

SKRIPSI

UJI POTENSI ANTIBAKTERI ISI KAPSUL KERANG DARAH *Anadara granosa* L. DIFORTIFIKASI MIKROALGA *Spirulina platensis* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Escherichia coli* SECARA IN-VITRO

Disusun dan diajukan oleh

ZILHAYAI

H041171018



**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

UJI POTENSI ANTIBAKTERI ISI KAPSUL KERANG DARAH *Anadara granosa* L. DIFORTIFIKASI MIKROALGA *Spirulina platensis* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Escherichia coli* SECARA IN-VITRO

*Skripsi Ini Dibuat sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Sarjana
Program Studi S1 Biologi Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin*

**ZILHAYAI
H041171018**

**DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021**

LEMBAR PENGESAHAN

UJI POTENSI ANTIBAKTERI ISI KAPSUL KERANG DARAH *Anadara granosa* L. DIFORTIFIKASI MIKROALGA *Spirulina platensis* TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans* DAN *Escherichia coli* SECARA IN-VITRO

Disusun dan diajukan oleh:

ZILHAYAI
H041 17 1018

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Program Sarjana Program Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 09 Agustus 2021 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama

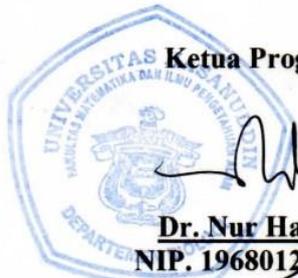
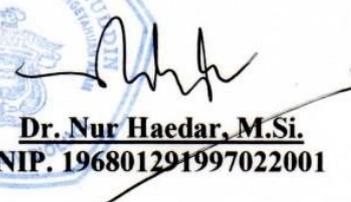


Prof. Dr. Diravah R. Husain, DEA.
NIP 196005251986012001



Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si., M.Si.
NIP. 197001101997021001

Ketua Program Studi



Dr. Nur Haedar, M.Si.
NIP. 196801291997022001

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Zilhayai
Nim : H041171018
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

“Uji Potensi Antibakteri Isi Kapsul Kerang Darah *Anadara granosa* L. Difortifikasi Mikroalga *Spirulina platensis* Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* Secara In -Vitro”

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambil alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 12 Agustus 2021

Yang menyatakan


Zilhayai

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Salam sejahtera untuk kita semua

Alhamdulillah, segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT. atas berkah, rahmat dan nikmat kesehatan yang selalu tercurah kepada hambanya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi yang berjudul “Uji Potensi Antibakteri Isi Kapsul Kerang Darah *Anadara granosa* L. Difortifikasi Mikroalga *Spirulina platensis* terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* secara In-Vitro”. Tak lupa pula shalawat dan salam tetap tercurah kepada Nabiyullah Muhammad SAW, kepada keluarga, para sahabat-sahabatnya dan orang-orang yang selalu berada di jalan *Addinul Islam*. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan program pendidikan tinggi Sarjana (S1) Biologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin Makassar.

Tugas akhir ini dapat terselesaikan dengan baik berkat doa, bimbingan, motivasi, dan bantuan dari berbagai pihak. Terima kasih kasih kepada keluarga terutama untuk kedua orang tua, Bapak H. Jabaruddin S.Pd. dan Ibu Hj. Masruhah yang telah membesarkan dan membimbing penulis hingga sampai di titik ini. Selalu mendoakan kesuksesan anaknya. Terima kasih kepada kakek Ust. Muh Rafi BA., yang selalu mendoakan cucunya ini. Terima kasih kepada Om dan Tante (Syarifuddin S.Pd dan Nurfityah Rafi, S.Pdi) yang selalu memberi dorongan semangat kepada penulis selama penelitian terlaksana. Serta terima kasih kepada saudara kandung penulis yaitu kakakku tersayang Muayyadah, S.Si, dan adik-adikku tercinta (Milka Murua & Mujbirah Uyuubah), yang selalu

memberi dukungan penuh selama proses penelitian hingga sampai saat ini. Semoga kalian selalu diberi kesehatan oleh-Nya.

Terima kasih pula yang tak terhingga untuk dosen pembimbing Prof. Dr. Hj. Dirayah R. Husain, DEA. selaku pembimbing utama. Berkat kesabaran dalam membimbing, arahan dan motivasi yang selalu diberikan kepada penulis selama melakukan penelitian sehingga penulis sampai pada tahap penyusunan skripsi ini. Terima kasih juga kepada pembimbing pertama Dr. Eddyman W. Ferial, S.Si., M.Si. atas segala bantuan, motivasi, waktu yang diberikan kepada penulis sejak awal proses penyusunan skripsi ini hingga penulis bisa menyelesaikannya dengan baik.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. Rektor Universitas Hasanuddin Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA. beserta jajarannya.
2. Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Dr. Nur Haedar, M.Si selaku ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin.
4. Dr. Munif Said Hassan, M.Si. selaku dosen Pembimbing Akademik dan dosen penguji penulis, dan Dr. Irma Andriani, S.Pi, M.Si. selaku dosen penguji. Serta kepada seluruh Bapak Ibu dosen Departemen Biologi yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat selama proses perkuliahan.
5. Kepada para staf pegawai Departemen Biologi yang telah membantu penulis dalam pengurusan administrasi.

6. Kak Fuad Gani, S.Si. selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi, Kak Heriadi, M.Si. (alumni angkatan 2012), Kak Syahrul Gunawan, S.Si (alumni angkatan 2014), Kak Rihuh Wardani, S.Si. (alumni angkatan 2016). Mereka ini sangat banyak membantu penulis dalam hal bantuan baik berupa ilmu yang bermanfaat, arahan dan kritik selama penulis melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi.
7. Saudari partner sepenelitianku yang tercinta Andi Auliya Utami, sekaligus sahabat baik dari awal masa Mahasiswa baru (MABA) hingga sekarang. Terima kasih sudah menjadi saudara yang selalu membagi ilmunya, selalu memberi support meski diri sendiri tidak baik-baik saja, mau mendengar keluh kesah penulis, selalu membantu urusan penulis baik prihal akademik maupun urusan pribadi. Selalu sabar menemani penulis selama masa penelitian hingga selesai.
8. Saudariku tersayang Sri Rahmawati Umsini, Nahli Nahal, Hijrianti. Terima kasih juga sudah menjadi sahabat baik penulis selama 4 tahun ini. Rela berbagi kesenangan dan kesedihan satu sama lain dan saling memotivasi selama proses perkuliahan hingga sampai pada tahap akhir penyusunan skripsi ini.
9. Teman-teman satu topik penelitian yakni Anugrah Prima Dirgahayu, Arini Kusuma Wardani dan Sophia Lacuba. Terima kasih atas kerja samanya dan kesabaran kalian dalam menjalankan penelitian ini dari awal hingga akhir.
10. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi, yakni Nur Sofiea, Nadhila Idris, Putri Fahrani, Sitti Nuraeni Rahmah, Awaluddin Tansi, Saraswati dan Fadhillah Ananda Putri. Terima kasih sudah menjadi teman setia selama penelitian.
11. Teman-teman dekat penulis antra lain: Paramita Sudirman, Saraswati, Miftahul

Jannah, Dian Ramadhani, Ghea Farmaning Thias Putri, Nurindah Rezky, Veni Apriliani, Ayu Mitha Lestari, Renaldi Rhafiq, Salman Al Farizi. Terima kasih orang-orang baik atas bantuan dan motivasinya yang selalu diberikan kepada penulis.

12. Teman-teman seperjuangan Biologi 2017 lainnya, terima kasih atas kerja samanya selama proses perkuliahan. Semoga kita semua sukses dimasa depan.
13. Semua pihak yang terlibat yang tidak sempat penulis sebut satu persatu.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi seluruh pembaca khususnya bagi Mahasiswa yang membutuhkannya di masa depan. Semoga Allah meridhoi jalan kita menuntut Ilmu dan bernilai ibadah disisi-Nya.

Makassar, Juli 2021

Penulis

ABSTRAK

Telah dilakukan penelitian mengenai uji potensi antibakteri dari isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis* terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* secara in-vitro. Penelitian menggunakan metode uji daya hambat in vitro secara difusi agar dan Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi tanpa variasi konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan pada uji daya hambat secara in vitro dengan menggunakan konsentrasi tinggi (25%, 50%, 75% dan 100%) dan konsentrasi rendah (10%, 15%, 20% dan 25%) serta melalui pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi, ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis* tidak menunjukkan potensi antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. Tidak adanya potensi antibakteri yang dimiliki diduga karena kandungan senyawa metabolit dalam ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* bersifat saling antagonis.

Kata kunci: *Anadara granosa* L., *Spirulina platensis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, KLT-Bioautografi.

ABSTRACT

Research has been carried out to evaluate the in-vitro antibacterial potential of blood cockle *Anadara granosa L.* fortified with microalgae *Spirulina platensis* capsules against the growth of bacteria *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*. The methods used were agar diffusion method and TLC-Bioautography without any concentrations variation. Research results show of inhibition test in high concentration (25%, 50%, 75% and 100%) and low concentrations (10%, 15%, 20% and 25%), as well as through separation in TLC-Bioautography showed that the ethanolic extracts of blood cockle *Anadara granosa L.* fortified with *Spirulina platensis* capsules had no antibacterial potential against *Streptococcus mutans* and *Escherichia coli*. The absence of antibacterial potential is thought to be due to the antagonistic interactions present in the content of the extracts.

Keywords: *Anadara granosa L.*, *Spirulina platensis*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli*, KLT-Bioautography.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	3
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
II.1 Kerang darah <i>Anadara granosa</i> L.	5
II.2 <i>Spirulina platensis</i>	8
II.3 <i>Streptococcus mutans</i>	10
II.4 <i>Escherichia coli</i>	12
II.5 Antibakteri	13
II.6 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	14
II.7 Metode Uji Daya Hambat Pada Bakteri	16
II.8 Fortifikasi.....	21
BAB III METODE PENELITIAN.....	23
III.1 Alat	23
III.2 Bahan.....	23
III.3 Metode Kerja.....	23
III.3.1 Ekstraksi.....	23
III.3.2 Sterilisasi Alat dan Media.....	25
III.3.3 Pembuatan Media	25

III.3.4 Penyiapan Bakteri Uji.....	26
III.3.5 Uji Daya Hambat	26
III.3.6 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	27
III.3.7 Uji KLT-Bioautografi	27
III.3.8 Analisis Data.....	28
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	29
IV.1 Hasil Pengujian Daya Hambat Ekstrak Isi Kapsul terhadap Bakteri Streptococcus mutans dan Escherichia coli.....	29
IV.2 Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	40
IV.3 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi (KLT-B).....	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	47
V.1 Kesimpulan.....	47
V.2 Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

- Gambar 1. Morfologi *Anadara granosa* L.: A. Cangkang eksternal; B. Cangkang internal; C. Bentuk rusuk, dan D. Tipe gigi engsel..... 5
- Gambar 2. Morfologi *Spirulina platensis* (Fretes *et al.*, 2012)..... 9
- Gambar 3. Morfologi *Streptococcus mutans* (Nugraha, 2008)..... 11
- Gambar 4. Morfologi *Escherichia coli* (Sagar, 2016)..... 12
- Gambar 5. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 1×24 jam pada suhu 37°C. 31
- Gambar 6. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 2×24 jam pada suhu 37°C. 32
- Gambar 7. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 1×24 jam pada suhu 37°C. 35
- Gambar 8. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 2×24 jam pada suhu 37°C. 36

Gambar 9. Profil Kromatografi Lapis ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi dengan fase diam silica gel 60 GF ₂₅₄ dan fase diam (eluen) Kloroform : etanol (90:10) pada penampakan bercak UV 254 nm (A) dan 365 nm (B).	41
Gambar 10. Larutan ekstrak yang dikeruk dari hasil KLT-P.....	43
Gambar 11. Hasil Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi ekstrak isi kapsul kerang darah <i>Anadara granosa</i> L. dan <i>Spirulina platensis</i> inkubasi 1×24 jam.	44
Gambar 12. Hasil Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi ekstrak isi kapsul kerang darah <i>Anadara granosa</i> L. dan <i>Spirulina platensis</i> inkubasi 2×24 jam jam.	45

DAFTAR TABEL

- Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Zona hambat Ekstrak isi Kapsul terhadap bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. 33
- Tabel 2. Hasil Pengukuran Diameter Zona hambat Ekstrak isi Kapsul Pada Konsentrasi Rendah terhadap Bakteri *Sterptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. 37

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Ekstraksi, Uji Daya Hambat, KLT dan KLT Bioautografi Ekstrak Isi Kapsul Hasil Fortifikasi Kerang Darah <i>Anadara granosa</i> L dan <i>Spirulina platensis</i>	55
Lampiran 2. Hasil Ekstrak Simplisia	56
Lampiran 3. Isolat bakteri uji	58
Lampiran 4. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah <i>Anadara granosa</i> L. terhadap bakteri <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Escherichia coli</i> pada masa inkubasi 1×24 jam dan 2×24 jam (menggunakan konsentrasi tinggi).....	59
Lampiran 5. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah <i>Anadara granosa</i> L. terhadap bakteri <i>Streptococcus mutans</i> dan <i>Escherichia coli</i> pada masa inkubasi 1×24 jam dan 2×24 jam (menggunakan konsentrasi rendah).	60
Lampiran 6. Hasil Kromatografi Lapis Tipis	61
Lampiran 7. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi.....	63

BAB 1

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan suatu permasalahan kesehatan utama yang biasa terjadi di negara berkembang seperti Indonesia. Infeksi terjadi akibat adanya aktivitas mikroorganisme di dalam tubuh. Bakteri adalah mikroorganisme patogen yang paling sering menyebabkan infeksi. Berdasarkan pewarnaannya, bakteri terdiri atas dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif (Savitri *et al.*, 2019).

Streptococcus mutans termasuk bakteri Gram positif yang bersifat patogen terhadap manusia. Kebanyakan infeksi yang disebabkan oleh *S. mutans* adalah konsekuensi dari proliferasinya dalam tubuh manusia (Krzysciak *et al.*, 2017) seperti infeksi endokarditis, peradangan katup jantung yang mengancam jiwa (Lemos *et al.*, 2019) dan infeksi pada vagina (Jebur, 2012). Sementara itu, *Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif penyebab infeksi pada saluran pencernaan, dan mengganggu sistem kerja organ lambung (Septiani *et al.*, 2017), juga menginfeksi saluran kemih khususnya pada wanita. Bakteri ini juga termasuk jenis bakteremia (Beimfohr, 2018).

Antibakteri adalah obat yang digunakan untuk memberantas infeksi bakteri pada manusia (Septiani *et al.*, 2017) dan sudah diterapkan sejak pertengahan abad ke dua puluh, baik dalam riset klinis dan farmakologi (Qiu *et al.*, 2020). Jenis antibakteri yang telah banyak digunakan sebagai suplemen untuk menjaga kesehatan tubuh adalah antibakteri sintetik. Namun penyalahgunaan dan ketergantungan yang berlebihan dapat menyebabkan perkembangan resistensi

antimikroba (AMR) dengan cepat (Simmons *et al.*, 2020). Resistensi bakteri terhadap antibiotik telah menjadi masalah global yang serius. Menurut *Centres for Disease Control and Prevention* (2017), sekitar 2 juta orang di Amerika Serikat terinfeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik setiap tahunnya dan paling sedikit 23.000 orang meninggal tiap tahun akibat infeksi tersebut. Untuk mengatasi hal itu, beberapa sumber antibakteri dapat ditemukan terutama di Indonesia. Pada dasarnya obat tradisional mengandung senyawa bioaktif yang berfungsi sebagai antibiotik dalam bidang kesehatan dan tentunya memiliki efek samping lebih rendah dibandingkan dengan antibiotik sintetik.

Saat ini sudah banyak dilakukan penelitian untuk menemukan obat antibakteri baru dari bahan alam, contohnya biota laut dan mikroalga. Beberapa dari biota laut seperti kerang darah *Anadara granosa* L. (Dewiningsih *et al.*, 2017) dan mikroalga *Spirulina platensis* (Hoseini *et al.*, 2013) telah terbukti mengandung bahan aktif sebagai antibakteri.

Kerang darah *Anadara granosa* L. merupakan salah satu biota laut yang termasuk dalam anggota kelas Bivalvia. Kerang ini memiliki potensi sebagai antibakteri dan antimikroba karena adanya kandungan senyawa bioaktif pada jaringan lunak seperti senyawa alkaloid, steroid dan flavonoid yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan bakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Dewiningsih *et al.*, 2017). Kemudian dijelaskan dalam penelitian Ferial (2012) bahwa daging kerang darah *Anadara granosa* L. merupakan salah satu dari sekian banyak *food supplement* yang aman dikonsumsi tanpa efek samping, dimanfaatkan dalam dunia kesehatan untuk menyembuhkan, mencegah terjadinya penyakit dan ketidakstabilan tubuh.

Spirulina platensis merupakan *Cyanobacteria* yang dapat hidup di laut dan air tawar (Fransisca dan Dianursanti, 2019). Menurut Yasir *et al.* (2019), dalam penelitian dan pengembangan produk baru, *Spirulina platensis* telah diidentifikasi sebagai sarana untuk meningkatkan kesehatan, sehingga banyak dimanfaatkan sebagai suplemen maupun sumber obat alami baik secara sendiri maupun bersinergi dengan bahan alam lainnya (Firdiyani *et al.*, 2015). Hoseini *et al.* (2013) juga mengidentifikasi bahwa ekstrak *Spirulina* memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri seperti *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Aspergillus niger*. Oleh karena adanya kandungan senyawa bioaktif seperti fenol, flavonoid, fikosianin, dan eksopolisakarida yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Marangoni *et al.*, 2017; Wulandari *et al.*, 2018). Efek antibakteri tersebut telah membuktikan bahwa *Spirulina* bermanfaat bagi sejumlah antibakteri alami lainnya.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka dilakukan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kapsul kerang darah *Anadara granosa* L., yang telah difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis*. dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibakteri isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* secara in-vitro.

I.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai potensi isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. yang telah difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. Selain itu, hasil penelitian ini juga dapat digunakan sebagai acuan untuk pemanfaatan isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. dan mikroalga *Spirulina platensis* sebagai antibiotik baru.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret - Juni 2021 di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

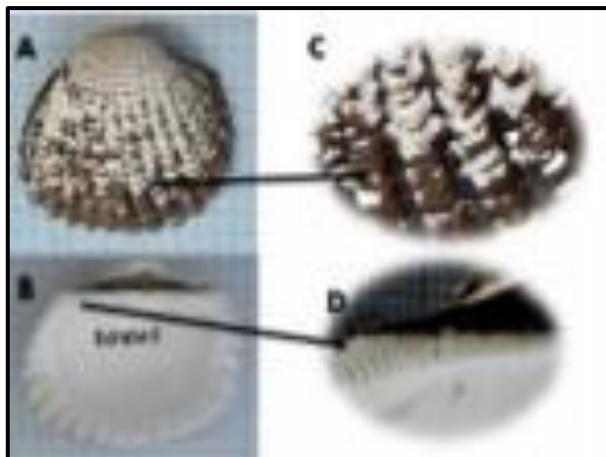
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kerang darah *Anadara granosa* L.

Anadara granosa L. atau biasa disebut sebagai kerang darah merupakan anggota kekerangan dari kelas Bivalvia dan tergolong ke dalam famili *Arcidae* (Ilhamudin *et al.*, 2019). Kerang darah sangat berlimpah di beberapa negara seperti Australia, Vietnam, Cina, Hongkong, Thailand, Filipina, Kaledonia Baru, Jepang dan Indonesia. Kerang darah memiliki potensi ekonomi yang tinggi dengan harga jual mencapai 20.000 - 30.000/kg di pasar lokal. Saat ini kerang darah di pasaran sebagian berasal dari alam (Karnisa *et al.*, 2019).

Kerang darah *Anadara granosa* L. dilihat dari morfologinya memiliki cangkang kanan dan kiri berukuran sama besar dengan bentuk cangkang membulat. Terdapat rusuk yang bercorak radial pada dasar cangkang. Banyaknya rusuk radial pada cangkang 18 - 20. Memiliki bentuk tonjolan-tonjolan kasar pada rusuk radialnya. Umbo sangat menonjol (Zainuddin *et al.*, 2018).



Gambar 1. Morfologi *Anadara granosa* L.: A. Cangkang eksternal; B. Cangkang internal; C. Bentuk rusuk, dan D. Tipe gigi engsel.

Kerang darah *Anadara granosa* L., biasanya hidup di daerah lumpur dan pasir halus. Di beberapa daerah, kerang ini dapat hidup di air dengan kedalaman setinggi 20 m, tetapi umumnya lebih menyukai hidup di daerah litoral dan estuaria. Kerang darah *Anadara granosa* L., juga dikenal sebagai hewan yang bersifat *filter feeder* dengan sumber makanannya berasal dari fitoplankton di dalam air dan mikrofitobentos di sedimen (Soegianto *et al.*, 2019).

Anadara granosa disebut kerang darah karena dagingnya memiliki warna merah kecoklatan, yang berarti terdapat pigmen penghasil darah merah (hemoglobin) yang berfungsi mengikat oksigen dalam daging, sehingga dapat hidup pada kondisi kadar oksigen yang relatif rendah dan masih bisa bertahan hidup walaupun tanpa air (Ilhamudin *et al.*, 2019).

Sebagai biota perairan, kerang darah (*Anadara granosa*) dapat digunakan sebagai bioindikator pencemaran perairan, karena hidup di dasar perairan dan bersifat menetap (Mawardi dan Sarjani, 2017). Memiliki manfaat ekologis dalam siklus rantai makanan yakni sebagai makrobentos di kawasan ekosistem perairan. Selain itu, juga memiliki nilai ekonomis yang banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar sebagai sumber protein (Prasadi *et al.*, 2016), rendah lemak, kaya omega 3 (Setianingsih *et al.*, 2016) dan secara umum sebagai bahan makanan serta obat-obatan (Ilhamudin *et al.*, 2019) dengan kandungan makro nutrisi: protein, lemak total dan karbohidrat serta nutrisi mikro seperti mineral: Ca, Fe, Mg, P, Zn, Cu, Mn, dan Se, asam amino esensial dan vitamin meliputi vitamin A, E, B kompleks, dan C yang dibutuhkan oleh tubuh (Ferial *et al.*, 2020). Menurut Devi *et al.* (2019), bahwa dalam keadaan segar, kerang darah memiliki nilai gizi protein 19,48%, lemak 2,50%, dan air 74,3%. Sementara tepung kerang

darah mengandung sekitar 27, 26% protein, 81,16 ppm zeng, 17020,46 ppm Fe, 4,26 ppm Cu, dan 318,67 ppm Ca. Protein, zeng, dan kalsium berasal dari kerang darah bekerja sama dalam memperbaiki pertumbuhan tulang pada manusia atau hewan (Solang *et al.*, 2016).

Kerang darah *Anadara granosa* L., juga berpotensi sebagai antibakteri dan antimikroba. Hal ini didukung oleh penelitian Daluningrum (2009) dalam jurnal Dewiningsih *et al.* (2017), membuktikan bahwa jaringan lunak kerang darah *Anadara granosa* L. menghasilkan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, steroid, dan flavonoid yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dari *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Ekstrak metanol jaringan lunak tersebut juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus pyogenes*.

II.1.1 Klasifikasi

Berikut ini merupakan klasifikasi dari kerang darah *Anadara granosa* L. (Sitompul, 2019):

Kingdom : Animalia
Phylum : Mollusca
Classis : Bivalvia
Ordo : Arcoida
Familia : Arcidae
Genus : *Anadara*
Species : *Anadara granosa* Linnaeus

II.2 *Spirulina platensis*

Spirulina adalah mikroalga kelompok *Cyanobacteria*, dapat hidup di laut dan air tawar serta merupakan organisme prokariotik yang dapat menghasilkan makanan sendiri (Fransisca dan Dianursanti, 2019). *Spirulina* telah dikenal manfaat makannya selama bertahun-tahun yang lalu. Pada pertengahan tahun 2000-an, produksi *Spirulina* di dunia untuk manusia diperkirakan mencapai lebih dari 1000 ton per tahun. Namun, lebih banyak produktivitasnya yang dibutuhkan oleh industri farmasi sebagai bahan aktif obat dari sumber alam dalam jumlah yang memadai. Dalam hal produksi kuantitas, Amerika Serikat dilaporkan memimpin, kemudian Thailand, India, Jepang, terakhir Cina (Nege *et al.*, 2020).

Spirulina banyak dipelihara secara komersial di banyak negeri, dikenal sebagai salah satu sumber makanan paling bergizi yang tersedia di pasar sebab kandungan proteinnya tinggi (55 - 70%), karbohidrat (15 - 25%), asam lemak sehat (18%) vitamin, mineral dan pigmen (Safari *et al.*, 2020). Selain jumlah proteinnya yang tinggi, *Spirulina* dicirikan oleh adanya perbedaan pigmen seperti klorofil, karoten dan *phycobilins* (*phycocyanin*, *allophycocyanin* dan *phycoerythrin*). Banyak penelitian telah meneliti efek integrasi dari *Spirulina* dalam makanan, terutama yang berhubungan dengan kromofor *phycocyanin* yang telah membuktikan bahwa pigmen ini memberikan berbagai efek, seperti pelindung saraf, hepatoprotektif, anti-inflamasi dan antioksidatif (Marangoni *et al.*, 2017).

Salah satu spesies *Spirulina* yang paling menonjol adalah *Spirulina platensis*. Memiliki bentuk seperti filamen berpilin, tersusun dari trikoma multiseluler, tidak bercabang, dan non heterosistik (Nege *et al.*, 2020). *Spirulina*

platensis yang dikenal sebagai mikroalga mampu beradaptasi pada kondisi lingkungan beragam (Wulandari *et al.*, 2018).



Gambar 2. Morfologi *Spirulina platensis* (Fretes *et al.*, 2012)

Spirulina platensis memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti senyawa fenol dan flavonoid yang secara in-vitro menunjukkan adanya respon imun (Pratiwi *et al.*, 2016). Selain itu, berbagai ekstrak *Spirulina platensis* juga dapat menghambat replikasi virus melalui kelas kalsium trisulfat polisakarida dan menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (Marangoni *et al.*, 2017) seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada konsentrasi 128 dan 256 µg/mL (Wulandari *et al.*, 2018).

Spirulina platensis juga memproduksi senyawa aktif yang bernilai tinggi yaitu fikosianin dan eksopolisakarida. Fikosianin merupakan metabolit intrasel sedangkan eksopolisakarida merupakan metabolit ekstraseluler. Aktivitas antibakteri pada fikosianin diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Sementara ekstrak metanol eksopolisakarida dari *Spirulina platensis* menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri

Micrococcus luteus, *Salmonella typhimurim*, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan zona hambat berturut-turut $7,5\pm 0,7$; $11\pm 1,4$; dan $19,5\pm 0,7$ mm (Wulandari *et al.*, 2018). Menurut Nege *et al.* (2020), ekstrak metanol yang menunjukkan efek aktivitas antimikroba tersebut disebabkan adanya asam lemak γ -linolenic yang merupakan asam lemak antimikroba aktif yang tersedia dalam jumlah besar dalam ekstrak alga.

II.2.1 Klasifikasi

Berikut ini merupakan klasifikasi *Spirulina platensis* (Nege *et al.*, 2020):

Kingdom	: Eubacteria
Subkingdom	: Negibacteria
Phylum	: Cyanobacteria
Classis	: Cyanophyceae
Subclassis	: Oscillatoriothricidae
Ordo	: Spirulinales
Familia	: Spirulinaceae
Genus	: <i>Spirulina</i>
Species	: <i>Spirulina platensis</i>

II.3 *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans adalah bakteri Gram positif berbentuk bulat (*coccus*) dengan diameter 0,5-2,0 μ m, non-motil, tidak berspora dan bersifat fakultatif anaerob (Maghfirah *et al.*, 2017). *Streptococcus mutans* memiliki sel-sel terselubung berlapis banyak, terdiri dari dinding sel dan membran sitoplasma. Dinding sel ini terdiri dari hubungan antara peptidoglikan, asam teikoat,

polisakarida dan protein. Organisme ini bersifat mesofilik dan mampu bertahan hidup pada suhu berkisar antara 18-40°C (Rangnathan dan Akhila, 2019). Beberapa penelitian meyakinkan bahwa *Streptococcus mutans* dapat mengubah lingkungan lokal dengan membentuk sebuah lingkungan kaya EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) dan pH rendah (Lemos *et al.*, 2019).



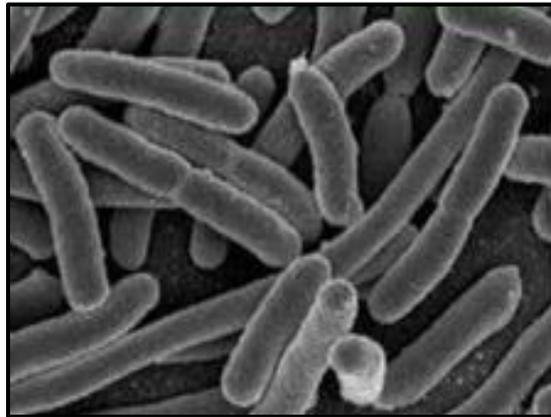
Gambar 3. Morfologi *Streptococcus mutans* (Nugraha, 2008)

Streptococcus mutans merupakan mikroorganisme komersial yang memiliki sejumlah ciri bahwa dalam kondisi lingkungan yang sesuai menentukan patogenisitasnya. Kebanyakan infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini adalah konsekuensi dari proliferasinya dalam tubuh manusia (Krzysciak *et al.*, 2017), seperti infeksi endokarditis, peradangan katup jantung yang mengancam jiwa (Lemos *et al.*, 2019) dan infeksi pada vagina (Jebur, 2012). Selain itu, bakteri *S. mutans* adalah bakteri kariogenik utama dalam proses patogenesis karies dengan membentuk kolonisasi bakteri kemudian menghasilkan biofilm asam organik sebagai produk sampingan dari karbohidrat yang dapat di metabolisme. Asam ini dapat menyebabkan pH lokal turun di bawah nilai kritis, mengakibatkan demineralisasi jaringan gigi. Salah satu hasil produksi *Streptococcus mutans*

terhadap tingkat kariogenisitas adalah kemampuannya melekat pada permukaan gigi (Dianawati *et al.*, 2020).

II.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*. Memiliki sel berbentuk batang pendek (Jamin *et al.*, 2015). Bakteri ini membentuk semacam spora dan tongkat yang berdiameter kira-kira 0,5 mm dan panjangnya antara 1-3 mm (Nurliyana *et al.*, 2018), biasanya hidup di usus besar dan secara alami diekskresikan dalam feses (Beimfohr, 2016).



Gambar 4. Morfologi *Escherichia coli* (Sagar, 2016)

Menurut Septiani *et al.* (2017), *E. coli* merupakan bakteri patogen pada manusia, menyebabkan gangguan pencernaan dan mengganggu sistem kerja dari organ lambung, sebab bakteri ini masuk ke dalam tubuh manusia melalui makanan atau minuman sehingga dapat menyebabkan gejala-gejala seperti kolera, disentri, gastroenteritis, diare dan berbagai penyakit gastrointestinal lainnya (Nisa *et al.*, 2019). Lebih dari 90% *E. coli* juga menginfeksi saluran kemih khususnya pada wanita (Beimfohr, 2016). Bakteri ini juga sebagai penyebab utama dari morbiditas dan mortalitas seluruh dunia (Septiani *et al.*, 2017).

II.5 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang mampu menghambat aktivitas dari bakteri patogen. Bakteri patogen adalah bakteri yang menyebabkan penyakit dan menyebar dengan berbagai cara (Dwicahyani *et al.*, 2018). Secara garis besar antibakteri dibagi menjadi dua jenis yaitu yang membunuh bakteri disebut bakterisidal dan yang hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteriostatik (Etebu dan Ariekpar, 2016).

Antibakteri biasanya terdapat dalam suatu organisme sebagai metabolit sekunder (Septiani *et al.*, 2017). Golongan senyawa metabolit sekunder meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid dan triterpenoid (Fitriah *et al.*, 2017). Saponin memiliki mekanisme kerja dengan merusak membran sel sehingga keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel yaitu protein, asam nukleat, dan nukleotida. Sedangkan flavonoid berperan sebagai antibakteri dengan melakukan kerusakan pada permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom (Febrina *et al.*, 2017). Flavonoid juga dapat membunuh bakteri secara langsung, dan melemahkan patogenesis bakteri (Savitri *et al.*, 2019). Terdapat tanin yang merupakan komponen zat organik kompleks terdiri dari senyawa fenolik yang sulit dipisahkan dan sulit mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Febrina *et al.*, 2017). Fenol dan alkaloid merupakan senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel bakteri. Senyawa fitokimia tersebut berpotensi sebagai antibakteri alami pada bakteri patogen, seperti pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Septiani *et al.*, 2017).

II.6 Mekanisme Kerja Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi atas lima kelompok yaitu:

1. Merusak dinding sel

Sebagian besar sel bakteri terbungkus oleh lapisan yang kaku, terbuat dari peptidoglikan yang terdiri dari polimer gula panjang yang dihubungkan dengan ikatan silang antar peptida. Untuk tetap hidup, bakteri mensintesis peptidoglikan, mereka melakukan ini dengan aktivitas protein pengikat penisilin (PBP) oleh enzim transglukosilase dan transpeptidase. Kedua enzim ini berperan sangat penting dengan menambahkan pentapeptida disakarida untuk memperpanjang untaian glycan dari molekul peptidoglikan yang ada dan juga untaian silang dari unit peptidoglikan yang belum matang. Kebanyakan antibiotik termasuk dalam kelas glikopeptida antibiotik misalnya vankomisin yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan menghambat sintesis peptidoglikan dengan mengikat diri pada unit peptidoglikan serta memblokir transglukosilase dan aktivitas transpeptidase (Etebu dan Ariekpar, 2015).

2. Merusak membran sel

Antibakteri yang tergolong antibiotik merusak membran sel bakteri bersifat spesifik pada setiap kelompok mikroba berdasarkan perbedaan jenis lipid dalam membran sel mikroba. Contohnya, Daptomycin mendepolarisasi membran kalsium dependen. Hal ini mengarah pada penghentian sintesis makromolekul dan gangguan membran seluler pada bakteri. Polimiksin

menyebabkan disintegrasi membran sel bakteri dengan secara efektif mengikat bagian lipid lipopolisakarida dalam sel bakteri (Etebu dan Arikekpar, 2015).

3. Menghambat sintesis protein

Pertama, informasi dalam DNA bakteri digunakan untuk mensintesis molekul RNA yang disebut sebagai messenger RNA (m-RNA), proses yang dikenal sebagai transkripsi. Selanjutnya, struktur makromolekul yang disebut dengan ribosom mensintesis protein yang ada dalam m-RNA, suatu proses yang disebut dengan translasi. Biosintesis protein dikatalisis oleh ribosom dan faktor sitoplasma. Ribosom 70S bakteri terdiri dari dua subunit ribonukleoprotein, subunit 30S dan 50S. Antimikroba menghambat biosintesis protein dengan menargetkan subunit 30S atau 50S dari ribosom bakteri (Kapoor *et al.*, 2019).

4. Menghambat transkripsi

Informasi genetik ditranskripsikan dari DNA ke RNA oleh RNA polymerase yang mengkatalisasi suatu reaksi, mengikat ribonukleotida dengan ikatan fosfodiester. RNA polimerase dibangun oleh subunit 2α , 1β , $1\beta'$, 1ω , dan 1σ . Transkripsi yang dimulai oleh subunit σ yang mengikat promotor memanjang hingga diakhiri oleh terminasi protein P (Rho) yang merupakan RNA-DNA helikase yang melepaskan transkripsi dari DNA templat dengan memutus ikatan hidrogen yang dihasilkan antara DNA templat bersama dengan transkrip DNA (Kirmusaoglu *et al.*, 2019).

5. Menghambat jalur metabolisme

Beberapa antibakteri seperti sulfonamida dan trimethoprim terbukti meniru substrat yang diperlukan untuk metabolisme sel bakteri. Penyebabnya

karena enzim bakteri menempel pada antibiotik yang bukan substrat alami. Khususnya sulfonamida bertindak seperti tetrahidrofolat yang dibutuhkan untuk sintesis asam folat dalam sel bakteri, malah mengganggu produksi asam nukleat (DNA dan RNA) dan asam amino. Diketahui bahwa asam folat sangat penting dalam metabolisme asam nukleat (Etebu dan Ariekpar, 2016).

II.7 Metode Uji Daya Hambat Pada Bakteri

Menurut Balouiri *et al.* (2016), ada beberapa metode uji daya hambat pada bakteri yang dapat digunakan antara lain:

1. Metode Difusi

a. Metode difusi cakram agar

Metode ini banyak digunakan di laboratorium klinis untuk pengujian kerentanan antimikroba. Dengan metode ini, standarisasi dibuat untuk menguji bakteri patogen tertentu seperti *Streptococcus*, *Hemophilus influenzae*, *Hemophilus parainfluenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* dan *Neisseria meningitidis* menggunakan media kultur spesifik, berbagai kondisi kubasi dan kriteria interperatif untuk zona hambatan.

Prosedur metode ini yaitu pelat agar diinokulasi dengan inokulum standar dari mikroorganisme uji, lalu saring kertas cakram berdiameter 6 mm berisi campuran senyawa pada konsentrasi yang diinginkan, ditempatkan pada permukaan agar. Cawan petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. akhirnya, Agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat germinasi dan pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diameter pertumbuhan zona hambat diukur.

b. Metode gradien antimikroba (Etest)

Metode gradien antimikroba menggabungkan prinsip metode pengenceran dengan metode difusi untuk mengurangi penentuan nilai MIC. Ini didasarkan pada kemungkinan menciptakan gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji pada media agar. Dalam prosedurnya, strip diresapi dengan peningkatan gradien konsentrasi agen antimikroba dari satu ujung ke ujung lainnya didendapkan pada permukaan agar-agar, sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Metode ini digunakan untuk penentuan MIC antibiotik, antijamur dan antimikrobakteri. Nilai MIC ditentukan di persimpangan strip dan elips penghambat pertumbuhan.

c. Metode difusi sumur agar

Metode difusi sumur agar banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba tanaman atau ekstrak mikroba. Prosedur dalam metode ini sama halnya dengan metode difusi cakram, permukaan pelat agar diinokulasi dengan menyebarkan volume mikroba di okulum di atas seluruh permukaan agar-agar. Kemudian, dibuat lubang dengan diameter berukuran 6 - 8 mm dilubangi secara aseptik dengan penggerak gabus steril atau tip, dan volume (20-100 μL) agen antimikroba atau ekstrak larutan pada konsentrasi yang diinginkan dimasukkan ke dalam sumur. Selanjutnya, piring agar diinkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji. Agen antimikroba berdifusi masuk dalam media agar dan menghambat pertumbuhan strain mikroba uji.

d. Metode difusi sumbat agar

Metode difusi sumbat agar sering digunakan untuk menyoroti antagonisme antara mikroorganisme. Prosedurnya, membuat kultur agar-agar dari strain yang diinginkan pada media kultur yang sesuai dengan garis-garis rapat pada

permukaan pelat. Selama pertumbuhan, sel mikroba mengeluarkan molekul yang berdifusi di agar mediaum. Setelah inkubasi, pelat agar atau silinder dipotong sebagai Cally dan disimpan pada permukaan agar piring lain yang sebelumnya diinokulasi oleh mikroorganisme uji. Zat berdifusi dari steker ke media agar. Kemudian aktivitas antimikroba dari molekul yang disekresikan oleh mikroba adalah deteksi munculnya zona hambat disekitar agar steker.

1. Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi (KLT-Bioautografi)

Bioautografi merupakan metode spesifik dalam mengidentifikasi atau mendeteksi noda pada kromatogram hasil Kromatografi Lapis Tipis yang memiliki aktivitas antibakteri (Paramita *et al.*, 2018). Pada tahun 1946, Goodall dan Levi menggabungkan kertas kromatografi dengan metode kontak bioautografi untuk mendeteksi perbedaan penisilin. Setelah itu, Fischer dan Lautner memperkenalkan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) di bidang yang sama. Teknik ini menggabungkan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan metode deteksi biologis dan kimiawi. Beberapa pekerjaan telah dilakukan pada penyaringan ekstrak organik, terutama ekstrak tumbuhan untuk aktivitas antibakteri dan antijamur dengan KLT-bioautografi. Terdapat tiga teknik bioautografi untuk inestigasi senyawa antimikroba antara lain:

a. Difusi agar

Metode difusi agar juga dikenal sebagai metode kontak agar, metode ini paling jarang digunakan. Salah satu tekniknya melibatkan transfer melalui difusi agen antimikroba dari kromatogram (PC atau KLT) ke agar piring yang sebelumnya diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Setelah beberapa menit atau jam untuk memungkinkan difusi, kromatogramnya dilepas dan piring agar diinkubasi. Penghambatan pertumbuhan zona muncul di tempat-tempat di

mana senyawa antimikroba kontak dengan lapisan agar.

b. Bioautografi langsung

Bioautografi langsung adalah metode yang paling banyak diterapkan diantara tiga metode. Pelat KLT yang dikembangkan dicelupkan atau disemprotkan dengan suspensi mikroba. Kemudian, bioautogram diinkubasi pada 25°C selama 48 jam dalam kondisi lembab. Untuk visualisasi file pertumbuhan mikroba, garam tetrazolium sering digunakan. Garam-garam ini disemprotkan ke bioautogram dan diinkubasi kembali pada 25°C selama 24 jam atau pada 37°C selama 3 - 4 jam.

c. Bioassay hamparan agar-agar

Metode ini juga dikenal sebagai bioautografi imersi. Ini adalah hibrida dari kedua metode sebelumnya. Pelat KLT ditutup dengan biji cair media agar. Untuk memungkinkan difusi yang baik terhadap senyawa yang diuji ke dalam media agar-agar, pelat dapat ditempatkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum inkubasi. Setelah inkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji, pewarnaan dapat dilakukan dengan pewarna tetrazolium. Ini memberikan definisi yang baik zona hambatan pertumbuhan dan tidak sensitif terhadap kontaminasi.

Secara keseluruhan, KLT-bioautografi adalah cara yang sederhana, efektif dan teknik mahal untuk pemisahan campuran kompleks, dan pada saat yang sama ini melokalisasi konstituen aktif di KLT-piring. Oleh karena itu, dapat dilakukan baik dalam laboratorium dan laboratorium kecil yang hanya memiliki akses peralatan minimum.

2. Metode Dilusi (Pengenceran)

Metode pengenceran adalah yang paling tepat untuk penghentian nilai MIC. Sebab metode ini menawarkan kemungkinan untuk memperkirakan kawinkan konsentrasi agen antimikroba yang diuji pada agar (pengenceran agar) atau media kaldu (makrodilusi atau mikrodilusi). Metode pengenceran agar dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba in-vitro bakteri. Nilai MIC yang direkam ditetapkan sebagai konsentrasi terendah agen mikroba yang diuji yang menghambat pertumbuhan dilihat dari mikroorganisme yang diuji. Metode Pengenceran terdiri atas dua yaitu sebagai berikut:

a. Metode pengenceran kaldu

Pengenceran mikro atau makro kaldu adalah salah satu metode pengujian antimikroba. Prosedurnya melibatkan penyiapan pengenceran dua kali lipat dari agen antimikroba (misalnya 1,2,4,8,16 dan 32 $\mu\text{g} / \text{mL}$) dalam media pertumbuhan cair yang dibagikan dalam tabung dengan volume minimal 2 mL (makrodilusi) atau dengan volume yang lebih kecil menggunakan pelat mikrotitrasi 96-sumur (mikrodilusi). Kemudian setiap tabung atau sumur diinokulasi dengan mikroba inokulum disiapkan dalam media yang sama setelah pencampuran suspensi mikroba disesuaikan dengan skala 0,5 McFarland. Selanjutnya, tabung yang diinokulasi atau 96-sumur pelat mikrotitrasi diinkubasi tanpa kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji.

b. Metode pengenceran agar

Metode pengenceran agar melibatkan penggabungan berbagai variasi konsentrasi yang diinginkan dari agen antimikroba ke dalam agar medium (medium agar cair). Biasanya menggunakan serial dua kali lipat pengenceran diikuti dengan inokulasi mikroba okulum ke permukaan pelat agar. Titik akhir

MIC direkam sebagai konsentrasi agen antimikroba terendah yang tuntas menghambat pertumbuhan dalam kondisi inkubasi yang sesuai.

II.8 Fortifikasi

Fortifikasi pangan adalah proses penambahan mikronutrien ke dalam makanan (Whiting *et al.*, 2016). Pada tahun 2006, WHO dan FAO menerbitkan pedoman untuk fortifikasi makanan dengan mikronutrien, tujuan utamanya adalah untuk membantu negara dalam desain, implementasi, pemantauan, dan evaluasi program fortifikasi pangan dengan tetap memperhitungkan bukti yang sesuai di setiap tahapan program (Neufeld *et al.*, 2017).

Fortifikasi pangan diakui sebagai metode yang baik untuk mencegah malnutrisi yang disebabkan oleh kekurangan makanan (defisiensi mikronutrien). Selama bertahun-tahun fortifikasi pangan telah digunakan sebagai cara yang ekonomis untuk pencegahan mikronutrien malnutrisi. Di negara berkembang telah mencoba melakukan studi yang cukup banyak untuk mengembangkan metode fortifikasi pangan tersebut. Akan tetapi, efisiensi pendekatan fortifikasi pangan untuk memperbaiki status gizi harus dianalisis secara koheren dan berpisah (Chadare *et al.*, 2018).

Fortifikasi pangan terdiri dari asupan nutrisi yang meningkatkan kandungan mikronutrien penting, seperti vitamin dan mineral. Salah satu cara untuk memperkuat makanan adalah dengan mencampurkan makanan mikronutrien. Beberapa faktor yang berkaitan dengan fortifikasi pangan seperti ketersediaan hayati *fortificants*, dan jumlah pangan yang dikonsumsi yang diperkuat sangat berpengaruh terhadap kesehatan. Fortifikasi makanan mengacu

pada peningkatan yang cepat dalam mikronutrien suatu populasi, dan dengan biaya yang masuk akal, terutama jika keuntungannya diperoleh dari teknologi yang ada dan distribusi jaringan lokal yang mencukupi (Chadare *et al.*, 2018).

Fortifikasi makanan dapat dilakukan dengan berbagai bentuk, teknik serta prosedur yang berbeda. Fortifikasi pangan dengan menggunakan mikroalga telah menunjukkan peningkatan dalam parameter nutrisi dan struktural yang berbeda untuk sepuluh tahun terakhir (Sahin, 2019). Mikroalga *Spirulina platensis* yang ditambahkan pada produk makanan fungsional telah banyak dilakukan karena mudah diproduksi dan kaya akan nutrisi serta sumber senyawa bioaktif yang dimiliki untuk meningkatkan karakteristik produk fungsional. Well *et al.* (2017) dalam Jurnal Notonegoro *et al.* (2018), menjelaskan bahwa produksi *Spirulina* dalam jumlah besar telah terjadi di seluruh dunia dan difortifikasi ke dalam makanan untuk meningkatkan protein dan kandungan senyawa aktif seperti salad, minuman, makanan ataupun dijual sebagai suplemen kesehatan.