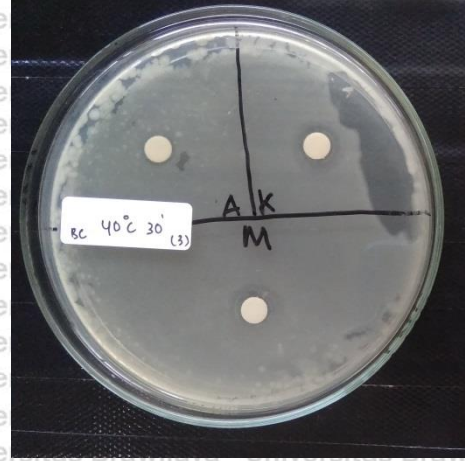
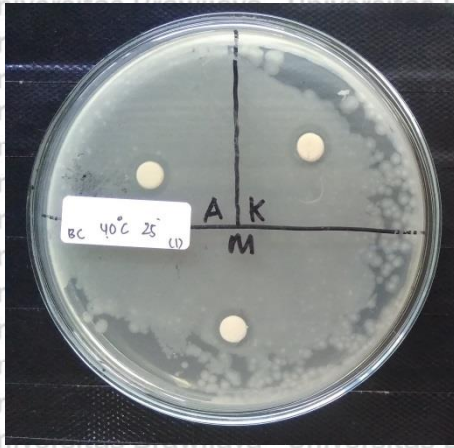
K = perlakuan kontrol positif dengan kloramfenikol 1000 ppm

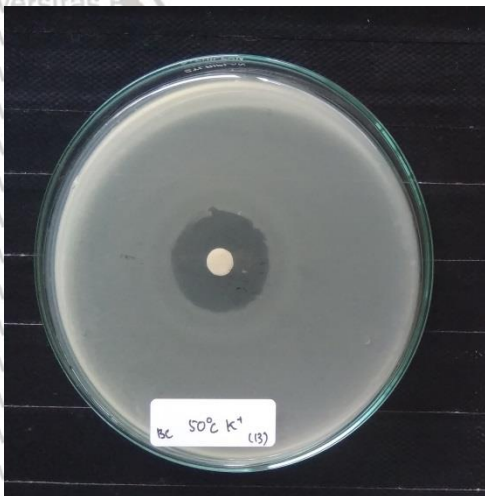
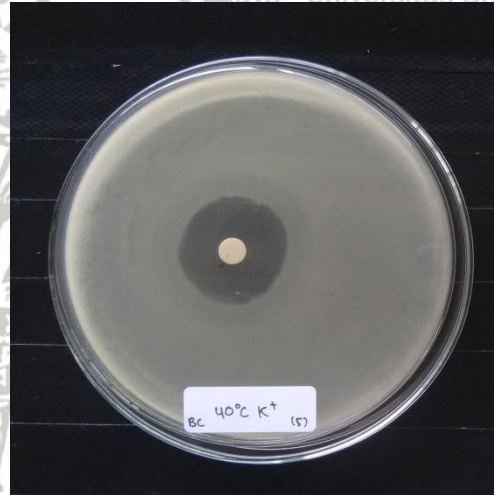
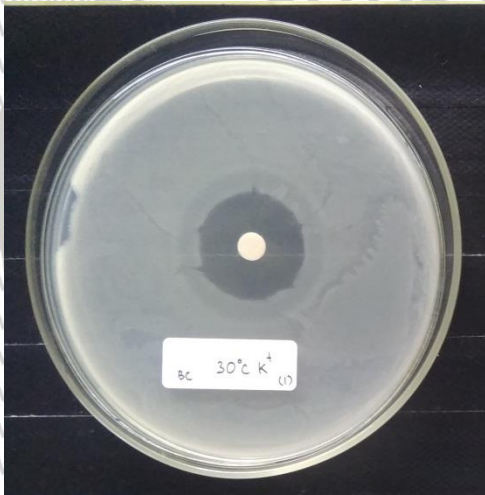
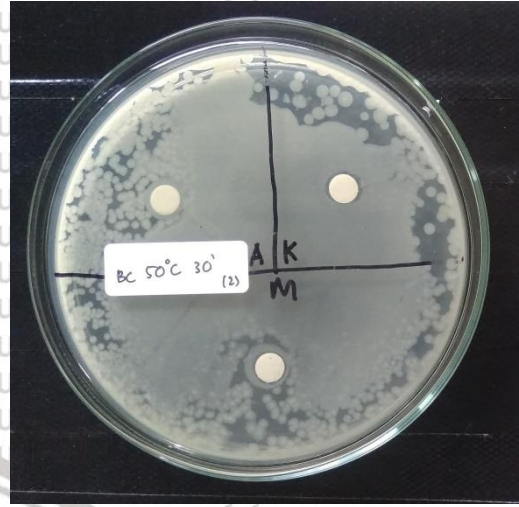
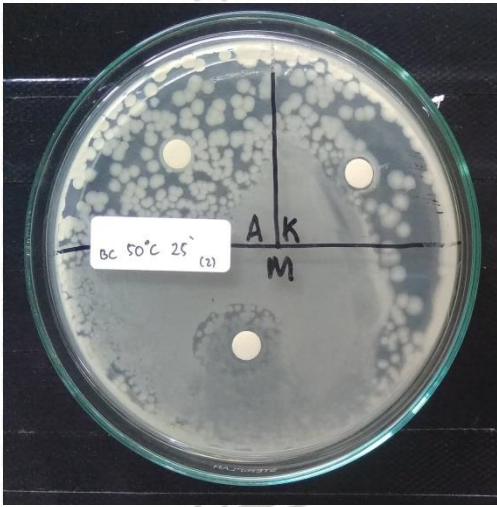
M = perlakuan sampel *marennine* sesuai faktor

BC = *Bacillus cereus*









2. Uji Antibakteri Metode *Disk Diffusion Agar* Bakteri *Vibrio alginolyticus*

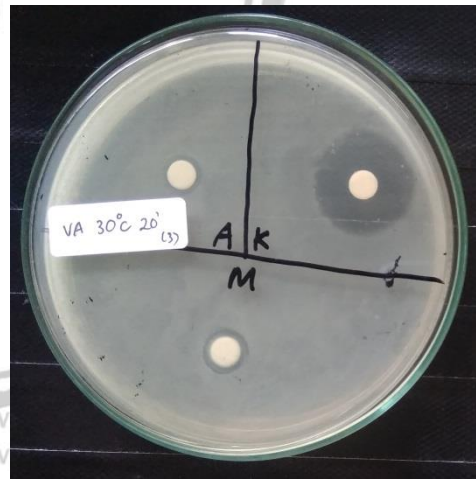
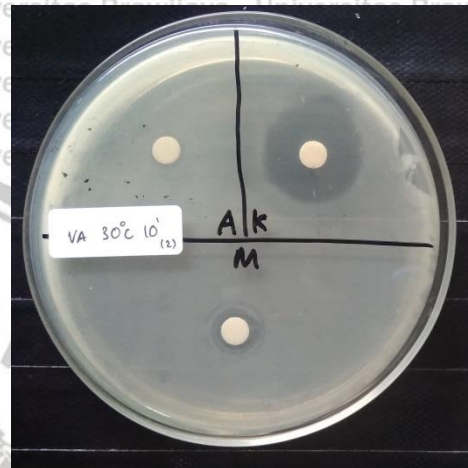
Keterangan Gambar

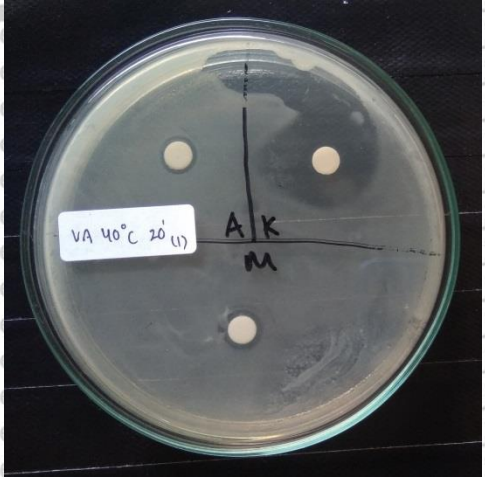
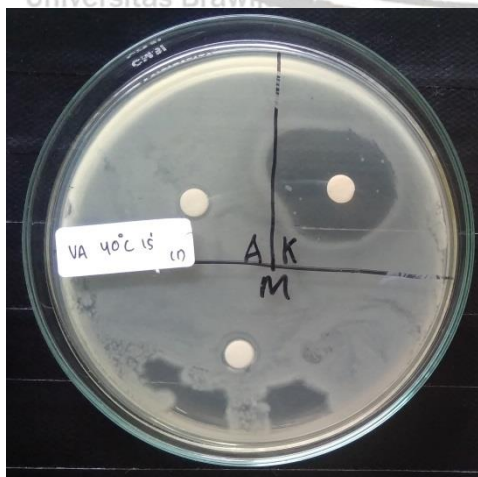
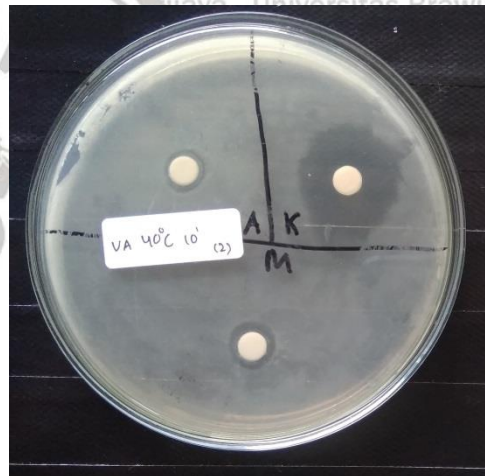
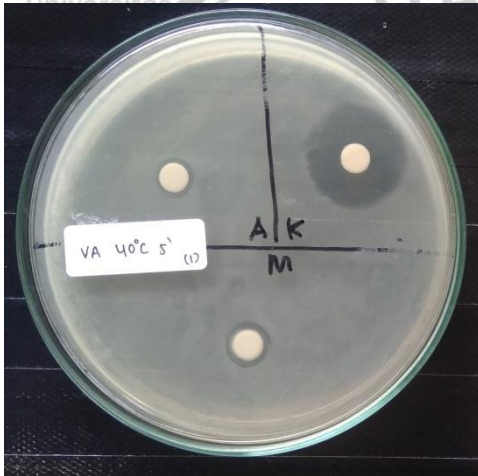
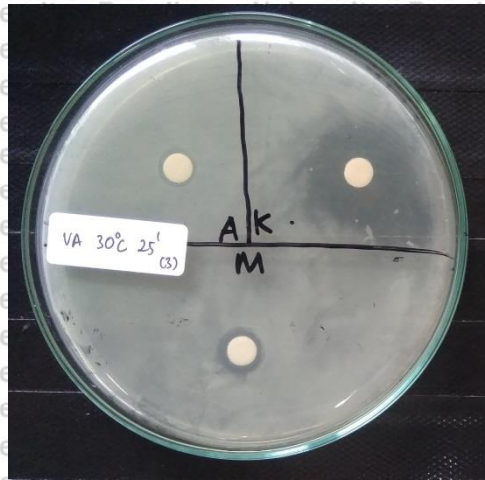
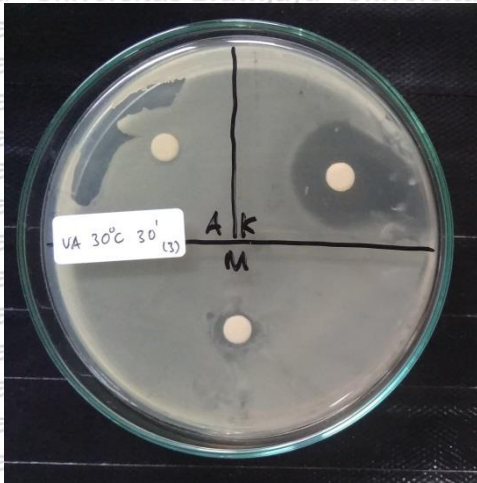
A = perlakuan kontrol negatif dengan aquades

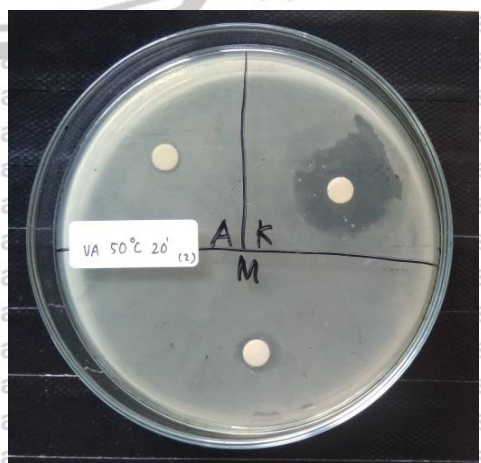
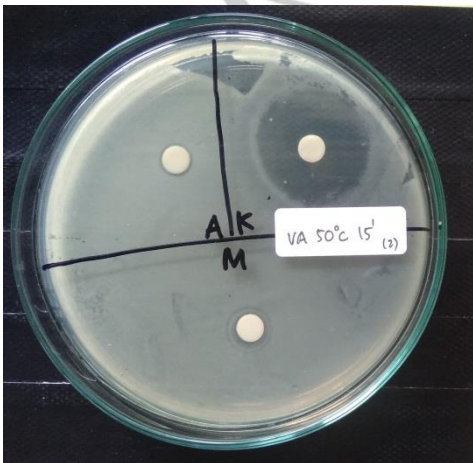
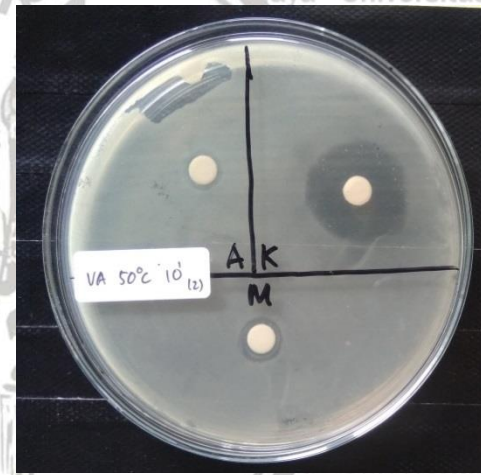
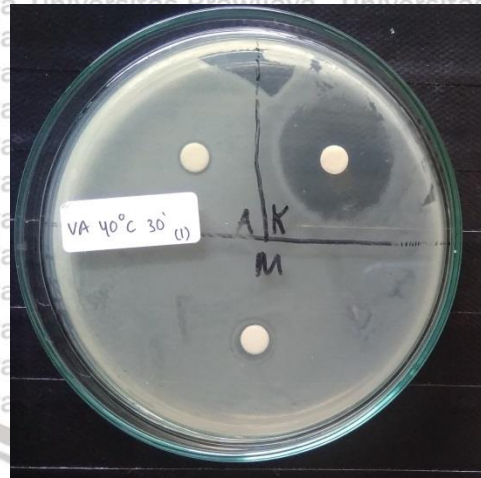
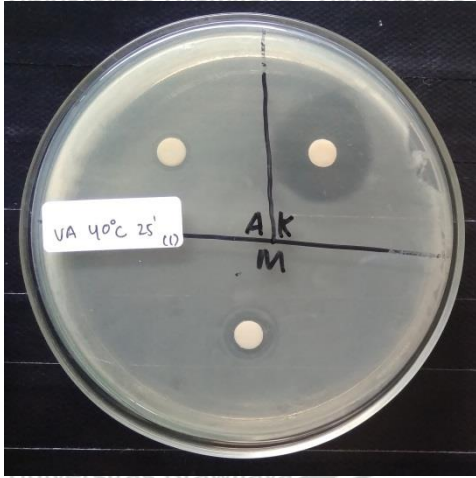
K = perlakuan kontrol positif dengan kloramfenikol 1000 ppm

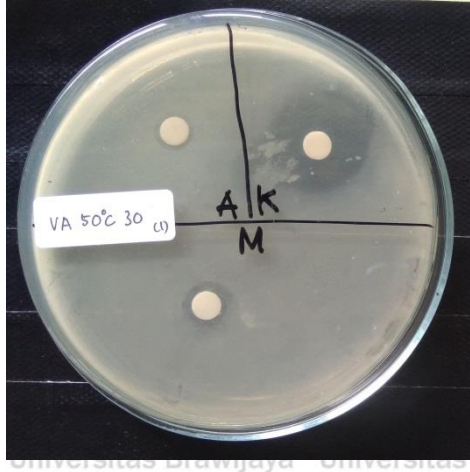
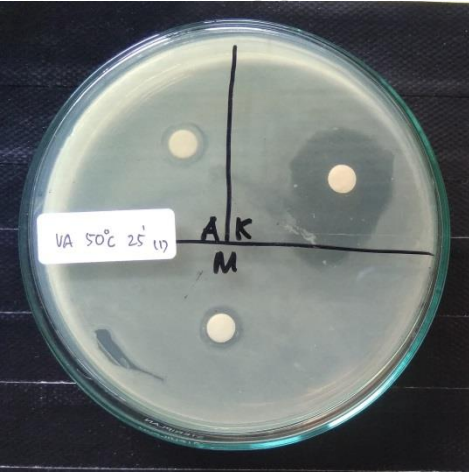
M = perlakuan sampel *marennine* sesuai faktor

VA = *Vibrio alginolyticus*







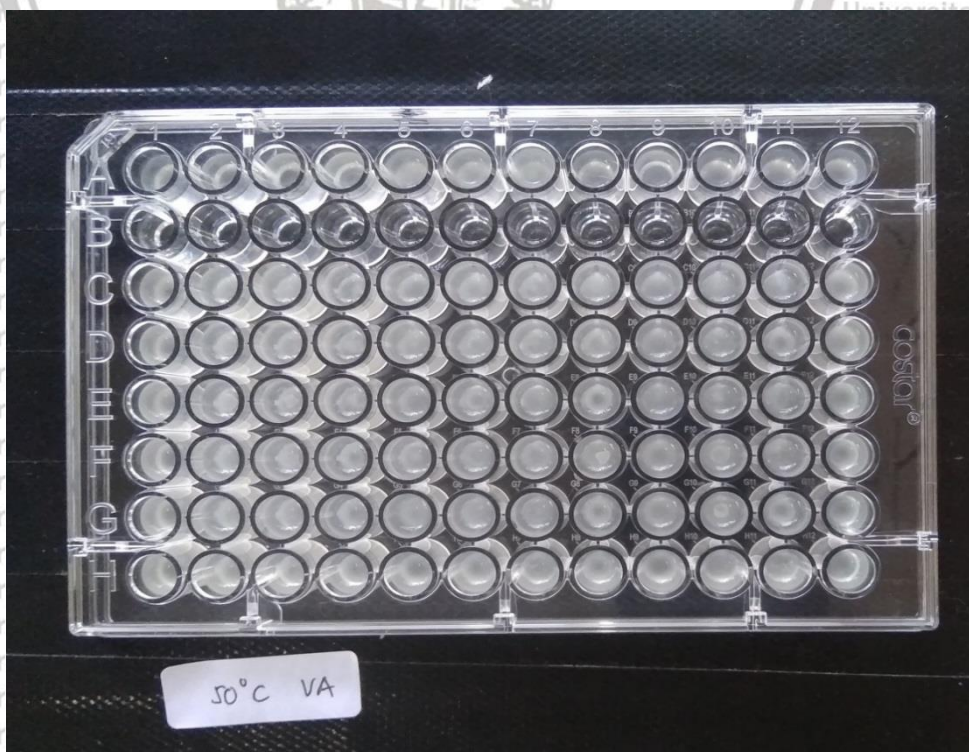
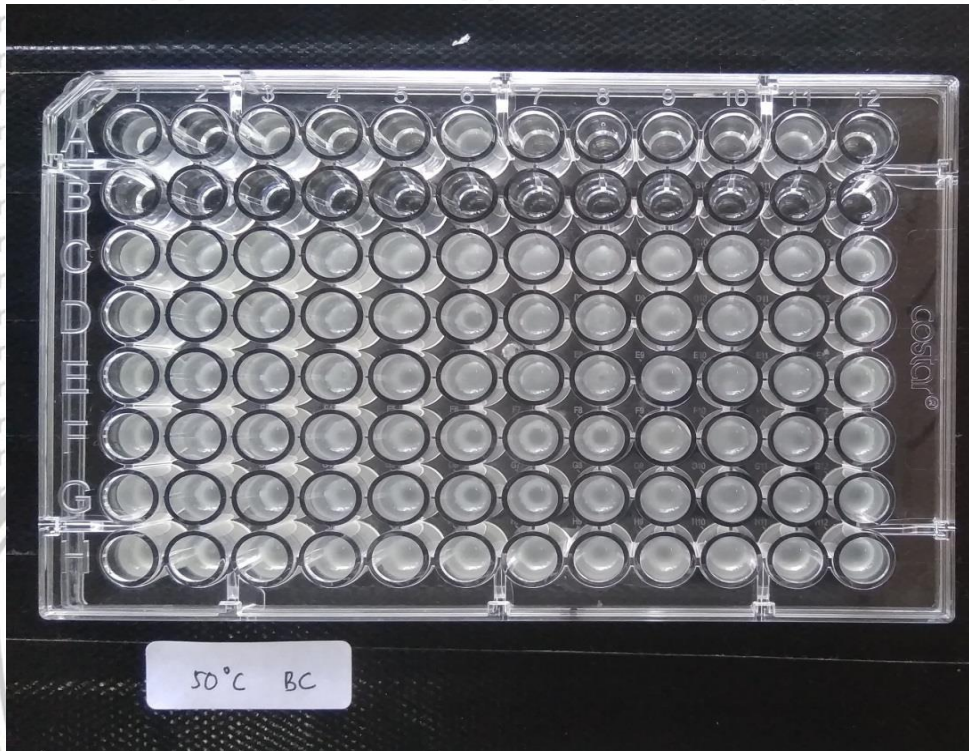


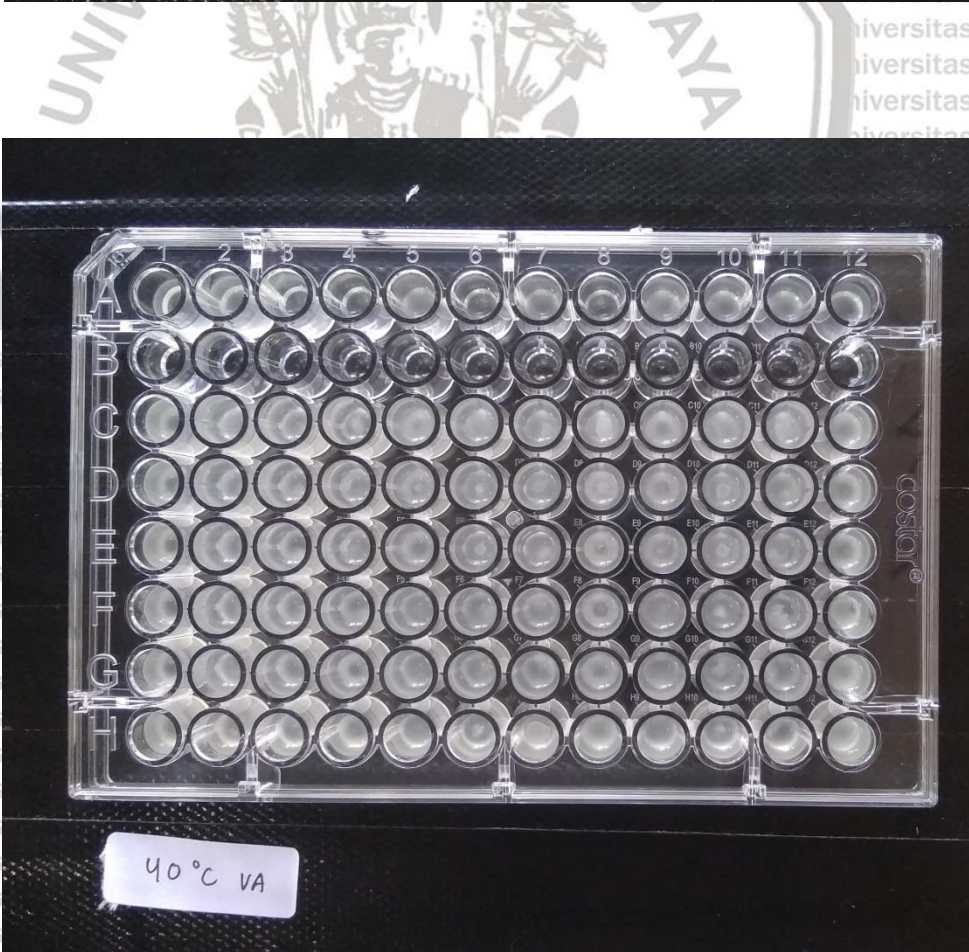
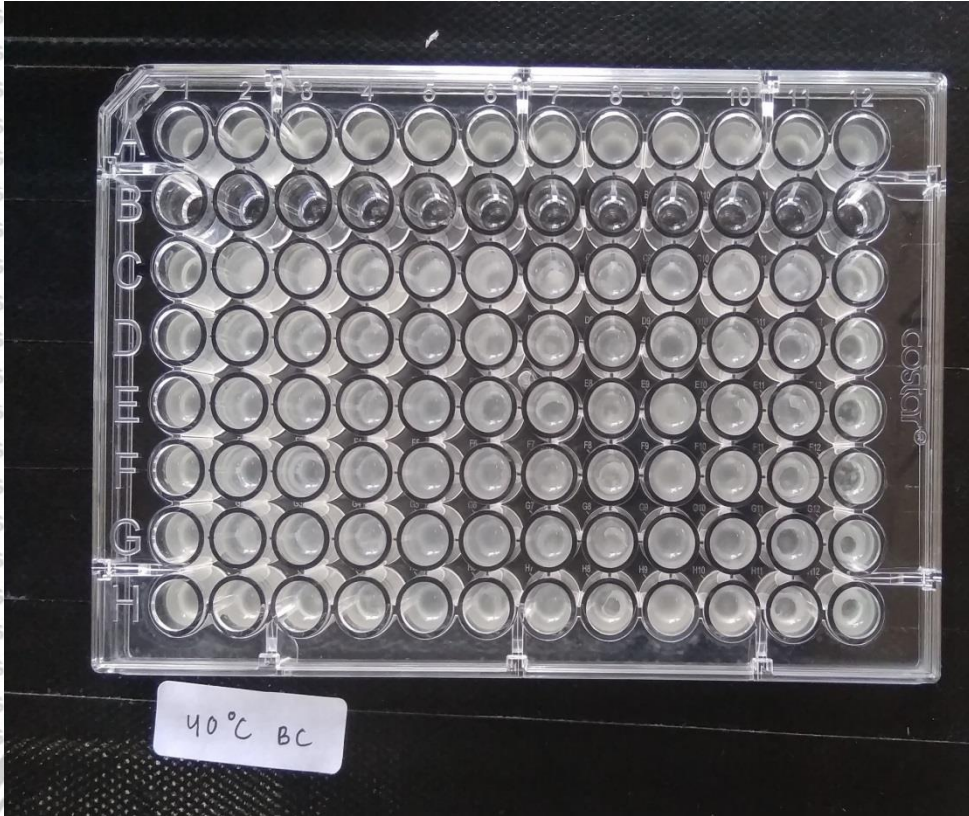
3. Uji MIC pada Bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

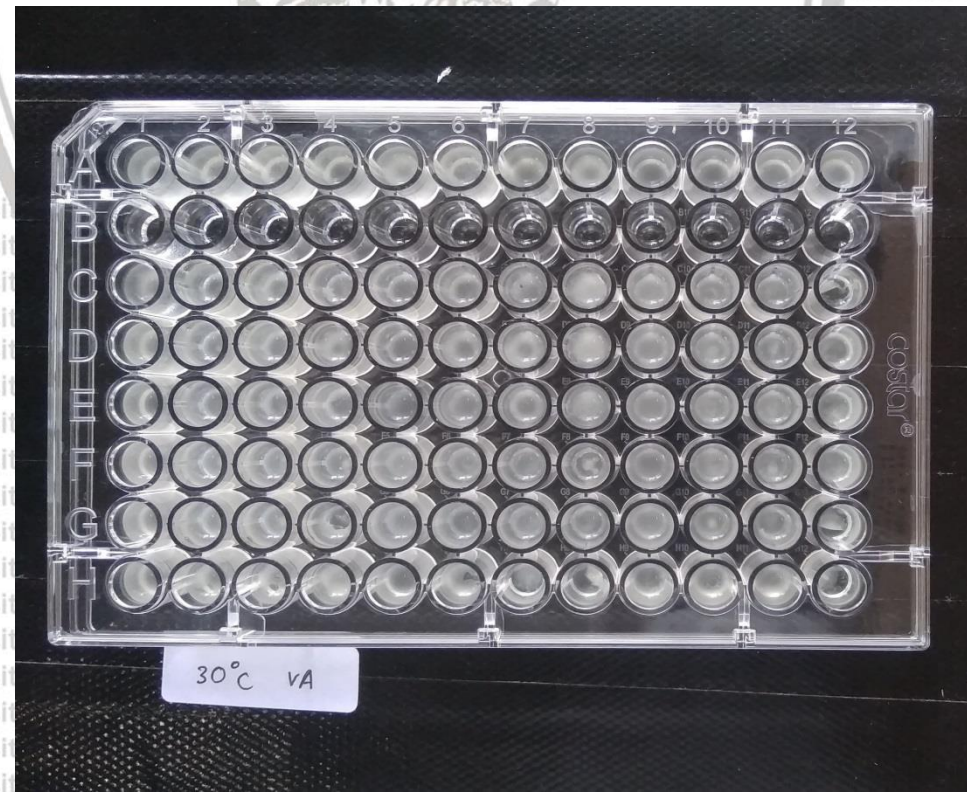
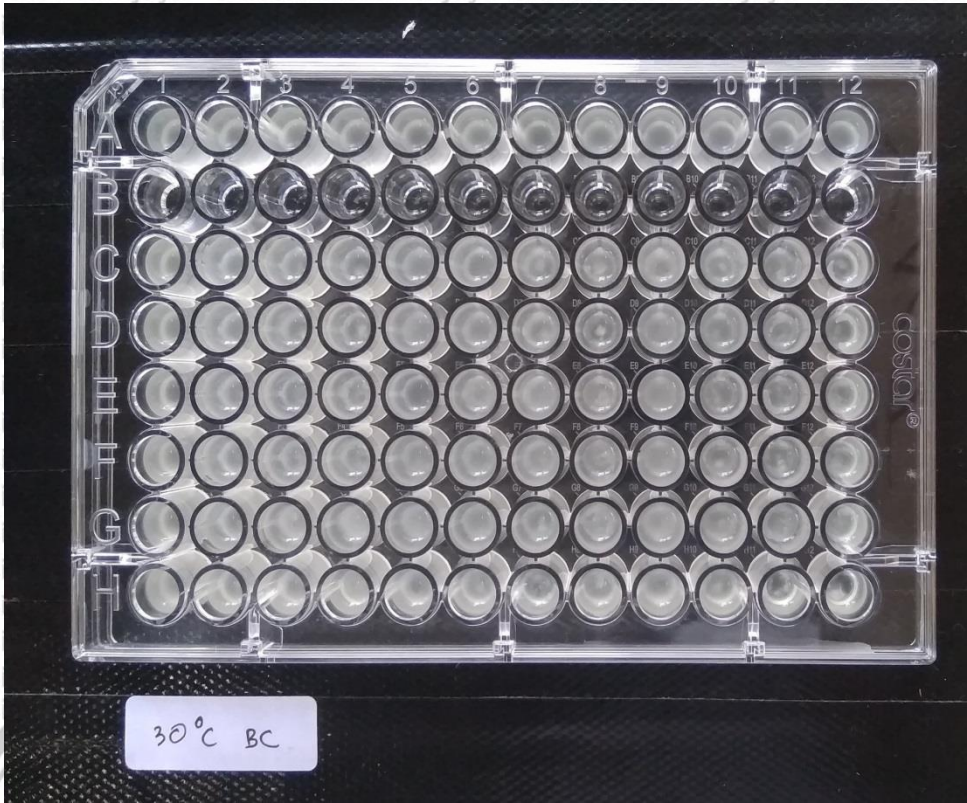
Keterangan Gambar

BC = *Bacillus cereus*

VA = *Vibrio alginolyticus*







4. Uji MBC pada Bakteri *Bacillus cereus* dan *Vibrio alginolyticus*

Keterangan Gambar

BC = *Bacillus cereus*

VA = *Vibrio alginolyticus*

K⁺ = perlakuan kontrol positif dengan kloramfenikol 1000 ppm

K⁻ = perlakuan kontrol negatif dengan *marennine* (tanpa perlakuan)

S = perlakuan sampel *marennine* sesuai faktor

