

## PEMISAHAN EKSTRAK INTRASELULER DARI MIKROALGA *Nitzschia closterium* DAN PENENTUAN KONSENTRASI HAMBATAN MINIMUMNYA TERHADAP MIKROBA PATOGEN

Iriani Setyaningsih<sup>\*</sup>, Desniar<sup>\*\*</sup>, Lyli Pangagabean<sup>\*\*\*</sup> dan Titik Harsita Widyah<sup>\*\*\*</sup>

### Abstrak

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengekstrak antimikroba intraseluler dari *Nitzschia closterium*, menguji aktivitasnya dan menentukan konsentrasi hambatan minimumnya terhadap beberapa mikroba patogen. Kultivasi *Nitzschia closterium* dilakukan dalam f medium dengan kepadatan awal sel sebesar  $1,00 \times 10^4$  sel/ml dengan dilengkapi aerasi, lampu neon serta dilakukan pada suhu kamar. Fase eksponensial dicapai pada saat kultivasi awal sampai pada hari ke-7, fase penurunan laju pertumbuhan pada hari ke-8, fase stasioner pada hari ke-9 sampai hari ke-47, dan fase kematian dimulai pada hari ke-48. Pemisahan biomassa dilakukan dengan menggunakan sentrifus, selanjutnya dikeringkan dan ditambah pelarut metanol dan sel dipecah menggunakan soniprep. Kemudian disaring dan pelarutnya diuapkan sehingga diperoleh ekstrak kasar intraseluler. Hasil pengujian aktivitas menunjukkan bahwa ekstrak intraseluler dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan kapang *Penicillium* sp., tetapi tidak menghambat *Aspergillus niger*. Nilai konsentrasi hambatan minimum untuk *E. coli* dan *S. typhi* terjadi pada konsentrasi 2000 ppm dengan potensi hambatan masing-masing 30-40 % dan 29,41-35,29 %.

*Kata kunci:* *Nitzschia*, mikroalga, bahan aktif.

### PENDAHULUAN

Mikroalga merupakan salah satu biota perairan yang memiliki potensi sebagai penghasil bahan aktif dan bahan kimia yang bermanfaat untuk industri farmasi, kimia, kosmetik, pertanian dan lainnya. Namun di Indonesia, pemanfaatan mikroalga masih terbatas sebagai pakan alami.

Sejumlah peneliti menyatakan pendapatnya secara pasti bahwa beberapa spesies mikroalga menghasilkan metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain. Selain vitamin, asam amino, karbohidrat dan nutrien lainnya, mikroalga juga mengandung komponen aktif biologi yang didalamnya juga termasuk antibiotik, algasidal, racun, komponen aktif farmasi (antitumor, antikanker), komponen pemacu pertumbuhan.

Hellebust (1879) yang dikutip Stewart (1974) menyatakan bahwa mikroalga menghasilkan metabolit sekunder yang berlimpah dalam selnya, yang disebut dengan substansi intraseluler dan menghasilkan ekstraseluler yang disekresikan dari sel ke

<sup>\*</sup> Staf Pengajar Departemen Teknologi Hasil Perikanan FPIK - IPB

<sup>\*\*</sup> Staf Peneliti Puslitbang Oceanologi - LIPI

<sup>\*\*\*</sup> Alumnus Departemen Teknologi Hasil Perikanan FPIK - IPB

medium pertumbuhannya. Metabolit sekunder yang berupa karbon organik lebih banyak dihasilkan pada fase lag dan fase stasioner daripada fase log. Akan tetapi tidak setiap pada kondisi suatu metabolit dapat dihasilkan, tergantung pada pH, salinitas, kondisi aerob/anaerob, cahaya dan nutrien (Hellebust, 1979 yang dikutip Stewart, 1974).

Salah satu mikroalga yang memiliki potensi untuk menghasilkan antimikroba adalah *Nitzschia closterium*. Hasil penelitian Santioso (1998) menunjukkan bahwa *Nitzschia closterium* mengandung antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif (*Pseudomonas* sp. dan *Escherichia coli*) dan bakteri gram positif (*Bacillus subtilis*).

Senyawa antimikroba adalah senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Antimikroba sebagai substansi, dapat berupa senyawa kimia sintetik atau produk alami (Brock and Madigan, 1994).

Beberapa faktor yang mempengaruhi kerja dari senyawa antimikroba (antibakteri dan antifungal), antara lain konsentrasi antibakteri yang digunakan, jumlah dan spesies bakteri/kapang, suhu, keberadaan bahan organik lain, dan pH (Pelczar dan Chan, 1986).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk ekstraksi antimikroba intraseluler dari *Nitzschia closterium*, menguji aktivitas ekstrak intraseluler yang dihasilkan *Nitzschia closterium* terhadap beberapa patogen dan menentukan hambatan konsentrasi minimum ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* dalam menghambat pertumbuhan beberapa mikroba patogen.

## METODOLOGI

### Bahan dan alat

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Nitzschia closterium* yang diperoleh dari Puslitbang Oseanologi – LIPI, Jakarta. Medium yang digunakan untuk kultivasi adalah *f* medium dengan penambahan air laut. Sedangkan bahan untuk pengujian aktivitas antimikroba meliputi *nutrient broth*, *nutrient agar*, *potato dextrose agar*, *dimetil sulfoxida* (DMSO), streptomycin dan sebagainya.

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi erlenmeyer, lampu neon, aerator, mikropipet, mikroskop, hemositometer, sonikator, cawan petri, desikator, vortex, *laminar flow*, inkubator, refrigerator, otoklaf dan sebagainya.

### Metode

Kultivasi dilakukan dengan menggunakan erlenmeyer yang dilengkapi dengan aerasi, lampu neon sebagai sumber cahaya dan dilakukan pada suhu ruangan. Selama kultivasi diamati perkembangan jumlah sel untuk mendapatkan jumlah pertumbuhannya. Penghitungan sel dilakukan setiap hari.

Kultur mikroalga dilakukan dalam gelas erlenmeyer dengan cara memindahkan stok kultur ke dalam medium. Media yang digunakan merupakan modifikasi *f* medium Guillard dan Ryther yang dilakukan oleh Puslitbang Oseanologi, LIPI. Kultur mikroalga ini dilakukan dalam keadaan aseptik, pada suhu ruangan antara 26 – 30 °C dan diberi cahaya lampu TL 20 watt dengan jarak 15 cm. Kultur diberi aerasi melalui selang silikon yang diberi kapas, yang berfungsi sebagai saringan udara. Pengukuran kurva pertumbuhan diatom *Nitzschia closterium* dilakukan setiap hari dengan menggunakan hemositometer dengan pembesaran 40 kali dan metode perhitungannya berdasarkan Mujiman (1984).

Untuk proses ekstraksi, pengambilan sampel dilakukan pada fase stasioner hari ke-20. Kultur dipisahkan antara biomassa dan filtrat dengan sentrifuse selama 30 menit dengan kecepatan 3000 rpm pada suhu ruang. Ekstraksi berdasarkan modifikasi metode yang digunakan oleh Naviner *et al.* (1998). Biomassa yang didapat dikeringkan dengan *freeze dryer* selama  $\pm 24$  jam atau sampai kering pada suhu  $\pm 90$  °C. Biomassa yang telah dikeringkan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml dan ditambahkan pelarut metanol dengan perbandingan 1 : 25 (b/v). Selanjutnya biomassa dipecah dengan *sonikasi* selama 5 menit per 5 ml sampel, kemudian larutan ekstrak biomassa disaring dengan kertas saring whatman no. 42, lalu diuapkan dalam desikator. Hasilnya merupakan ekstrak intraseluler.

Pengujian ekstrak intraseluler dilakukan terhadap mikroba uji dengan konsentrasi ekstrak untuk bakteri sebesar 2500, 2000, 500, dan 250 ppm (mg/l) dan untuk kapang sebesar 2500, 2000, dan 1000 ppm (mg/l). Ekstrak tersebut terlebih

dahulu dilarutkan ke dalam pelarut DMSO. Selanjutnya suspensi bakteri dan kapang yang ditumbuhkan dalam media pertumbuhannya disuspensikan dengan akuades hingga dicapai kekeruhan 25 % T dan sebanyak 25  $\mu$ l suspensi mikroba tersebut dimasukkan ke dalam cawan petri dan dituangkan nutrien agar sebanyak 15 ml, diratakan dan didiamkan sampai membeku. Setelah itu *paper dish* yang berisi 25  $\mu$ l ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* diletakkan diatas permukaan agar, diinkubasi selama 12 – 18 jam pada suhu 30 °C (Sherley, 1998). Selanjutnya diukur diameter penghambatannya dengan cara mengukur diameter areal bening dikurangi diameter *paper dish*, selain itu juga dihitung nilai potensinya.

Rumus perhitungan uji antimikroba :

$$\text{Potensi} = \frac{\text{Diameter hambatan senyawa yang diperiksa}}{\text{Diameter senyawa kontrol dengan konsentrasi sama}} \times 100\%$$

## HASIL PEMBAHASAN

Selama kultivasi *Nitzschia closterium* dilakukan penghitungan jumlah sel hingga dapat kurva pertumbuhannya. Fase lag (adaptasi) pada kultur tidak terdeteksi sehingga kultur telah mulai memasuki fase eksponensial (fase log) pada saat kultivasi awal sampai hari ke- 7 dengan kepadatan  $1,00 \times 10^4$  sel/ ml sampai  $5,98 \times 10^5$  sel/ml, kemudian diikuti fase penurunan laju pertumbuhan pada hari ke- 8 dengan kepadatan sel sebesar antara  $4,5 \times 10^5$  sel/ml, fase stasioner dimulai pada hari ke- 9 sampai hari ke- 47 dengan kepadatan sel antara  $4,5 \times 10^5$  sampai  $7,57 \times 10^5$  sel/ml dan diikuti dengan fase kematian yang dimulai pada hari ke- 48.

Pemanenan dilakukan pada fase pertengahan stasioner kultur *Nitzschia closterium*, yaitu hari ke-20 dengan jumlah kultur sebanyak 1900 ml. Berdasarkan hasil pemisahan dan pengeringan beku diperoleh biomassa sebesar 34,2278 gram per berat basah dan 1,8989 gram per berat kering atau sekitar 5,55 % per berat basah biomasanya. Setelah dilakukan ekstraksi dengan penambahan pelarut organik metanol, diikuti dengan pemecahan sel menggunakan *soniprep*, penyaringan dan penguapan diperoleh ekstrak intraseluler sebesar 1,5623 gram per berat kering atau  $\pm$  82,27 % dari serbuk kasar antimikrobanya.

Hasil pengujian aktivitas ekstrak intraseluler terhadap bakteri gram negatif *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2. Hasil pengujian terhadap aktivitas ekstrak intraseluler *Salmonella typhi* memperlihatkan bahwa ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* pada konsentrasi 2000 ppm (mg/l) menunjukkan adanya zona bening yang ukurannya berkisar antara 5 mm sampai 6 mm dengan potensi sebesar 29,41 – 35,29 %. Pada konsentrasi 1000 ppm (mg/l), zona bening hambatan yang terbentuk sebesar 3 – 4 mm dengan potensi sebesar 20 – 26,67 %. Pada konsentrasi 500 ppm (mg/l), zona bening hambatan sebesar 3 mm dengan potensi sebesar 20 %. Sedangkan pada konsentrasi 250 ppm (mg/l), ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* tidak menunjukkan adanya zona hambatan terhadap bakteri *Salmonella typhi*. Nilai konsentrasi hambatan minimum terjadi pada konsentrasi ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* sebesar 2000 ppm.

Tabel 1. Diameter hambatan ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* terhadap bakteri *Salmonella typhi*

Konsentrasi ppm (mg/mL)		Jenis mikroorganisme <i>Salmonella typhi</i>	
		Ø Hambatan (mm)	Potensi (%)
2000	Kontrol (A)	17	
	Ekstrak Intraseluler (B)	6	35,29
	Ekstrak Intraseluler (C)	5	29,41
1000	Kontrol (A)	15	
	Ekstrak Intraseluler (B)	4	26,6
	Ekstrak Intraseluler (C)	3	20
500	Kontrol (A)	15	
	Ekstrak Intraseluler (B)	3	20
	Ekstrak Intraseluler (C)	3	20
250	Kontrol (A)	11	
	Ekstrak Intraseluler (B)	-	0
	Ekstrak Intraseluler (C)	-	0

Keterangan : Kontrol = Streptomycin - = Tidak ada hambatan

Hasil pengujian terhadap *Escherichia coli* memperlihatkan bahwa ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* menunjukkan adanya zona bening hambatan pada konsentrasi 2000 ppm (mg/l) dengan ukuran kisaran sebesar 6 – 8 mm dan potensinya

sebesar 30 –40 % . Pada konsentrasi 1000 ppm (mg/l), zona bening hambatan yang terbentuk sebesar 4-5 mm dengan potensi sebesar 25-31,25 % . Zona bening hambatan yang terbentuk pada konsentrasi 500 ppm (mg/l) sebesar 2 mm dengan potensi sebesar 12,5 % . Pada konsentrasi 250 ppm (mg/l), ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Nilai konsentrasi hambatan minimum terjadi pada konsentrasi ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* sebesar 2000 ppm (mg/l).

Tabel 2. Diameter hambatan ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* terhadap bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi ppm (mg/ml)		Jenis mikroorganisme <i>Escherichia coli</i>	
		Ø Hambatan (mm)	Potensi (%)
2000	Kontrol (A)	20	
	Ekstrak Intraseluler (B)	6	30
	Ekstrak Intraseluler (C)	8	40
1000	Kontrol (A)	16	
	Ekstrak Intraseluler (B)	4	25
	Ekstrak Intraseluler (C)	5	31,25
500	Kontrol (A)	16	
	Ekstrak Intraseluler (B)	2	12,25
	Ekstrak Intraseluler (C)	2	15,25
250	Kontrol (A)	11	
	Ekstrak Intraseluler (B)	-	0
	Ekstrak Intraseluler (C)	-	0

Keterangan : Kontrol = Streptomycin - = Tidak ada hambatan

Jika dilihat dari nilai konsentrasi hambatan minimum dan potensi dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut memiliki potensi yang rendah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thypii* dan *Escherichia coli*. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak intraseluler yang diperoleh tidak efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh sel bakteri *Salmonella thypii* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi yang rendah. Potensi yang rendah ini diduga karena ekstrak yang diperoleh masih dalam bentuk kasar dan efektifitasnya yang kecil. Efektifitas ekstrak intraseluler yang kecil ini diduga karena dalam ekstrak tersebut tidak ada atau sedikitnya kandungan

senyawa-senyawa aktif yang memiliki struktur yang sama dengan antibiotik yang umum dipakai untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella thypii* dan *Escherichia coli*, kerentanan dari bakteri yang diuji, usia bakteri dan kondisi lingkungan. Antibiotik yang umum digunakan untuk dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri *Salmonella thypii* digunakan *chloramphenicol*, *amphicilin* dan *co-trimoxazole* (Lewis, 1992). Sedangkan untuk bakteri *Escherichia coli* digunakan antibakteri *sulfanomide*, *chloraphenicol*, *kanamycin* dan *penicillin* (Tortora *et al.*, 1989).

Berdasarkan hasil pengujian ekstra intraseluler *Nitzschia closterium* terhadap kedua jenis bakteri tersebut dapat dikatakan bahwa bakteri *Salmonella typhii* dan *Escherichia coli* tahan terhadap konsentrasi ekstrak intraseluler yang rendah. Hal ini diduga disebabkan bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang tebal dan berlapis-lapis yang terdiri dari peptidoglikan, lipopolisakarida dan lipoprotein. Adanya lapisan ini menyebabkan dinding sel tidak mudah dipisahkan dari senyawa aktif (Moat, 1988).

Selain itu kerentanan bakteri terhadap antimikroba dapat disebabkan karena bakteri memproduksi enzim yang dapat melakukan inaktivasi antimikroba, terjadi gangguan permeabilitas membran sel sehingga tidak tercapai konsentrasi antimikroba yang efektif didalam sel dan terjadi modifikasi pada molekul dalam sel yang merupakan target antimikroba (Neu, 1992 *dalam* Yuliani, 1999).

Hasil pengujian aktivitas ekstrak intraseluler terhadap kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil pengujian ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* terhadap kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp. tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pada beberapa konsentrasi yang diujikan, yaitu 2500, 2000 dan 1000 ppm (mg/l), sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak tersebut belum memiliki aktivitas sebagai zat antifungi.

Tabel 3. Diameter hambatan ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* terhadap kapang *Aspergillus niger* dan *Penicillium* sp.

Konsentrasi ppm (mg/ml)		Jenis mikroorganismen			
		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Penicillium</i> sp	
		Ø Hambatan (mm)	Potensi (%)	Ø Hambatan (mm)	Potensi (%)
2500	Kontrol (A)	-	-	-	-
	Ekstrak Intraseluler (B)	-	-	5	-
	Ekstrak Intraseluler (C)	-	-	2	-
2000	Kontrol (A)	-	-	-	-
	Ekstrak Intraseluler (B)	-	-	1	-
	Ekstrak Intraseluler (C)	-	-	0	-
1000	Kontrol (A)	-	-	-	-
	Ekstrak Intraseluler (B)	-	-	-	-
	Ekstrak Intraseluler (C)	-	-	-	-

Keterangan : Kontrol = Streptomycin - = Tidak ada hambatan

Dilihat kejernihan zona penghambatan yang dihasilkan maka ekstrak zat aktif intraseluler dari kultur *Nitzschia closterium* tergolong ke dalam zat yang memiliki efek statik, yaitu menghambat pertumbuhan tanpa membunuh sel mikroba tersebut.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Kurva pertumbuhan *Nitzschia closterium* yang diperoleh dimulai dari fase log eksponensial (0-7 hari) dengan kepadatan  $1,00 \times 10^4$  sel/ml sampai  $5,98 \times 10^5$  se/ml, kemudian fase penurunan laju pertumbuhan (hari ke-8) dengan kepadatan  $4,00 \times 10^5$  sel/ml, fase stasioner (9 – 47 hari) kepadatan sel berkisar antara  $4,50 \times 10^5$  sel/ml –  $7,57 \times 10^5$  sel/ml dan diakhiri dengan fase kematian (sejak hari ke-48).

Hasil ekstraksi terhadap biomassa yang dihasilkan mikroalga *Nitzschia closterium* yaitu berupa ekstrak intra seluler dengan rendemen sebesar 1,5623 atau kira-kira 82,27 % dari berat kering serbuk biomasnya.



Ekstrak intraseluler yang dihasilkan dari *Nitzschia closterium* mempunyai aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Penicillium* sp, tetapi tidak mempunyai aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *Aspergillus niger*. Konsentrasi hambatan minimum bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* terjadi pada konsentrasi 2000 ppm (mg/l) dengan jumlah ekstrak intraseluler yang diujikan sebesar 25 µl dan nilai potensi masing-masing sebesar 30 – 40 % dan 29,41 – 35,29 %. Ekstrak intraseluler *Nitzschia closterium* tersebut memiliki kemampuan yang rendah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Penicillium* sp.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Brock TD dan Madigan. 1994. Biology of Microorganism. Prentice Hall International.
- Lewis MJ. 1992. Medical Microbiology : *Salmonella*. D Greenwood, RCB Slack dan JF Peutherer (Eds.). Low-Priced Edition. ELBS with Churchill Livingstone Educational low-Priced Books Scheme Funded by The British Government. Nottingham and Edinburgh. London.
- Moat AG. 1988. Microbial Physiology. New York.
- Mujiman A. 1984. Makanan Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Naviner M, JP Berge, P Durand dan H Lee Bris. 1999. Antibacterial activity of the marine diatom *Skeletonema costatum* against aquacultural pathogens. Aquaculture 174 (1999): 15 – 24.
- Pelczar MJ dan ECS Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 1 dan 2. Penterjemah RS Hadioetomo, T Imas, SS Tjitrosomo dan SL Angka. UI Press. Jakarta.
- Santioso E. 1998. Ekstraksi senyawa antibakteri dari diatom laut *Nitzschia* sp dan uji aktivitasnya terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Jurusan Teknologi Hasil Perikanan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Bogor.
- Sherley. 1998. Sintesis dan uji aktivitas senyawa analog antibiotik UK-3 (2-hidrosinikotinil-heksil-serin-ester dan turunannya). Thesis Magister Sain Ilmu Kimia. Program Studi Ilmu Kimia, Program Studi Pasca Sarjana Universitas Indonesia. Depok.
- Stewart DP. 1974. Algal Physiology and Biochemistry. Blackwell Scientific Published. London.

Yuliani E. 1999. Biodiversitas dan karakteristik senyawa antibakteri dari *Streptomyces* sp. Jurusan Biologi. FMIPA. IPB

Tortora GJ dan DR Funke dan CL Case. 1989. Microbiology an Introduction. Third Edition. The Benjamin/Cummings Publ. Co. Inc., California.