KONSENTRASI HAMBATAN MINIMUM EKSTRAK *Chlorella* sp. TERHADAP BAKTERI DAN KAPANG*

Iriani Setyaningsih [1], Desniar [2] dan Tresna Sriwardani [3]

Abstrak

Penelitian ini bertujuan untuk mengekstrak antimikroba intraseluler dari mikroalga jenis *Chlorella* sp. dan menentukan konsentrasi hambatan minimumnya pada bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* serta kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. Tahapan penelitian meliputi kultivasi, ekstraksi antimikroba dan uji aktivitasnya terhadap bakteri dan kapang serta penentuan konsentrasi hambatan minimum. *Chlorella* sp. dikultur dalam medium PHM, yang dilengkapi dengan aerator dan lampu neon sebagai sumber cahaya. Ekstraksi antimikroba dilakukan terhadap sel biomassa yang dipanen pada hari ke-40. Biomassa yang diperoleh sebesar 53,85 gram. Konsentrasi hambatan minimum dari esktrak intraseluler *Chlorella* sp. dalam menhambat *Salmonella typhi* adalah 500 ppm dan potensi hambatan terhadap streptomycin sebesar 40 %, konsentrasi hambatan minimum ekstrak terhapad *E. coli* adalah 250 ppm dan potensi hambatan terhadap streptomycin adalah 46,2 %. Akan tetapi ekstrak yang dihasilkan tidak dapat menghambat pertumbuhan kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp.sampai pada konsentrasi 3000 ppm.

Key words : Bakteri, chlorella, hambatan minimum.

PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan produsen alami dari ekosistem perairan yang dapat menghasilkan energi. Selain itu mikroalga juga dapat menghasilkan metabolit yang sangat bermanfaat, sehingga keberadaannya sebagai organisme hidup yang berukuran mikroskopis sudah mulai banyak dikaji. Pemanfaatan mikroalga pada saat ini sudah cukup berkembang, selain sebagai pakan alami dan makanan sehat, mikroalga juga memiliki potensi yang dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya. Salah satu jenis mikroalga yang potensial untuk dikembangkan adalah *Chlorella* sp., yang mana telah diproduksi untuk pangan sehat sebagai sumber protein, vitamin, dan mineral. Selain itu juga dapat menghasilkan komponen bioaktif untuk bahan farmasi, kedokteran, industri pangan dan sebagainya (Metting dan Pyne, 1986).

Salah satu jenis komponen aktif dari *Chlorella* sp. berupa senyawa antibakteri yang merupakan hasil metabolit sekunder. Metabolit sekunder merupakan bahan hasil metabolisme suatu organisme yang tidak diperlukan oleh

*Makalah telah disampaikan pada Seminar Persada pada tahun 2001

[1] Staff Pengajar Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB
[2] Staff Pengajar Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB
[3] Alumni Departemen Teknologi Hasil Perairan FPIK IPB

organisme tersebut untuk kelangsungan hidupnya (Bains, 1995). Bahan antibakteri tersebut merupakan campuran asam lemak yang disebut chlorellin yang memperlihatkan aktivitas antibakteri dan autotoksin. Autotoksin adalah bahan yang dihasilkan oleh suatu organisme yang bersifat toksik dan mempunyai efek menghambat pertumbuhannya sendiri (Metting dan Pyne, 1986).

Efektivitas senyawa antimikroba dapat dilihat pada pengujian antimikroba dengan menentukan konsentrasi terkecil agar pertumbuhan organisme uji dapat terhambat. Pengujian antimikroba dengan menentukan konsentrasi terkecil dilakukan dengan metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Metode MIC ini terdiri dari dua teknik, yaitu teknik tabung pengenceran dan teknik difusi agar (Middelbeek dan Drijver de Haas, 1992).

Kriteria zat ideal yang digunakan sebagai zat antimikroba adalah aktivitasnya yang cukup luas, tidak bersifat racun, ekonomis, sebaiknya bersifat membunuh daripada hanya menghambat pertumbuhan mikroba (Pelczar dan Chan, 1988). Keadaan-keadaan yang dapat mempengaruhi kerja antimikroba antara lain konsentrasi antimikroba yang digunakan, jumlah mikroorganisme, suhu dan waktu kontak, spesies atau jenis mikroorganisme, keberadaan bahan organik dan pH (Frazier dan Wessthof, 1988). Cara kerja zat antimikroba pada organisme, yaitu dengan merusak dinding sel, merubah permeabilitas dinding sel, merubah molekul protein dan asam nukleat serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Pelczar dan Chan, 1988)

Antimikroba yang dihasilkan oleh *Chlorella* termasuk antimikroba alami, yang mempunyai kelebihan antara lain lebih aman penggunaannya, kultivasi *Chlorella* sp relatif mudah, tidak membutuhkan tempat yang luas, tidak tergantung musim sehingga kontinuitasnya dapat terjaga.

Beberapa hasil penelitian menyatakan bahwa komponen *algisidal allelopatik* yang dihasilkan oleh mikroalga mempunyai fungsi sebagai autoinhibitor. Salah satu jenis mikroalga yang menghasilkan senyawa aktif bersifat autoinhibitor adalah *Chlorella vulgaris*. Senyawa tersebut merupakan produk metabolisme sel yang disekresikan dan diakumulasi ke medium yang mempunyai efek menghambat pertumbuhan mikroalga sendiri dalam kultur sehingga pertumbuhan sel mikroalga menurun. Pembentukan *autoinhibitor* terjadi karena adanya perubahan kondisi lingkungan (kultur), seperti pH dan konsentrasi nutrient, yang menyebabkan pembentukan senyawa *allelopatik* (Metting dan Pyne, 1986). *Allelopatik* merupakan gejala kemampuan tumbuhan mengeluarkan zat untuk mematikan tumbuhan atau tanaman penting di sekitarnya dalam mengamankan kelangsungan hidupnya

Penggunaan antimikroba ini diharapkan dapat menanggulangi keberadaan mikroba patogen yang sering mengkontaminasi bahan pangan. Akan tetapi konsentrasi terkecil dalam menghambat atau membunuh mikroba patogen belum diketahui, sehingga perlu dilakukan penelitian dalam menentukan konsentrasi hambatan minimum dari ekstrak *Chlorella* sp. terhadap beberapa mikroba patogen.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah mikroalga air tawar *Chlorella* sp. Kultivasi dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Hasil Perikanan, Departemen Teknologi Hasil Perikanan, FPIK-IPB. Bakteri yang digunakan untuk uji aktivitas hambatan adalah *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*, serta kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. Bahan-bahan lain yang digunakan meliputi medium PHM, kloroform, *Nutrient agar*, *Potato dextrose agar*, *Dimethylsulfoxida*, *paper disc*, *streptomycin*, dan kertas saring.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi alat-alat untuk kultivasi mikroalga (erlenmeyer, aerator, lampu dan sebagainya), alat untuk ekstraksi antimikroba (*sentrifus, freezer, refrigerator, freeze dryer* dan sebagainya), alat-alat untuk uji aktivitas antimikroba, (cawan petri, tabung reaksi, pipet volumetrik, mikropipet, *ruang laminar flow, autoclaf* dan sebagainya) serta alat-alat penunjang lainnya.

Metode penelitian

Penelitian ini meliputi beberapa tahap antara lain kultivasi, ekstraksi dan uji aktivitas antimikroba.

1. Kultivasi *Chlorella* sp

   Chlorella sp. ditumbuhkan pada erlenmeyer 1000 ml yang berisi medium PHM, yang dilengkapi dengan aerasi dan lampu sebagai sumber cahaya. Kultivasi dilakukan pada suhu kamar. Selanjutnya biakan dikultur pada skala lebih besar dengan menggunakan botol berkapasitas sekitar 20 liter.

2. Ekstraksi senyawa antimikroba dari *Chlorella* sp.

   Chlorella sp. yang akan diekstrak antimikrobanya dipanen pada fase stasioner. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Trianti (1998), yaitu aktivitas bahan antimikroba dari mikroalga *Chlorella* sp. yang paling baik terhadap bakteri yang diujikan adalah ekstrak *Cholrella* sp. yang dipanen pada fase tengah stasioner. Metode ekstraksi bahan antimikroba dilakukan berdasarkan modifikasi metode yang digunakan oleh Naviner *et al*. (1999).

   Hasil panen *Chlorella* sp dipisahkan dengan menggunakan sentrifus, kemudian disaring dengan kertas saring Whatman untuk memisahkan biomasa dan supernatan. Selanjutnya biomasa dikeringkan dengan menggunakan *freeze dryer*, sehingga diperoleh biomasa *Chlorella* sp kering. Kemudian ditambah dengan kloroform dengan perbandingan 1:25 dan dilanjutkan dengan sonikasi. Supernatan yang diperoleh dihilangkan pelarutnya dan hasil yang diperoleh merupakan ekstrak kasar untuk dilakukan tahap uji aktivitas terhadap bakteri dan kapang.

3. Uji aktivitas antimikroba

   Pada uji aktivitas ekstrak *Chlorella* sp. terhadap bakteri digunakan medium *Nutrient agar*, sedangkan untuk kapang digunakan *Potato dextrose agar*. Sampel yang akan diujikan terlebih dahulu dilarutkan dalam DMSO. Konsentrasi ekstrak antimikroba yang akan diujikan pada bakteri adalah 25, 50, 100, 250, 500 dan 700 ppm, sedangkan yang akan diujikan pada kapang adalah 2000, 2500 dan 3000 ppm. Bakteri yang akan dujikan adalah *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*, sedangkan jenis kapang yang akan diujikan adalah *Aspergillus niger* dan *Penicillium.* Sebagai kontrol positif digunakan *streptomycin*.

   Aktivitas antimikroba berupa antibakteri dan antifungi ditentukan dengan mengukur diameter hambatan yang terbentuk, yaitu daerah bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang telah ditetesi ekstrak. Kemudian dicari konsentrasi terkecil yang masih mempunyai hambatan sebagai konsentrasi minimum inhibisi yang mempunyai kepekaan terhadap mikroba. Suatu antimikroba dikatakan mempunyai aktivitas yang tinggi terhadap mikroba apabila nilai konsentrasi minimum hambatannya rendah tetapi mempunyai daya hambat yang besar (Hayati, 1999).

Perhitungan hasil pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter hambatan senyawa yang diperiksa dibandingkan dengan diameter hambatan senyawa standar pada konsentrasi yang sama (Sherley, 1998).

$$\text{Potensi} = \frac{\text{Diameter hambatan senyawa antimikroba}}{\text{Diameter senyawa baku dengan konsentrasi sama}} \times 100\ \%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

1. Kultivasi mikroalga *Chlorella* sp.

Selama kultivasi *Chlorella* sp. menggunakan suhu ruangan yang berkisar antara (27–29) ^{o}C. Kondisi temperatur tersebut merupakan kisaran temperatur yang baik untuk pertumbuhan mikroalga termasuk *Chlorella* sp., karena untuk pertumbuhan mikroalga yang optimal digunakan temperature yang berkisar antara (15-30) ^{o}C (De La Noue dan De Pauw, 1988).

Selama kultivasi 40 hari kepadatan sel *Chlorella* sp. meningkat dari $4{,}75 \times 10^{5}$ sel/ml menjadi $1{,}52 \times 10^{7}$ sel/ml. Hal ini menunjukkan bahwa *Chlorella* sp. mempunyai kemampuan dalam melakukan pembelahan sel secara aktif pada kondisi yang disediakan. Warna kultur juga berubah dari hijau muda menjadi hijau tua, yang menunjukkan bahwa mikroalga melakukan aktivitasnya dalam mensintesa pigmen.

2.. Hasil ekstraksi antimikroba

Ekstraksi merupakan suatu proses penarikan komponen yang diinginkan dari suatu bahan. Panen mikroalga dilakukan pada fase stasioner, yaitu pada umur kultur 40 hari.

Supernatan dan biomasa dari hasil pemanenan dipisahkan dengan menggunakan sentrifus. Teknik pemisahan biomasa dengan menggunakan sentrifus merupakan salah satu cara pemisahan yang efisien, karena dapat memisahkan biomasa dengan supernatannya dengan lebih sempurna dan waktu yang relatif cepat. Pada penelitian ini ekstraksi antimikroba dilakukan pada biomasa sel *Chlorella* sp. Hal ini sesuai dengan pernyataan Stewart (1974) bahwa mikroalga memiliki suatu substansi organik yang berlimpah di dalam selnya yang disebut metabolit sekunder yang merupakan jenis intraseluler.

Penggunaan sonikasi dan kloroform dalam penelitian ini bertujuan untuk memecahkan sel sehingga bahan antimikroba yang diinginkan akan keluar dan komponen tersebut terikat serta larut dalam pelarut organik tersebut. Berat basah biomasa yang diperoleh setelah pemisahan dengan sentrifus sebesar 53,65 gram, setelah dilakukan pengeringan menjadi 1,53 gram, dan ekstrak yang dihasilkan sebesar 0,59 gram. Ekstrak yang diperoleh merupakan ekstrak kasar yang belum mengalami tahap pemurnian.

3. Hasil aktivitas ekstrak *Chlorella* sp. terhadap bakteri dan kapang

Aktivitas antibakteri ditentukan dengan mengukur diameter hambatan, yaitu daerah bening di sekitar kertas cakram. Jika diameter hambatan yang terbentuk lebih besar atau sama dengan 6 mm, maka bahan tersebut dikategorikan memiliki aktivitas sebagai antimikroba. Tapi bila diameter hambatan yang terbentuk lebih kecil dari 6 mm atau tidak terbentuk sama sekali maka bahan antimikroba tersebut dikategorikan tidak memiliki aktivitas sebagai antimikroba (Bell, 1984).

Ekstrak yang akan diuji dilarutkan dalam DMSO sesuai dengan konsentrasi yang ditentukan. Nilai diameter hambatan dan potensi hambatan sebagai hasil uji aktivitas ekstrak intraseluler terhadap bakteri *Salmonella typhi* disajikan pada Tabel 1, sedangkan terhadap *E. coli* disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas ekstrak *Chlorella* sp. terhadap *S. typhi.*

Konsentrasi ekstrak *Chlorella* (ppm)	*Salmonella typhi*				
	A	B		C	
	Diameter daerah hambatan (mm)		Potensi hambatan (%)	Diameter hambatan (mm)	Potensi hambatan (%)
700	16	7	43.7	7	43,7
500	15	6	40	6	40
250	14	5	35,7	5	35.7
100	12	4	33,3	4	33,3
50	7	1	14,3	1	14,3
25	5	0	0	0	0

Keterangan : A = streptomycin
B dan C = ekstrak *Chlorella* sp.

Sumber : Sriwardani (2000)

Hasil uji aktivitas dari ekstrak *Chlorella* sp. menunjukkan bahwa ekstrak tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi.* Pada konsentrasi 700 ppm memiliki diameter hambatan ekstrak dan streptomycin berturut-turut 7 mm dan 16 mm dengan potensi hambatan 43,7 %, pada konsentrasi ekstrak 500 ppm daerah hambatannya 6 mm dan 15 mm dengan potensi hambatan sebesar 40 %. Akan tetapi pada konsentrasi ekstrak lebih rendah, daerah hambatannya lebih kecil dari 6 mm.

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas ekstrak *Chlorella* sp. yang diperoleh dapat dikatakan bahwa konsentrasi hamabatan minimum ekstrak tersebut adalah 500 ppm, dan konsentrasi ekstrak 700 ppm mempunyai daya hambat yang relatif sama dengan konsentrasi streptomycin 50 ppm, dengan diameter hambatan 7 mm.

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas ekstrak *Chlorella* sp terhadap *E. coli*

Konsentrasi ekstrak *Chlorella* (ppm)	*Escherichia coli*				
	A	B		C	
	Diameter daerah hambatan (mm)		Potensi hambatan (%)	Diameter hambatan (mm)	Potensi hambatan (%)
700	18	11	61,1	11	61,1
500	16	9	56.3	9	56.3
250	13	6	46,2	6	46,2
100	12	4	33,3	4	33,3
50	9	2	22,2	2	22,2
25	6	1	16,7	1	16,7

Sumber : Sriwardani (2000)

Hasil uji aktivitas ekstrak *Chlorella* sp terhadap *E. coli* menunjukkan bahwa adanya penghambatan pertumbuhan bakteri. Aktivitas hambatan terhadap *E.coli* terjadi pada konsentrasi ekstrak sebesar 700, 500 dan 250 ppm dengan diameter hambatan 11, 9 dan 6 mm serta potensi hambatan terhadap streptomycin sebesar 61,1 %, 56,3 % dan 46,2 %. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat dikatakan bahwa konsentrasi hambatan minimum dari ekstrak *Chlorella* sp. terhadap *E. coli* adalah 250 ppm. Selain itu juga dapat dikatakan bahwa konsentrasi ekstrak sebesar 500 ppm mempunyai daya hambat relative sama dengan konsentrasi streptomycin 50 ppm dengan diameter hambatan 9 mm, sedangkan konsentrasi ekstrak 250 ppm relative sama dengan streptomycin 25 ppm dengan diameter hambatan 25 ppm

Hasil uji aktivitas ekstrak *Chlorella* sp terhadap kapang *Aspergillus niger* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3000, 2500 dan 2000 ppm tidak menghasilkan daerah hambatan. Demikian juga hasil uji terhadap *Penicillium* sp yang menunjukkan bahwa ekstrak *Chlorella* sp. tidak dapat menghambat pertumbuhan kapang tersebut pada konsentrasi ekstrak yang diuji. Kecil hasil uji aktivitas ekstrak tersebut diduga karena ekstrak yang diperoleh masih merupakan ekstrak kasar, sehingga kurang optimal hasilnya.

KESIMPULAN DAN SARAN

Kesimpulan

Ekstrak intraseluler kasar *Chlorella* sp. mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* dengan konsentrasi hambatan minimum masing-masing 500 ppm dan 250 ppm serta mempunyai potensi hambatan terhadap streptomycin 40 % dan 46,2 %. Ekstrak *Chlorella* sp. yang diperoleh tidak mempunyai aktivitas hambatan terhadap kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp.

Saran

Hasil uji aktivitas ekstrak *Chlorella* sp. terhadap *Salmonella typhi* dan *E. coli* masih belum optimal, karena masih merupakan ekstrak kasar, sehingga perlu dilakukan pemurnian agar diperoleh ekstrak lebih murni dan lebih optimal aktivitasnya. Selain itu juga perlu dilakukan uji aktivitas pada spektrum bakteri yang lebih luas

DAFTAR PUSTAKA

Bains W. 1995. Biotechnology from A to Z. Oxford University Press. Oxford-New York-Tokyo

Bell, SM. 1984. Antibiotic sensitivity testing by CDS methods. Dalam Clinical Microbiology Up date Programme. The Prince of Wales Hospital, Randwick, N.S.W.

De La Noue J dan De Pauw N. 1988. The potential of microalgal biotechnology : A review of production and uses of microalgae. Journal of Biotechnology Advances. Vol 6. Pergemon Press. Britain

Hayati AP. 1999. Sintesis dan uji aktivitas biologi antibiotic 3-hidroksipikolinil serin oktil ester dan turunannya. [Tesis]. Magister Sains Ilmu Kimia. Progran Pascasarjana. Program studi Ilmu Kimia. Universitas Indonesia.

Metting B dan Pyne JW 1986. Biologically active compounds from microalgal. Journal of Enzyme Microb. Tech. Vol. 8. Butterworth and Co Publish.

Middelbeek EJ dan Drijver JS de Haas. 1992. In vitro cultivation of microorganism. Biotechnology by Opening Learning. Open University and Thames Polytechnic. Butterworth Heinemann.

Naviner M, Berge JP Durand P dan Lee Bris H. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against Aquacultural pathogens. Aquaculture 174 (1999): 15-24

Pelczar MJ dan Chan ECS. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 1 dan 2. Penterjemah Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS dan Angka SL. UI Press. Jakarta

Sherley. 1998. Sintesis dan uji aktivitas biologi senyawa analog antibiotic UK-3 (2-hidroksinikotinil-heksil-serin-ester dan turunannya). [Tesis] Magister Sains Ilmu Kimia. Program Pascasarjana. Program studi Ilmu Kimia. Universitas Indonesia.

Stewart DP. 1974. Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell Scientific Published. London

Trianti R. 1998. Ekstraksi dan uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Chlorella* sp. [Skripsi]. Program studi Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, IPB. Bogor.