

**POTENSI BIOPIGMENT MIKROALGA *Chlorella* sp. SEBAGAI ANTIBAKTERI
*Staphylococcus aureus***Hartini H¹, Titi Lasmini¹, Mathylda Pratiwi¹, Erlinna Juita¹¹Program Studi Analisis Kesehatan, Akademi Kesehatan John Paul II Pekanbaru
Jl. Permata No. 32, Labuhbaru Barat, Pekanbaru, Riau 28292**ABSTRAK**

Mikroalga sebagai organisme fotosintetis mengandung biomassa yang telah dieksplorasi untuk menghasilkan bahan bakar alternatif dalam bentuk biodiesel dan bioetanol. Selain itu, biomassa mikroalga ternyata masih menyisakan produk lain yang belum dieksplorasi secara optimal yaitu biopigmen. Salah satu jenis mikroalga yang didominasi oleh klorofil serta karotenoid yaitu *Chlorella* sp. Penelitian ini fokus pada pemanfaatan biopigmen mikroalga *Chlorella* sp. dibidang kesehatan khususnya kemampuan sebagai antibakteri alami terhadap bakteri patogen *Staphylococcus aureus*. Mikroalga *Chlorella* sp. ditumbuhkan dalam medium Walne dan dipanen menggunakan metode sentrifugasi. Mikroalga *Chlorella* sp. diekstrak menggunakan pelarut heksan:aseton (7:3) dan dimurnikan biopigmentnya dengan kolom kromatografi. Biopigmen yang diperoleh, diuji aktivitas antibakterinya dengan metode Kirby-Bauer. Hasil penelitian diperoleh kerapatan sel mikroalga *Chlorella* sp. sebesar $16,54 \times 10^6$ sel/mL. Ekstrak kasar mikroalga *Chlorella* sp. berwarna hijau tua. Hasil pemurnian dengan kolom kromatografi diperoleh jenis biopigmen karotenoid pada panjang gelombang 380–400 nm dan klorofil pada panjang gelombang 450 nm dan 620 nm. Aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang dihasilkan oleh ekstrak kasar sebesar $9 \pm 0,104$ mm, karotenoid sebesar $11,6 \pm 0,038$ mm dan kloramfenikol $9,4 \pm 0,102$ mm.

Kata kunci: mikroalga, biopigmen, antibakteri, klorofil, karotenoid

ABSTRACT

Microalgae as photosynthesis organisms contain biomass which has been explored to generate alternative energy in the forms of biodiesel and bioethanol. In addition, biomass of microalgae apparently leaves other products which have not been optimally explored, that are biopigments. A kind of microalgae which were dominated by chlorophyll and carotenoids is Chlorella sp. This research focused on the utilization of biopigment of microalgae sp in health care, especially their ability as natural agent of antibacterials to combat pathogenic bacteria, Sraphulococcus aureus. Microalgae Chlorella sp was cultivated in Walne's medium and harvested with centrifugation methods. Microalgae Chlorella sp, were extracted using hexane:acetone (7:3) and separated with chromatography methods. Biopigment which had been obtained was subsequently examined for its antibacterial activities using Kirby-Bauer method. The research revealed the cell density of microalgae Chlorella sp. was 16.54×10^6 cell/mL. Dark green was shown in crude extracts of microalgae Chlorella sp. The separation of crude extracts of biopigment generated biopigment of carotenoids with wavelength of 380-400 nm and biopigment of chlorophyll with wavelength of 450 nm and 620 nm. Antibacterial activity against S. aureus produced by crude extracts was 9 ± 0.104 mm, by carotenoid was 11.6 ± 0.038 mm, and by chloramphenicol was 9.4 ± 0.102 mm.

Keywords: microalgae, biopigment, antibacterial, chlorophyll, carotenoid

PENDAHULUAN

Biopigmen pada mikroalga digunakan dalam proses fotosintesis. Biopigmen fotosintesis utama pada mikrolaga terdiri dari 2 bagian yaitu klorofil dan karotenoid (Grant and Louda, 2010) Klorofil dikenal sebagai porfirin magnesium dan berwarna hijau. Sedangkan karotenoid merupakan pigmen aksesoris fotosintesis. Salah satu jenis mikroalga yang didominasi oleh klorofil serta karotenoid yaitu *Chlorella* sp. Pemanfaatan biopigmen mikroalga *Chlorella* sp. hingga saat ini telah diterapkan pada bidang kosmetik dan pangan. Pada bidang kosmetik biopigmen digunakan sebagai pewarna alami krim wajah, sabun dan bedak. Pada bidang pangan, biopigmen digunakan sebagai suplemen ataupun nutrisi tambahan (Borowitzka, 2018). Selain itu biopigmen mikroalga juga dilaporkan mempunyai kemampuan sebagai antibakteri yang belum dieksplorasi secara optimal (Dineshkumar, Kumaravel and Sampathkumar, 2017).

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat patogen. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi. Penggunaan dosis antibakteri sintetik dan lama pemberian yang tidak tepat telah menimbulkan masalah baru yaitu meningkatnya resistensi bakteri (Praptiwi et al., 2016). Kejadian resistensi bakteri khususnya bakteri *Staphylococcus aureus* menjadi sangat kompleks setelah ditemukannya *methicillin resistance Staphylococcus aureus* (MRSA). Oleh sebab itu, penelitian tentang pemanfaatan potensi biopigmen mikroalga sebagai antibakteri *S. aureus* perlu dilakukan.

METODE

Desain Penelitian. Penelitian ini menggunakan eksperimen laboratorium untuk menentukan pola kepekaan bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* menggunakan metode Kirby-Bauer (metode Cakram Disk).

Alat dan Bahan. Alat-alat yang digunakan antara lain *haemocytometer* (*Improved Neubauer*), pipet mikro (Eppendorf) ukuran 10–100 μ L dan 100–1000 μ L, mikroskop cahaya (Olympus X22), spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S), sentrifuga (Nesco 80-2), neraca analitis digital (Electronic balance 10005), otoklaf, aerator, selang plastik, sumbat karet, botol semprot, batang statip, dan kertas aluminium. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu kultur mikroalga *Chlorella* sp., laut 25 g/L, Medium Walne, aseton pa, heksan pa, alkohol 70%, kloroform, silika 60 G.

Prosedur penelitian. Penelitian dilakukan dengan beberapa tahapan yang terdiri dari aktivasi, kultivasi mikroalga, ekstraksi pigmen, pemurnian pigmen, karakterisasi pigmen mikroalga dan uji antibakteri terhadap *S. aureus*.

Mikroalga *Chlorella* sp. diaktivasi dan dikultivasi pada medium Walne. Kultivasi dilakukan dengan menambahkan inokulum mikroalga sebanyak 50 mL pada medium Walne (larutan A dan C masing-masing sebanyak 900 μ L dan 90 μ L) ke dalam 450 mL air laut yang telah disterilisasi dalam botol kaca. Kultur mikroalga diaerasi dengan udara selama 24 jam dan pencahayaan lampu floresen selama 12 jam (Nurachman et al., 2015). Mikroalga dipanen pada saat kultur berumur 10 hari. Kultur dipanen dengan cara sentrifugasi menggunakan sentrifuga pada kecepatan 7000 rpm selama 15 menit yang menghasilkan biomassa (endapan). Biomassa yang diperoleh digunakan untuk ekstraksi pigmen.

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan pelarut aseton pada sel yang telah dipecah dengan metode sonikasi selama 30 menit dan perbandingan 1:5 (w/v). Larutan yang mengandung ekstrak kasar disentrifugasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang diperoleh merupakan ekstrak kasar pigmen.

Ekstrak kasar mengandung biopigmen mikroalga. Biopigmen mikroalga dipisahkan dengan metode kolom kromatografi (Milenković, Zvezdanović and Anđelković, 2012). Matriks yang digunakan adalah silika

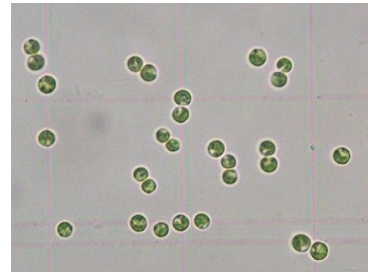
gel 60 G dan eluen yaitu heksan:aseton dengan perbandingan 7:3 (v/v). Silika gel dibuat terlebih dahulu menjadi bubuk silika (dengan mencampur silika dan eluen) selanjutnya dimasukkan ke dalam kolom yang berdiameter 1,5 cm dan panjang 30 cm, hingga tinggi kolom yang diisi bubuk silika adalah 20 cm. Kolom silika didiamkan selama 1 malam. Ekstrak kasar pigmen dimasukkan ke dalam kolom secara hati-hati, kemudian dielusi menggunakan eluen heksan:aseton perbandingan 7:3 (v/v).

Karakter dari pigmen yang dimiliki oleh mikroalga *Chlorella* sp. ditentukan dengan menganalisis bentuk spektrum serapan menggunakan spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S UV-Vis*). Fraksi-fraksi pigmen dipindai pola spektrum serapannya pada panjang gelombang 400–700 nm. Blanko yang digunakan untuk pemindaian spektrum serapan adalah heksan:aseton dengan perbandingan 7:3 (v/v)

Biopigmen yang telah diidentifikasi berdasarkan pola spektrums erapannya selanjutnya diuji potensinya sebagai antibakteri. Uji antibakteri diawali dengan koloni *S. aureus* dari kultur Mannitol Salt Agar 24 jam diambil dengan ose kemudian disuspensikan kedalam 9 mL larutan garam fisiologis. Suspensi *S. aureus* dipipet kedalam kuvet dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Kekeruhan suspensi diatur hingga mencapai kekeruhan setara dengan 0,5 standar McFarland (0,05 mL larutan 1% BaCl₂ ditambah 9,95 mL larutan 1% H₂SO₄). Suspensi yang telah memenuhi standar kemudian diambil dengan kapas lidi steril dan diswab pada permukaan media Mueller Hinton Agar. Kertas cakram yang sebelumnya telah direndam dengan fraksi biopigmen diletakkan pada permukaan agar kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk kemudian diukur untuk mengetahui sensitifitas *S. aureus* terhadap biopigmen mikroalga *Chlorella* sp.

HASIL DAN PEMBAHASAN


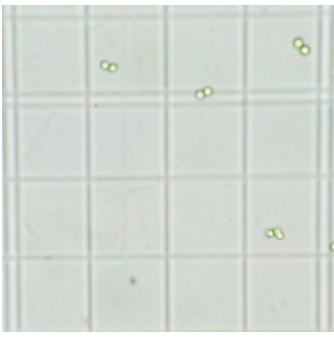

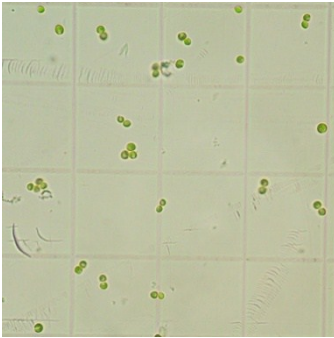


Sel *Chlorella* sp. berwarna hijau terang dan berbentuk bulat (Gambar 1) yang diamati menggunakan mikroskop cahaya dan dilengkapi dengan *haemocytometer*. Pengamatan pada mikroskop menggunakan perbesaran 200×.



Gambar 1. Sel *Chlorella* sp. dengan perbesaran 200×

Mikroalga *Chlorella* sp. diaktivasi terlebih dahulu dengan tujuan untuk memperoleh kultur awal dengan kondisi yang baik. Selain itu juga untuk meminimumkan masa adaptasi. Masa adaptasi berlangsung lambat karena mikroalga *Chlorella* sp. menyesuaikan diri terhadap medium dan kondisi sekitar untuk dapat hidup. Medium yang digunakan dalam penelitian ini adalah medium Walne. Cahaya yang diberikan berasal dari lampu floresen. Cahaya yang berasal dari lampu berfungsi untuk proses fotosintesis pada sel mikroalga. Pertumbuhan *Chlorella* sp. diamati melalui peningkatan kepekatan warna kultur dan peningkatan jumlah sel. Semakin pekat warna kultur (hijau tua), maka semakin tinggi kerapatan sel mikroalga (Tabel 1). Pada penelitian ini, jumlah sel awal yang dikulturkan adalah $0,5 \times 10^6$ sel/mL kultur. Warna kultur awal (dalam medium Walne) yaitu hijau muda. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga hari ke-10. Pada hari ke-10 sel *Chlorella* sp. dipanen karena sudah mulai memasuki fase stasioner. Kerapatan sel *Chlorella* sp. pada saat *Chlorella* sp. dipanen adalah $21,41 \times 10^6$ sel/mL kultur dengan produktivitas $2,141 \times 10^6$ sel/mL kultur/hari.

Tabel 1. Kultur mikroalga *Chlorella* sp.

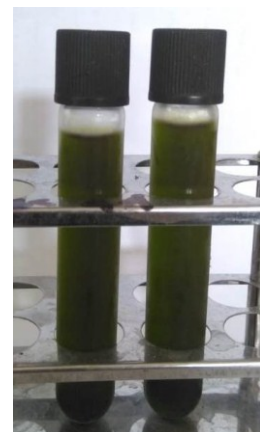
Hari ke-	Kultur <i>Chlorella</i> sp.	Sel <i>Chlorella</i> sp.	Jumlah sel (juta/mL kultur)
2			0,5
8			14,22
10			16,54



Gambar 2. Biomassa *Chlorella* sp.

Biomassa *Chlorella* sp. diperoleh sebagai hasil pemanenan kultur mikroalga. Pemanenan mikroalga dilakukan dengan teknik sentrifugasi. Teknik pemanenan dengan sentrifugasi diyakini efisien untuk pemanenan biomassa skala menengah. Teknik sentrifugasi juga lebih singkat dibandingkan

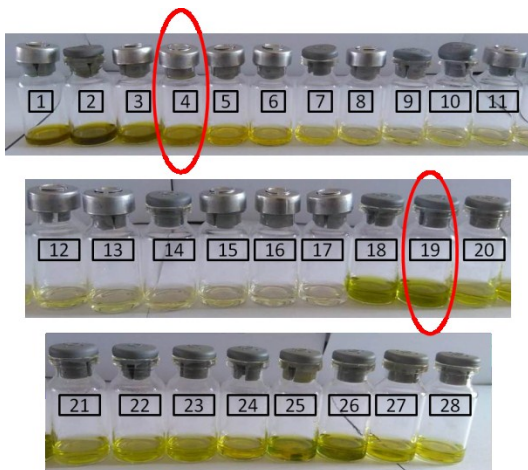
teknik filtrasi. Biomassa *Chlorella* sp. yang diperoleh berwarna hijau tua (Gambar 2) dengan jumlah sel rata-rata $16,54 \times 10^6$ sel/mL.



Gambar 3. Ekstrak kasar *Chlorella* sp.

Ekstrak kasar pigmen *Chlorella* sp. merupakan hasil ekstraksi pigmen dari biomassa *Chlorella* sp. Proses ekstraksi diawali dengan pemecahan sel menggunakan teknik sonikasi. Pemecahan sel dengan pelarut aseton dingin dilakukan dan dalam kondisi tidak kontak dengan cahaya agar pigmen yang terdapat dalam ekstrak kasar tidak rusak. Pecahan sel dan ekstrak kasar dipisahkan dengan cara disaring. Filtrat yang diperoleh disentrifugasi untuk memperoleh supernatan yang tidak mengandung pecahan sel. Ekstrak kasar (supernatan) yang diperoleh berwarna hijau pekat yang menandakan bahwa pigmen klorofil (hijau) merupakan pigmen dominan yang dikandung oleh *Chlorella* sp (Gambar 3).

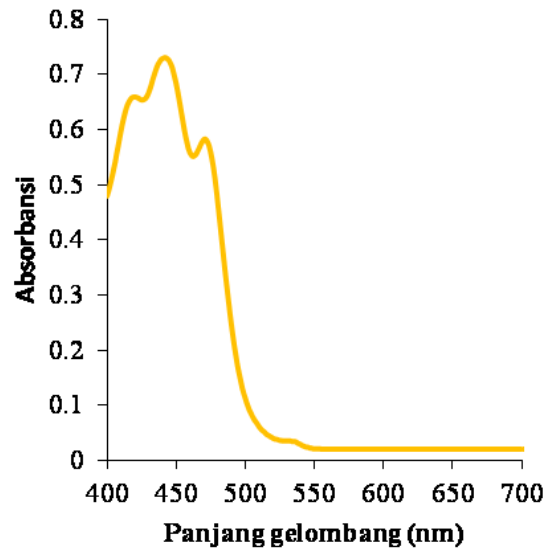
Pigmen yang terkandung dalam mikroalga dimurnikan melalui metode kromatografi kolom, dalam hal ini jenis matriks dan eluen yang digunakan sama dengan identifikasi dengan KLT (Gambar 5.4). Panjang kolom yang digunakan adalah 20 cm. Hal yang perlu diperhatikan dalam pengerjaan kromatografi kolom adalah menjaga agar kolom tidak retak. Kolom yang retak akan menghasilkan pemisahan yang tidak sempurna.



Gambar 5. Fraksi pigmen hasil kromatografi kolom

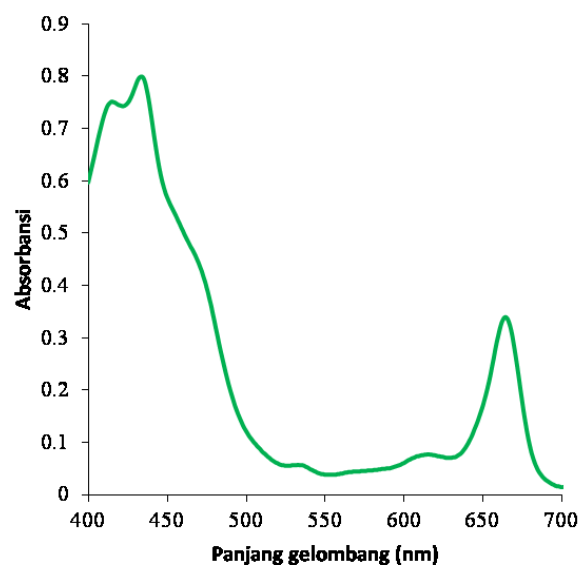
Fraksi F1-F11 merupakan fraksi berwarna kuning jingga yang paling awal keluar dari kolom. Fraksi F1-F11 mempunyai intensitas warna kuning. Spektra F1-F11 menunjukkan 3 puncak serapan dengan 2

puncak yang tegas pada 400–550 nm yang merupakan karakter serapan senyawa karotenoid khususnya β-karoten. F4 merupakan fraksi β-karoten. Hal tersebut diperkuat dari spektrum serapannya yang tidak mengandung puncak serapan klorofil pada kisaran panjang gelombang 640–670 nm (Gambar 6).



Gambar 6. Spektrum pigmen fraksi F4

Fraksi F18-F28 merupakan fraksi yang keluar dengan warna hijau. Fraksi F18-F28 memiliki puncak serapan sorot (415 dan 435 nm) dan puncak serapan cincin porfirin (535, 625 dan 625 nm) disajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Spektrum pigmen fraksi F19

Tabel 2. Uji antibakteri terhadap *S. aureus*

Sampel Uji	Rata-rata daya hambat
Karotenoid	11,6±0,038 mm
Klorofil	0±0,008 mm
Ekstrak kasar	9±0,104 mm
Kloramfenikol (Kontrol +)	9,4±0,102 mm
Heksan:aseton (7:3) (Kontrol -)	0±0,002 mm

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dilakukan menggunakan karotenoid, klorofil, ekstrak kasar, kloramfenikol (kontrol +), dan eluen heksan:aseton perbandingan 7:3 (kontrol -). Hasil penelitian menunjukkan bahwa karotenoid memberikan daya hambat sebesar 11,6±0,038 mm. Mekanisme daya hambat terhadap bakteri yang dihasilkan oleh karotenoid tidak sejelas polifenol dan polisakarida. Karotenoid merangsang akumulasi enzim lisozim yang melisis dinding sel bakteri sehingga menghasilkan aktivitas antibakteri (Rajauria and Abu-Ghannam, 2013).

Klorofil pada penelitian ini tidak memberikan kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Hal tersebut disebabkan karena klorofil tidak mempunyai kemampuan sebagai bakteristatik dan bakterisida (Pradhan, Das and Das, 2014). ekstrak kasar mikroalga *Chlorella* sp. memberikan daya hambat sebesar 9±0,104 mm. Rendahnya daya hambat yang dihasilkan ekstrak kasar karena ekstrak kasar mengandung campuran biopigmen. Kloramfenikol (kontrol +) memberikan daya hambat sebesar 9,4±0,102 mm. Kloramfenikol merupakan antibiotik sintesis yang termasuk dalam golongan fenikol. Kloramfenikol mempunyai mekanisme kerja menghambat sintesis protein dan bersifat bakteriostatik (CLSI, 2016). Hasil penelitian menunjukkan bahwa eluen (kontrol -) tidak memberikan daya hambat. Hal tersebut

membuktikan bahwa eluen (pelarut yang digunakan untuk mengelusi ekstrak kasar mikroalga) tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri sehingga aktivitas daya hambat yang dihasilkan hanya berasal dari pigmen yang terkandung dalam mikroalga bukan dari pelarut.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa biopigmen yang berhasil diisolasi dari mikroalga *Clorella* sp. adalah karotenoid dan klorofil. Karotenoid mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* sedangkan klorofil tidak mempunyai aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

ACKNOWLEDGEMENT

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset Teknologi dan Pendidikan Tinggi republik Indonesia yang telah mendanai penelitian melalui Hibah Penelitian skema Penelitian Dosen Pemula Tahun Anggaran 2018.

DAFTAR PUSTAKA

- Borowitzka, M.A., 2018. Microalgae in Medicine and Human Health: A Historical Perspective. In: *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc., pp.20–21.
- CLSI, 2016. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. CLSI supplement M100S, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Dineshkumar, R., Kumaravel, R. and Sampathkumar, P., 2017. Cultivation of Efficient Marine Microalgae and Their Biochemical Composition and Their Antibacterial Activity against Human Pathogens. *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 5(4).
- Grant, C.S. and Louda, J.W., 2010. Microalgal pigment ratios in relation to light intensity: implications for chemotaxonomy. *Aquatic Biology*, 11,

pp.127–138.

- Milenković, S.M., Zvezdanović, J.B. and Anđelković, T.D., 2012. The Identification Of Chlorophyll And Its Derivatives In The Pigment Mixtures : Hplc-Chromatography , Visible And Mass Spectroscopy Studies. 1(1), pp.16–24.
- Nurachman, Z., Hartini, H., Ridhani, W., Kurnia, D., Hidayat, R., Maria, L., Panggabean, G. and Nurbaiti, S., 2015. Tropical marine Chlorella sp . PP1 as a source of photosynthetic pigments for dye-sensitized solar cells. *ALGAL*, [online] 10, pp.25–32. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2015.04.009>>.
- Pradhan, J., Das, S. and Das, B.K., 2014. *Antibacterial activity of freshwater microalgae: A Review*.
- Praptiwi, Palupi, K.D., Fathoni, A., Keim, A.P., Royani, M.F., Effendi, O. and Agusta, A., 2016. Evaluasi Antibakteri dan Antioksidan Ekstrak Smilax spp. Dari Pulau Enggano. *Berita Biologi Jurnal Ilmu-ilmua Hayati*, 15(3), pp.267–274.
- Rajauria, G. and Abu-Ghannam, N., 2013. Antimicrobial activity of compounds isolated from algae. In: *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*. [online] Woodhead Publishing Limited, pp.287–306. Available at: <<http://dx.doi.org/10.1533/9780857098689.2.287>>.