

**ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI MIKROALGA  
*Nitzschia sp* SEBAGAI ANTIMIKROBA.**

***ISOLATION OF BIOACTIVE PROTEIN AND PEPTIDE FROM  
MICROALGAE Nitzschia sp. AS ANTIMICROBIAL***

**SAKINAH NUR FADILLAH**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
DEPARTEMEN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENEGTAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI MIKROALGA  
*Nitzschia sp* SEBAGAI ANTIMIKROBA.**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Kimia

Disusun dan diajukan oleh

SAKINAH NUR FADILLAH

H012202011

Kepada

**PROGRAM MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**TESIS**

**ISOLASI PROTEIN DAN PEPTIDA BIOAKTIF DARI MIKROALGA  
Nitzschia sp. SEBAGAI ANTIMIKROBA**

**SAKINAH NUR FADILLAH**

**NIM: H012202011**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka Penyelesaian Studi Program Magister Program Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin pada tanggal 17 Maret 2023 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

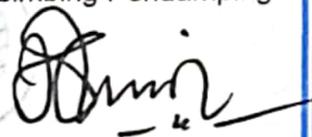
**Menyetujui**

**Pembimbing Utama**



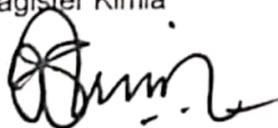
**Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D  
NIP. 196712311991031020**

**Pembimbing Pendamping**



**Dr. Hasnah Natsir, M.Si  
NIP. 196203201987112001**

**Ketua Program Studi  
Magister Kimia**



**Dr. Hasnah Natsir, M.Si  
NIP. 196203201987112001**

**Dekan Fakultas MIPA  
Universitas Hasanuddin**



**Dr. Eng. Amiruddin, M.Si  
NIP. 197205151997021002**

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS  
DAN KELIMPAHAN HAK CIPTA**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sakinah Nur Fadillah  
Nim : H012202011  
Program Studi : Kimia

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Mikroalga *Nitzschia* sp. sebagai Antimikroba adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Ahyar Ahmad, Ph.D sebagai Pembimbing Utama dan Dr. Hasnah Natsir, M.Si sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di *Egyptian Journal of Chemistry*.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 17 Maret 2023



Sakinah Nur Fadillah  
NIM: H012202011

## PRAKATA

Alhamdulillah rabbil alamin, puji dan syukur hanya pantas bagi Allah Yang Maha Rahman yang telah memberi penulis inayah dan kekuatan sehingga penulis bisa menyelesaikan tesis dengan judul **“Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Mikroalga *Nitzschia* sp. sebagai Antimikroba”**

Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah untuk Rasulullah SAW, keluarga dan para sahabat-sahabat beliau yang membawa pencerahan dan rahmat sehingga dunia ini bisa menikmati cahaya Illahi.

Penghargaan dan pengabdian yang tulus dan setinggi-tingginya ku persembahkan untuk kedua orang tua tercinta Ayahanda **Muh. Idris** dan **Siti Marwah** dan untuk suami dan anak **Agy Kusuma Iskandar S.TP** dan **Kaif Alfarizqi** yang telah memberi kekuatan, kepercayaan serta dengan penuh kesabaran dan cinta kasih yang tak ternilai dalam membimbing penulis, senantiasa mendoakan dan memberikan semangat dalam menuntut ilmu hingga semua terwujud. Untuk saudara dan orang-orang terdekatku Kakanda Anti, Pempunk, Ratu terima kasih atas kesediaanya mendengarkan keluh kesah penulis serta dorongan semangat dan doa yang tulus sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Bapak **Prof. Dr. Ahyar Ahmad** selaku pembimbing utama dan Ibu **Dr. Hasnah Natsir, M.Si** selaku pembimbing pertama yang telah berkenan membimbing dan memberikan petunjuk yang begitu berharga dari awal penelitian hingga selesainya penyusunan tesis ini. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih kepada :

1. **Ibu Prof. Dr. Nunuk Hariani Soekamto, S., M.S; Bapak Dr. Abdul Karim, M.Si dan Ibu Dr. Paulina Taba, M.Phil** sebagai tim penguji terima kasih atas bimbingan dan saran-sarannya.
2. Seluruh staf dosen, karyawan, dan analis khususnya **Kak Mahdalia Anis** (Analis Laboratorium Biokimia) yang dengan sabar membantu mengarahkan penulis selama mengerjakan penelitian.
3. Teman-teman penelitian di laboratorium Biokimia (Nure, Besse, Kak Sarni) terima kasih atas dorongan semangat dan bantuannya.
4. Sahabat terbaikku **“A. Tenri Sa’na”**, terima kasih atas dorongan semangat serta inspirasi dalam mengerjakan tesis ini.
5. Teman terbaik selama kuliah **“Andi Nurhayati Latief”**, terima kasih atas dukungannya.

6. Buat analisis Lab. Terpadu Fakultas Peternakan, **Kak Tri** terima kasih atas bantuan, doa, dan dukungannya.
7. Seluruh pihak yang telah membantu mulai dari awal penelitian sampai penyusunan tesis yang tidak sempat penulis sebutkan satu per satu.

Dengan segala kerendahan hati penulis memohon maaf apabila terdapat kekeliruan yang disengaja maupun kekhilafan pribadi penulis dalam penyusunan tesis ini. Penulis menyadari bahwa tesis ini jauh dari kesempurnaan. Untuk itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun dalam perbaikan tesis ini. Akhirnya penulis berharap skripsi ini dapat memberikan pengetahuan dan informasi yang bermanfaat dalam pengembangan bidang ilmu kimia khususnya bidang biokimia.

**Penulis**

**2023**

## ABSTRAK

### SAKINAH NUR FADILLAH. **Isolasi Protein dan Peptida Bioaktif dari Mikroalga *Nitzschia* sp. sebagai Antimikroba**

*Nitzschia* sp. adalah salah satu mikroalga yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif berupa protein dan peptida. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi protein dan peptida dari mikroalga *Nitzschia* sp. yang memiliki aktivitas antimikroba. Tahapan metode penelitian ini meliputi, kultivasi *Nitzschia* sp, isolasi protein, fraksinasi protein, hidrolisis protein, dan ultrafiltrasi. Protein dan peptida yang dihasilkan selanjutnya diuji aktivitas antimikrobanya terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Candida albicans*, dan *Malassezia furfur*. Peptida yang dihasilkan dan memiliki aktivitas antimikroba selanjutnya dianalisis dengan menggunakan LC-MS/MS. Hasil penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas antimikroba fraksi protein 0-20%, peptida (protein hidrolisat), terhadap mikroba uji *Staphylococcus aureus*, dan *Salmonella thypi*. Peptida ukuran 5-10 kDa memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan jamur uji *Candida albicans*. Hasil analisa uji LC/MS/MS pada peptida ukuran 5-10 kDa diperoleh 10 jenis peptida.

Kata kunci : *Nitzschia* sp, protein, antimikroba, peptida

## ABSTRACT

### SAKINAH NUR FADILLAH. **Isolation of Bioactive Protein And Peptide from Microalgae *Nitzschia* Sp. As Antimicrobial**

*Nitzschia* sp. is one of the microalgae that is able to produce bioactive compounds in the form of proteins and peptides. This study aims to isolate proteins and peptides from the microalgae *Nitzschia* sp. which has antimicrobial activity. The stages of this research method is, *Nitzschia* sp cultivation, protein isolation, protein fractionation, protein hydrolysis, and ultrafiltration. The proteins and peptides produced were then tested for their antimicrobial activity against the test microbes *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Candida albicans*, and *Malassezia furfur*. The peptides were then analyzed using LC-MS/MS. The results of this study indicated the presence of antimicrobial activity of the 0-20% protein fraction, peptide (protein hydrolyzate), against the test microbes *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella thypi*. Peptides measuring 5-10 kDa have antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* tested bacteria and *Candida albicans* tested fungi. The results of the LC/MS/MS test analysis on 5-10 kDa size peptides obtained 10 types of peptides.

## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PRAKATA.....	iii
ABSTRAK.....	v
ABSTRACT.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4. Manfaat Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4
2.1 Mikroalga.....	4
2.2. Tinjauan Umum <i>Nitzschia sp.</i> .....	6
2.3 Taksonomi <i>Nitzschia sp.</i> .....	6
2.4 Protein .....	6
2.5 Peptida Biokatif.....	8
2.6 Antimikroba.....	11
2.7 Bakteri .....	13

1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2. <i>Shalmonella typhi</i> .....	15
2.8. Jamur.....	15
1. <i>Candida albicans</i> .....	16
2. <i>Malazessia furfur</i> .....	16
2.9 Penentuan Berat Molekul Protein dengan SDS_PAGE.....	17
2.10 Kerangka Pikir.....	18
2.11. Hipotesis.....	19
BAB III METODOLOGI PENELITIAN.....	20
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
3.2 Alat dan Bahan Penelitian.....	20
3.2.1 Alat Penelitian.....	20
3.2.2 Bahan Penelitian.....	20
3.3 Prosedur Penelitian.....	21
3.3.1 Kultivasi <i>Nitzschia sp</i> .....	21
3.3.2 Perhitungan Jumlah Sel <i>Nitzschia sp</i> .....	21
3.3.3 Isolasi dan Fraksinasi Protein Bioaktif dari <i>Nitzschia sp</i> .....	21
3.3.4 Dialisis Protein Bioaktif dari <i>Nitzschia sp</i> .....	21
3.3.5 Penentuan Kadar Protein dari <i>Nitzschia sp</i> .....	22
3.3.6 Elektroforesis SDS-PAGE Protein dari <i>Nitzschia sp</i> .....	22
3.3.7 Isolasi peptida Bioaktif dari <i>Nitzschia sp</i> .....	22
3.3.8 Pengukuran Derajat Hidrolisis.....	23
3.3.9 Sekuensing Peptida Bioaktif.....	23
3.3.10 Penyiapan Bakteri Uji.....	23
1. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	23

2. Uji Aktivitas Antibakteri.....	24
3.3.10. Penyiapan Jamur Uji .....	24
1. Peremajaan Jamur Uji.....	24
2. Pembuatan Suspensi Jamur Uji.....	24
3. Uji Aktivitas Antijamur.....	24
3.3.11 Analisis Data.....	25
1. Penentuan Kadar Protein.....	25
2. Uji Aktivitas Antimikroba.....	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Kultivasi <i>Nitzschia</i> sp.....	26
4.2 Kurva Pertumbuhan <i>Nitzschia</i> sp.....	27
4.3 Ekstraksi dan Fraksinasi Protein Bioaktif dari <i>Nitzschia</i> sp.....	28
4.4 Dialisis Protein Bioaktif <i>Nitzschia</i> sp.....	28
4.5 Penentuan Kadar Protein <i>Nitzschia</i> sp.....	29
4.6 Elektroforesis SDS-PAGE Fraksi Protein.....	30
4.7 Uji Antimikroba Protein Bioaktif <i>Nitzschia</i> sp.....	32
4.8 Isolasi Peptida Bioaktif <i>Nitzschia</i> sp.....	33
4.9 Uji Antimikroba Peptida Bioaktif dari <i>Nitzschia</i> sp.....	36
4.10 Analisis urutan Asam Amino menggunakan LC-MS/MS.....	37
BAB V PENUTUP.....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	48

**DAFTAR GAMBAR**

1. Gambar 1. Kurva Pertumbuhan Mikroalga .....	5
2. Gambar 2. Morfologi <i>Nitzschia</i> sp .....	6
3. Gambar 3. Ikatan peptida .....	7
4. Gambar 4. Target membran sel bakteri oleh peptida dan dasar selektivitasnya .....	10
5. Gambar 5. Mekanisme interaksi peptida dengan membran sel bakteri..	13
6. Gambar 6. Kerangka pikir .....	19
7. Gambar 7. Kultivasi <i>Nitzschia</i> sp .....	26
8. Gambar 8. Kurva Pertumbuhan <i>Nitzschia</i> sp .....	27
9. Gambar 9. Kadar Protein .....	29
10. Gambar 10. Pita Protein Hasil SDS-PAGE .....	30
11. Gambar 11. Zona Hambat fraksi protein .....	33
12. Gambar 12. Persentase derajat hidrolisis .....	34
13. Gambar 13. Zona hambat protein hidrolisat .....	35
14. Gambar 14. Zona hambat peptida bioaktif .....	36

**DAFTAR TABEL**

Tabel 1. Diameter Zona Hambat fraksi protein dari <i>Nitzschia</i> sp.....	33
Tabel 2. Diameter Zona Hambat protein Hidrolisat dari <i>Nitzschia</i> sp.....	35
Tabel 3. Diameter Zona Hambat Peptida dari <i>Nitzschia</i> sp.....	37
Tabel 4. Hasil Identifikasi peptida 5-10 kDa dari <i>Nitzschia</i> sp.....	38

## DAFTAR LAMPIRAN

1. Prosedur Kerja.....	48
2. Bagan Kultivasi <i>Nitzschia sp.</i> .....	49
3. Bagan Isolasi dan Fraksinasi Protein Bioaktif.....	50
4. Bagan Dialisis Protein Bioaktif.....	51
5. Bagan Penentuan Kadar Protein.....	52
6. Bagan Elektroforesis SDS-PAGE.....	53
7. Bagan Isolasi Peptida Bioaktif.....	54
8. Bagan Pengukuran Dearajat Hidrolisis.....	54
9. Bagan Sekuensing Peptida.....	56
10. Bagan Uji Antibakteri.....	57
11. Bagan Uji Antijamur.....	58
12. Tabel Tingkat Kejenuhan Ammonium Sulfat.....	59
13. Tabel Komposisi Media F (Guillard).....	60
14. Kepadatan Sel <i>Nitzschia sp.</i> .....	61
15. Tabel Fraksinasi Protein.....	62
16. Tabel Kurva Standar Pengukuran Kadar Protein.....	63
17. Tabel pengukuran Kadar Potein masing-masing frkasi protein <i>Nitzschia sp</i> .....	64
18. Pengujian SDS-PAGE.....	65
19. Tabel Perhitungan Derajat Hidrolisis.....	70
20. Analisis LC-MS/MS.....	71
21. Foto-foto penelitian.....	81

**DAFTAR SINGKATAN**

---

AMP	Antimicrobial Peptide
Aw	Activity water
BSA	Bovine Serum Albumin
CBB	Commaise Brilliant Blue
NTP	Faktor Konversi Nitrogen ke Protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid
GI	Gastrointestinal
MHA	Muller Hilton Agar
OPA	Ophthaldialdehyde
PDA	Potato Dextrose Agar
RNA	Ribonucleic Acid
SDA	Saboroud Dextrose Agar

---

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Permukaan bumi ditutupi oleh air laut sekitar 70%, sehingga laut merupakan rumah bagi keanekaragaman hayati yang sangat besar. Keanekaragaman hayati laut tersebut mendorong minat bagi para peneliti untuk mengkaji kandungan senyawa aktif dari organisme laut sebagai sumber bahan aktif baru. Lingkungan di sekitar organisme laut yang ekstrim, agresif dan kompetitif menyebabkan organisme ini menghasilkan metabolit yang dapat digunakan sebagai suplemen nutrisi, dan agen terapeutik. Senyawa metabolit tersebut dapat berupa peptida bioaktif, enzim, asam lemak dan polisakarida yang diperoleh dari organisme laut, seperti rumput laut, moluska, sefalopoda dan mikroalga (Pujiastuti et al. 2019).

Mikroalga menjadi organisme target dalam pencarian molekul antibiotik baru yang diperlukan untuk menghadapi resistensi antibiotik. Resistensi tersebut dapat berdampak pada kemanjuran terapi konvensional terhadap infeksi bakteri pada manusia dan hewan. Mikroalga telah mengembangkan strategi toleransi dan pertahanan untuk melawan paparan bakteri, virus dan jamur patogen (Guzman et al. 2019). Resistensi antibiotik telah menjadi masalah serius dan mempengaruhi hampir semua spesies bakteri dan jamur. Resistensi terhadap beberapa antibiotik telah berkembang di antara banyak patogen umum, seperti *C. albicans*, *staphylococcus*, *pneumokokus*, dan *Pseudomonas* dan masalah ini terus meningkat di seluruh dunia. Strain *S. aureus* resisten terhadap penisilin, tetapi di negara-negara Asia sekitar 70-80% dari strain yang sama resisten metisillin, *C. albicans* resisten terhadap flukanazol (Paul et al. 2019, Ramamourthy et al. 2020).

Mikroalga merupakan kelompok alga mikroskopis dengan organisasi seluler baik eukariotik atau prokariotik (Saha et al. 2015). Mikroalga tersebut ditemukan di perairan dunia sebagai fitoplankton dan merupakan dasar dari rantai makanan di ekosistem perairan. Mikroalga telah mengembangkan jalur metabolisme yang kompleks untuk kelangsungan hidup pada air laut dan air tawar yang sangat kompetitif. Mikroalga melakukan fotosintesis, dengan bantuan matahari, menghasilkan H<sub>2</sub>O dan CO<sub>2</sub> untuk menghasilkan senyawa bioaktif seperti protein,

asam amino, pigmen, polisakarida, senyawa antioksidan, dan senyawa organik kompleks lainnya (Santhos et al. 2016, Sathya et al. 2021, Stack et al. 2020).

Mikroalga memiliki kuantitas dan kualitas protein yang lebih baik jika dibandingkan dengan protein makanan tradisional seperti ikan, telur, dan kedelai. Kandungan protein dari banyak spesies mikroalga sekitar setengah dari total biomassa kering. Beberapa penelitian menunjukkan protein enzim yang dihidrolisis dari mikroalga memiliki nutrisi yang baik dan didapatkan dengan biaya rendah (Barkia et al. 2018). Produk protein saat ini yang dapat diperoleh dari mikroalga berupa protein sel utuh dan konsentrat protein seperti peptida bioaktif hasil hidrolisis (Sierra et al. 2018).

Hidrolisis protein secara enzimatik merupakan proses pemecahan molekul protein menjadi peptida. Peptida yang berasal dari mikroalga terutama diperoleh dengan hidrolisis secara enzimatik menggunakan enzim proteolitik. Menurut Wang dan Zhang (2016) hidrolisis protein menjadi peptida dapat dilakukan dengan menggunakan enzim protease seperti pepsin, tripsin, dan kimotripsin. Peptida tersebut merupakan fragmen khusus yang dapat memiliki aktivitas biologis, seperti antioksidan, antihipertensi, dan antimikroba (Sbroggio et al. 2016).

Peptida antimikroba memiliki aplikasi berbeda sebagai agen antiseptik. Berbagai macam antibiotik yang berasal dari peptida antimikroba digunakan untuk mencegah penyakit menular seksual seperti *Neisseria*, *Chlamydia*, HIV, dan virus herpes simpleks. Peptida antimikroba digunakan dalam radioterapi untuk mendeteksi infeksi bakteri dan jamur dari peradangan, mengingat pengikatan spesifik peptida antimikroba ke membran patogen (Maleki et al. 2020).

Peptida bioaktif dari mikroalga sebagian besar diperoleh dari hidrolisat protein mikroalga hijau seperti *Spirulina*, *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetrademus obliquus*, *Tetracelmis*, dan diatom seperti *Bellerochae*, *Navicula incerta*, dan *Nitzschia sp.* (Ejike et al. 2016, Barkia et al. 2018, Gusman et al. 2019, Sathya et al. 2021). Diatom diklasifikasikan dalam kelas Bacillariophyta yang merupakan organisme eukariotik, dengan dinding sel terbuat dari silikon dan berwarna kuning kecokelatan (Alzahrani, 2018). Barkia et al. 2018 melaporkan peptida bioaktif dari *Bellerochea malleus* dan *Nitzschia sp.* memiliki aktivitas antioksidan dan ACE-inhibitor secara in vitro dan pengujian secara in vitro menunjukkan protein hidrolisat mampu mengurangi tekanan darah sistemik pada hewan uji.

Hasil penelitian Kang et al. 2012 melaporkan bahwa protein hidrolisat *Nitzschia incerta* yang dihidrolisis menggunakan enzim papain memiliki aktivitas

antioksidan dan antihepatotoksis dengan berat molekul 1171 Da dengan berat molekul 1108 Da. Protein hidrolisat *Nitzschia laevis* juga dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, dan antihipertensi (Alzahrani, 2018). *Nitzschia sp.* dilaporkan memiliki senyawa peptida bioaktif yang mampu merusak membran sel bakteri uji *E. coli* (Lu et al. 2014).

Berdasarkan uraian pada latar belakang, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengisolasi protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia sp* yang diharapkan memiliki aktivitas anti mikroba terhadap *S. aureus*, *S. Thypi*, *Malasessia furfur* dan *C. albicans*.

## 1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah protein dan peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antimikroba dapat diproduksi dari *Nitzschia sp*?
2. Bagaimana aktivitas antimikroba protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia sp* terhadap *S. aureus*, *S. thypi*, *C. albicans*, *M. furfur*?
3. Bagaimana efektifitas aktivitas antimikroba protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia sp*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengisoalsi protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia sp*.
2. Menentukan aktivitas antimikroba protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia sp* terhadap mikroba uji *S. thypi*, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *M. furfur*
3. Membandingkan aktivitas protein dan peptida bioaktif sebagai antimikroba.

## 1.4 Manfaat Penelitian

1. Pengembangan ilmu pengetahuan

Penelitian ini diharapkan dapat memberi tambahan informasi ilmiah mengenai bioaktivitas senyawa protein dan peptida bioaktif dari mikroalga *Nitzschia sp*.

2. Menjadi data ilmiah untuk penelitian selanjutnya.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Mikroalga

Mikroalga adalah mikroorganisme fotosintetik baik berupa prokariotik maupun eukariotik dan dapat tumbuh dengan cepat, hidup dalam kondisi yang ekstrim karena morfologinya yang sederhana. Mikroalga prokariotik dikenal sebagai cyanobacteria (Cyanophyceae), dan eukariotik berupa alga hijau (Chlorophyta), dan diatom (Bacillariophyta) (Pacheco et al. 2015)

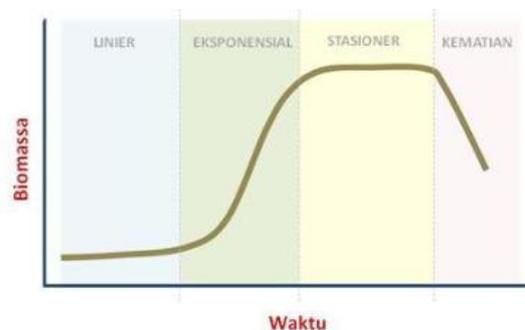
Mikroalga diklasifikasikan sebagai bentuk tumbuhan yang paling primitif. Mekanisme fotosintesis pada mikroalga mirip dengan tumbuhan tingkat tinggi, tetapi mikroalga melakukan proses fotosintesis yang lebih efisien karena struktur selulernya yang sederhana, biasanya tumbuh dalam suspensi air. Mikroalga dapat tumbuh berlipat ganda setiap beberapa jam selama periode pertumbuhan eksponensialnya. Mikroalga biasanya berlipat ganda setiap 24 jam. Beberapa mikroalga dapat berlipat ganda setiap 3,5 jam, selama fase pertumbuhan puncak. Mikroalga mengandung sejumlah besar lipid di dalam struktur selnya. Kandungan minyak mikroalga biasanya antara 20-50% (berat kering) sementara beberapa strain dapat mencapai 80% (Arun dan Singh, 2012).

Mikroalga memiliki gabungan sifat fisik khas antara tanaman tingkat tinggi (seperti kemampuan berfotosintesis) dan mikroorganisme. Mikroalga memiliki pertumbuhan yang cepat dan mampu menghasilkan metabolit primer dan sekunder. Hal inilah yang menjadi faktor perkembangan bioteknologi mikroalga (Guenes, 2011). Mikroalga mampu menghasilkan beberapa senyawa bioaktif yang menunjukkan aktivitas biologis yang beragam dengan efek positif pada kesehatan manusia (Barkia et al. 2019). Mikroalga merupakan sumber protein yang berharga yang dapat dimanfaatkan sebagai komoditas fungsional, nutrisi dan terapeutik. Beragam pendekatan telah dilakukan untuk memproses dan mengkarakterisasi produk protein turunan mikroalga, seperti konsentrat protein, dan peptida bioaktif (Soto-Sierra et al. 2018).

Mikroalga membutuhkan cahaya, gula, CO<sub>2</sub>, nitrogen, fosfor, dan kalium untuk pertumbuhannya. Proses kultivasi dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang secara langsung akan mempengaruhi pertumbuhan dari mikroalga. Faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga diantaranya suhu,

salinitas, dan cahaya. Suhu merupakan faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap proses metabolisme dan fotosintesis. Salinitas sangat penting untuk mempertahankan tekanan osmotik antara sel dengan air sebagai lingkungan hidupnya. Peranan cahaya dalam pertumbuhan yaitu untuk proses fotosintesis dengan menyediakan energi untuk diubah menjadi energi kimia dengan bantuan klorofil (Rafaelina et al. 2015).

Pola pertumbuhan mikroalga berbentuk kurva sigmoid yang terdiri dari empat fase yaitu, fase linier (*lag phase*), eksponensial, stasioner, dan kematian (Gambar.1). Sel-sel mikroalga mulai beradaptasi dengan kondisi lingkungan selama fase pertumbuhan linier. Secara fisiologis, sel-sel tersebut mempersiapkan diri untuk melakukan pembelahan sel pada usia tertentu, dengan cara memproduksi enzim-enzim dan senyawa metabolisme lainnya yang diperlukan untuk pembelahan sel. Selama fase ini, sel-sel yang membelah masih sedikit sehingga jumlah sel tidak banyak mengalami peningkatan, karena itu fase ini disebut juga *lag phase*. Setelah fase pertumbuhan linier, sel-sel memasuki fase pertumbuhan eksponensial, dimana sel-sel membelah diri dengan cepat, enzim dan senyawa-senyawa metabolit yang dibutuhkan untuk pembelahan sel sudah tersedia. Fase pertumbuhan dengan tingkat serapan CO<sub>2</sub> dan laju pembentukan biomassa yang tinggi terjadi pada fase eksponensial. Serapan nutrisi dari media terjadi dengan cepat pada fase pertumbuhan. Ketersediaan nutrisi yang menurun secara cepat pada media merupakan faktor penyebab pertumbuhan mikroalga memasuki fase stasioner, dimana laju pertumbuhan sel seimbang dengan laju kematian sel. Bila faktor-faktor pendukung pertumbuhan semakin terbatas, maka sel-sel mikroalga memasuki fase kematian yang ditandai dengan kematian sel-sel dalam jumlah besar, sedangkan pembelahan sel hampir tidak terjadi (Prayitno, 2016).



Gambar 1 . Kurva Pertumbuhan Mikroalga (Prayitno, 2016).

## 2.2 Tinjauan Umum *Nitzschia sp.*

*Nitzschia sp.* merupakan mikroalga yang termasuk dalam kelas Bacillariophyceae. *Nitzschia sp.* merupakan diatom yang termasuk alga bentik, mempunyai ciri-ciri antara lain bentuk sel memanjang dengan satu setae yang panjang di setiap ujungnya, mempunyai dinding sel yang tipis dan ukuran sel berkisar antara 10-40  $\mu\text{m}$  (Gambar 2). *Nitzschia* memiliki kandungan protein 33%, lemak 21%, dan karbohidrat (serat kasar) 28%. *Nitzschia sp.* merupakan mikroalga bersel tunggal yang berperan penting dalam ekosistem perairan sebagai produsen primer dan pakan alami bagi larva organisme laut seperti krustasea, bivalvia dan ikan (Puspitasari, 2017).

## 2.3 Taksonomi *Nitzschia sp.*

Adapun taksonomi dari *Nitzschia sp.* sebagai berikut:

Divisi : Chrysophyta

Kelas : Bacillariophyceae

Orde : Pennles

Famili : Bacillariaceae

Genus : *Nitzschia*

Spesies : *Nitzschia sp.*



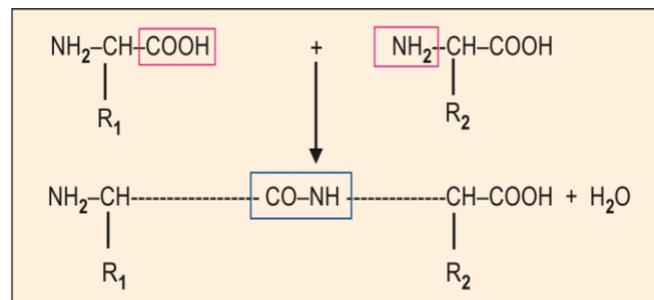
Gambar 2. *Nitzschia sp.* (Kociolek, 2011)

## 2.4 Protein

Protein merupakan senyawa organik kompleks berupa makromolekul polipeptida yang tersusun dari monomer-monomer asam amino melalui ikatan peptida. Protein mengandung Karbon, Hidrogen, Oksigen dan Nitrogen sebagai komponen utama sedangkan Sulfur dan Fosfor adalah konstituen kecil. Nitrogen adalah karakteristik protein. Semua protein adalah polimer dari asam amino (Probosari, 2019).

Struktur protein dipelajari sebagai tingkat primer, sekunder, tersier dan kuarterner. Struktur primer menunjukkan jumlah dan urutan asam amino dalam protein. Tingkat organisasi yang lebih tinggi ditentukan oleh struktur utama. Setiap

rantai polipeptida memiliki urutan asam amino unik yang ditentukan oleh gen. Struktur primer dipertahankan oleh ikatan kovalen dari ikatan peptida (Gambar.3).



Gambar 3. Ikatan peptida (Vasudevan dan Vaidyanathan, 2017)

Protein memiliki fungsi yang spesifik. Protein berfungsi secara biologis dan mengkatalis suatu reaksi metabolik, mengatur pergerakan sel dan molekul. Polipeptida yang membentuk suatu protein mengalami pelipatan membentuk molekul tiga dimensi, dengan pembukaan lipatan protein menyebabkan terjadi perubahan struktur primer menjadi struktur sekunder dan mengubah fungsi dari protein (Sawitri et al. 2013).

Kelarutan protein sangat dipengaruhi oleh pH. Kondisi basa dan asam yang kuat menginduksi muatan bersih pada residu asam amino mikroalga sehingga meningkatkan kelarutan protein. Protein paling tidak larut pada titik isoelektriknya dan biasanya mengendap pada pH ini. Beberapa penulis melaporkan total isolat protein kasar mikroalga yang dilarutkan dalam kondisi basa diikuti dengan pengendapan pada pH isoelektrik. Faktor tambahan yang dapat mempengaruhi kelarutan protein termasuk konsentrasi biomassa, durasi ekstraksi (pelarutan atau pengendapan) dan suhu ekstraksi. Suhu tinggi dapat menyebabkan denaturasi protein dan oleh karena itu penerapannya umumnya tidak digunakan dalam proses isolasi protein (Stack et al. 2020).

Kandungan protein yang tinggi dari berbagai spesies mikroalga menjadikannya sebagai sumber protein alternatif yang potensial. Kandungan protein umumnya diperkirakan dari nilai nitrogen total yang diperoleh secara eksperimental menggunakan faktor konversi nitrogen menjadi protein (NTP) sebesar 6,25. Kandungan dan komposisi protein mikroalga sangat bervariasi di bawah kondisi kultur yang berbeda dan pada tahap pertumbuhan yang berbeda, kemungkinan tidak ada faktor konversi NTP spesifik. Kandungan protein mikroalga yang tinggi dihitung dari total nitrogen, karena pendekatan ini mengasumsikan

bahwa semua nitrogen dalam sampel adalah nitrogen protein, nitrogen dalam DNA, RNA, asam amino mirip mikosporin, dan simpanan nitrogen intraseluler (Stack et al. 2020).

Produk protein saat ini yang dapat diperoleh dari mikroalga dapat diklasifikasikan berdasarkan kandungan proteinnya dan tingkat pemurniannya, sebagai protein sel utuh, isolat, dan peptida bioaktif. Protein sel utuh memiliki jaringan dan struktur seluler yang utuh, padat protein, dan biasanya dikonsumsi langsung (misalnya biji tanaman, sel mikroalga utuh). Protein sel utuh mikroalga mengandung sekitar 40-50% protein, tetapi persentasenya bervariasi berdasarkan spesies dan kondisi pertumbuhan. Untuk mendapatkan produk protein pekat (60-89% per berat kering), seperti konsentrat protein, isolat, hidrolisat, dan peptida bioaktif, protein dari sel mikroalga harus diekstraksi dan protein dipekatkan (Sierra et al. 2018).

## **2.5 Peptida Bioaktif**

Peptida bioaktif didefinisikan sebagai fragmen protein spesifik yang memiliki dampak positif pada fungsi atau kondisi tubuh dan mempengaruhi kesehatan. Peptida bioaktif adalah zat organik yang dibentuk oleh asam amino yang bergabung dengan ikatan kovalen yang juga dikenal sebagai ikatan amida atau peptida dengan berat molekul yang lebih besar. Peptida bioaktif memiliki peran penting dalam metabolisme organisme makhluk hidup dan memiliki aktivitas seperti obat dan diklasifikasikan berdasarkan cara kerjanya sebagai antimikroba, antitrombotik, antihipertensi, opioid, imunomodulator, pengikatan mineral, dan antioksidan (Sanchez dan Vazquez, 2017).

Komposisi dan urutan asam amino menentukan aktivitas peptida begitu dilepaskan dari protein tempat peptida diekstraksi. Proses alami di dalam tubuh dimodulasi oleh interaksi sekuens asam amino spesifik membentuk bagian dari protein (Bhat et al. 2015).

Secara *In vivo*, peptida terenkripsi dapat dibebaskan selama pencernaan gastrointestinal (GI) oleh enzim seperti tripsin atau oleh enzim mikroba. Secara *in vitro*, peptida bioaktif juga dapat dilepaskan selama pemrosesan makanan atau pematangan oleh enzim mikroba (misalnya *Lactobacillus helveticus*). Peptida bioaktif telah diidentifikasi dan diisolasi dari sumber hewani dan nabati dan banyak terdapat dalam hidrolisat protein (Dziuba dan Dziuba, 2014).

Peptida bioaktif dari mikroalga terdiri dari 2-20 asam amino di sepanjang rantai dan menunjukkan analog sebagai hormon yang dilepaskan dari senyawa induk, yang mengandung sifat bermanfaat. Residu kimia pada asam amino sangat penting karena memiliki aktivitas biologis yang bermanfaat untuk kesehatan manusia. Tiga metode yang digunakan untuk menghasilkan peptida bioaktif mikroalga, yaitu ekstraksi pelarut kimia, hidrolisis protein enzimatis, dan fermentasi menggunakan mikroba. Teknik hidrolisis enzimatis merupakan metode yang paling baik digunakan dalam industri biofarmasi dan produk makanan. Hidrolisis enzimatis yang paling umum dan banyak digunakan untuk menyintesis peptida bioaktif dari protein mikroalga untuk aplikasi klinis, dan mengeluarkan zat berbahaya untuk memberikan hasil yang baik dan kemurnian tinggi, dan lebih baik daripada ekstraksi pelarut organik. Beberapa penelitian melaporkan bahwa metode hidrolisis dengan bantuan enzim memberikan hasil yang besar dan jumlah komponen bioaktif yang tinggi. Hidrolisat peptida menunjukkan bioaktivitas dapat diidentifikasi dari protein asli. Cryptein merupakan contoh peptida yang memiliki bioaktivitas alami. Hidrolisis enzimatis ini banyak digunakan untuk metode pemisahan lebih lanjut, yang melibatkan ultrafiltrasi membran dengan beberapa ukuran pori seperti 3, 5, 10, dan 30 kDa dan teknik kromatografi, seperti kromatografi pertukaran ion. Beberapa penelitian melaporkan bahwa metode ekstraksi dengan bantuan enzim memberikan hasil yang besar dan jumlah komponen bioaktif yang tinggi. Hidrolisat peptida menunjukkan bioaktivitas dapat diidentifikasi dari protein asli (Sathya et al. 2021).

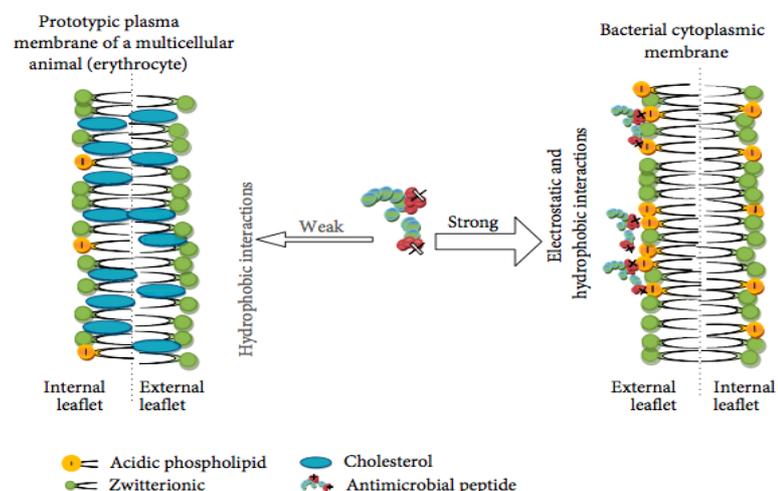
Secara umum, ada dua teknik yang berbeda untuk memproses peptida bioaktif seperti fraksinasi dan pemurnian, seperti teknik ultrafiltrasi (berat molekul) dan kromatografi (pemurnian) seperti pertukaran ion, afinitas, dan permeasi gel digunakan untuk fraksinasi peptida mikroalga. Teknik ini terutama untuk mempelajari struktural dan penentuan massa peptida mikroalga menggunakan spektrometri LC-MS dan LC-MS/MS (Fan et al. 2014).

Peptida sebagian besar diperoleh dari hidrolisat protein dari *Chlorella vulgaris*, *Chlorella ellipsoidea*, *Tetradismus obliquus*, *Navicula incerta*, *Nitzschia sp*, *Bellerocha*, dan *Nannochloropsis oculata* (Ejike et al. 2016, Barkia et al. 2018, Gusman et al. 2019, Sathya et al. 2021) dan memiliki bioaktivitas seperti antioksidan (Barkia et al. 2018, Kang et al. 2012), antihipertensi (Barkia et al. 2018, Pujiasturi, 2019), antikanker (Tejano, 2019, Sadegi et al. 2018), anti-aterosklerotik (Ejike et al. 2017), dan antimikroba (Sadegi et al. 2018).

Peptida yang memiliki aktivitas antimikroba disebut dengan AMP (*Antimicrobial Peptide*). AMP umumnya ada pada organisme, baik organisme prokariotik dan eukariotik. AMP memiliki berat molekul lebih rendah dari 10 kDa dan peptida amfipatik dengan panjang yang bervariasi. Faktor-faktor yang mempengaruhi spesifisitas dan aktivitas biologis peptida, seperti muatan, struktur sekunder, hidrofobisitas, amfipatisitas, dan momen hidrofobik, dan sangat saling bergantung sehingga mengubah satu sifat peptida, dan sering kali menghasilkan perubahan signifikan pada satu atau lebih sifat lainnya (Lee et al. 2016).

Peptida amfipatik ini mengandung residu kationik dan hidrofobik yang berinteraksi dengan membran mikroba melalui interaksi non-spesifik dengan lipid PG/PE. Klasifikasi struktural AMP termasuk  $\alpha$ -heliks (seperti cecropins), kaya sistein (seperti defensin), dan kaya akan Lis, His, Arg, Pro, dan Trp (Lu et al. 2014).

AMP juga dapat menghambat dan memusnahkan parasit patogen, jamur dan virus. AMP dapat menghambat fungsi seluler dengan mengikat RNA dan DNA setelah masuk ke dalam sel jamur. AMP juga bertindak sebagai peptida pertahanan inang yang dapat merangsang respon imun bawaan dan adaptif dari inang (Ramamourthy et al. 2020). AMP menargetkan membran sel tanpa berinteraksi secara khusus namun memiliki selektivitas yang baik dalam menargetkan membran sel bakteri. Permukaan membran bakteri gram negatif dan gram positif yang mengandung lipid bermuatan negatif memberikan daya tarik elektrostatis dengan AMP yang bermuatan positif. Berbeda dengan membran sel hewan yang memiliki komponen netral yang diilustrasikan pada Gambar 4. (Kumar et al. 2018).



Gambar 4. Target membran sel oleh peptida dan dasar selektivitasnya (Ebenhan et al. 2014)

AMP yang mengandung residu Arg atau Lis bermuatan positif dianggap secara selektif memediasi interaksi elektrostatik dengan membran mikroba bermuatan negatif. Gugus guanidinium dari Arg dapat berinteraksi kuat dengan fosfolipid yang bermuatan negatif sehingga meningkatkan toksisitas sel prokariotik. Residu Lis yang mengandung peptida sintetik dan RNA dapat mengikat satu sama lain, suatu sifat penting dalam sel mikroba yang menyebabkan penghambatan sintesis protein seluler, sehingga mengarah pada eradikasi sel. Asam amino hidrofobik triptofan (Trp) dan fenilalanin juga sering ditemukan di AMP. Rantai samping indole Trp dapat secara efektif berinteraksi dengan antarmuka membran mikroba bermuatan negatif bila dibandingkan dengan rantai samping nonpolar lainnya (seperti fenilalanin yang mampu menembus lebih dalam ke membran bilayer) (Ramamourthy et al. 2020).

## **2.6 Antimikroba**

Antimikroba adalah serangkaian bahan kimia yang efektif dalam membatasi, mencegah, atau menghilangkan pertumbuhan mikroba. Mayoritas antimikroba berasal dari produk alami yang awalnya digunakan oleh berbagai organisme untuk bertahan melawan serangan mikroba. Setelah diisolasi dan dikarakterisasi, banyak dari produk alami ini kemudian dimodifikasi untuk menciptakan aktivitas antimikroba tambahan ataupun memperkuat antimikroba yang sudah ada sebelumnya. Tindakan dari banyak agen antimikroba ini khusus untuk jenis patogen tertentu meskipun yang lain dapat mempengaruhi mikroba yang lain (Michael et al. 2014).

Mekanisme dari antimikroba (Paul dan Dutta, 2019) :

1. Menghambat sintesis pada dinding sel
  - a. Menghambat ikatan silang peptidoglikan dengan menonaktifkan transpeptidase.
  - b. Mengikat D-ala-D-ala dan mencegah penggabungan ke dalam peptidoglikan yang sedang tumbuh.
  - c. Menghambat transglycosilasi.
  - d. Menghambat defosforilasi dari pembawa fosfolipid dalam struktur peptidoglycan.
  - e. Mencegah penggabungan D-alanin ke dalam peptidoglikan.

## 2. Menghambat metabolisme sel

- a. Menghambat pembentukan asam tetrahydropteric yang merupakan langkah awal sintesis asam folat.
- b. Menghambat kerja dihydrofolate reductase pada bakteri dan protozoa.
- c. Menghambat biosintesis ubiquinone pada protozoa.
- d. Sebagai penghambat biosintesis asam mycolic pada mycobacterium.

## 3. Menghambat sintesis protein

- a. Berinteraksi dengan sub unit 30S ribosom
- b. Berinteraksi dengan sub unit 50S ribosom.

## 4. Menghambat sintesis asam nukleat

- a. Menghambat proses topoisomerase
- b. Mengubah 5-fluorouracil, sehingga menghambat sintesis thymidylate pada RNA jamur.
- c. Terikat pada RNA jamur.
- d. Menghambat polimerasi RNA pada jamur.

## 5. Mengubah fungsi membran sel

- a. Menghambat 14-demetilasi dari lanosterol ke ergosterol (komponen esensial dari membran jamur).
- b. Terikat pada membran sterol.

Peptida antimikroba hidrofilik pada sel prokariotik (sel bakteri), mengenali lipid anionik pada permukaan luar membran bakteri. Dalam sel eukariotik, lipid anionik ini ditempatkan di sisi sitoplasma membran, fitur struktural ini adalah alasan untuk aktivitas pembunuhan sel peptida antimikroba yang relatif lebih tinggi terhadap sel bakteri daripada terhadap sel eukariotik. Kematian bakteri disebabkan oleh pembentukan pori-pori pada membran bakteri melalui tiga proses pengikatan peptida antimikroba ke membran bakteri, akumulasi peptida antimikroba di dalam membran, dan pembentukan pori-pori untuk perforasi dan pembunuhan sel. Beberapa model menjelaskan peningkatan permeabilitas membran melalui aksi peptida antimikroba. Tiga model terkenal dianggap sebagai mekanisme potensial aksi antimikroba peptida bioaktif: *barel stave model*, *toroidal model*, dan *carpet model* (Gambar. 5) (Maleki et al. 2020) :

### 1. *Barel Stave Model*

Menurut model ini, peptida antimikroba terakumulasi setelah berikatan dengan membran bakteri dan membentuk dimer dan multimer. Struktur seperti

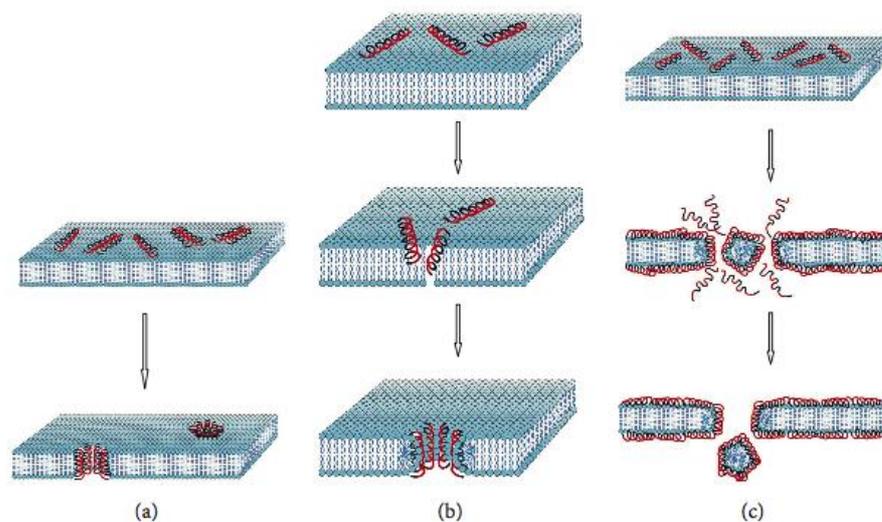
penghalang terbentuk pada membran bakteri oleh akumulasi peptida ini. Multimer ini membentuk beberapa pori pada dua lapisan membran bakteri dan pada akhirnya menyebabkan kematian sel.

### 2. *Toroidal Model*

Jalur pembentukan pori pada model ini mirip dengan model barrel stave. Sambungan lapisan luar dan dalam lipid dengan peptida menuju dua lapisan peptida adalah fitur yang berbeda dari model ini. Model ini digunakan untuk sebagian besar peptida antimikroba, misalnya Melittin.

### 3. *Carpet Model*

Dalam model ini, peptida pertama-tama menutupi permukaan luar membran dalam pola seperti karpet dan kemudian bertindak sebagai deterjen dan lapisan ganda lipid terdegradasi setelah konsentrasi peptida ini mencapai ambang batas.



Gambar 5. Tinjauan mekanisme interaksi yang mungkin mengikuti interaksi peptida dengan membran sel bakteri, (a) barel-stave model, (b) toroidal model, (c) carpet model (Ebenhan et al. 2014).

## 2.7 Bakteri

Bakteri adalah organisme yang paling melimpah dan merupakan satu-satunya organisme yang dicirikan oleh organisasi seluler prokariotik. Kehidupan di bumi tidak dapat ada tanpa bakteri karena bakteri memungkinkan banyak fungsi penting ekosistem, termasuk penangkapan nitrogen dari atmosfer, dekomposisi bahan organik, dan di banyak komunitas akuatik, fotosintesis. Fotosintesis bakteri dianggap sebagai sumber sebagian besar oksigen di atmosfer bumi. Penelitian

bakteri terus memberikan wawasan luar biasa ke dalam genetika, ekologi, dan penyakit. Pemahaman tentang bakteri sangat penting (Mohanna, 2016).

Bakteri memiliki bentuk yang sederhana dan memiliki tiga struktur dasar : bacillus (jamak, basil) berbentuk lurus dan batang, kokus (jamak, cocci) berbentuk bola, dan spiril-lus (jamak, spirilla), panjang dan berbentuk heliks, juga disebut spirochetes. Bakteri spirilia memiliki struktur kompleks di dalam membran selnya. Beberapa bakteri berbentuk batang dan bulat membentuk koloni, menempel ujung ke ujung setelah membelah, membentuk rantai. Beberapa koloni bakteri berubah menjadi struktur bertangkai, tumbuh panjang, filamen bercabang, atau membentuk struktur tegak yang melepaskan spora, badan bersel tunggal yang tumbuh menjadi individu bakteri baru. Beberapa bakteri berfilamen mampu bergerak meluncur, sering dikombinasikan dengan rotasi di sekitar sumbu longitudinal (Mohana, 2016).

Bakteri dikelompokkan berdasarkan morfologi dan reaksi pewarnaannya. Tes biokimia pewarnaan gram merupakan kriteria yang efektif untuk klasifikasi bakteri. Hasil pewarnaan akan menunjukkan perbedaan dasar dan kompleks pada sel bakteri (struktur dinding sel), sehingga dapat membagi bakteri menjadi 2 kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Identifikasi bakteri melalui pewarnaan Gram dinilai praktis (Holderman et al. 2017).

Pertumbuhan bakteri merupakan proses kompleks yang melibatkan banyak reaksi anabolik (sintesis konstituen sel dan metabolit) dan katabolik (pemecahan konstituen sel dan metabolit). Dalam media kultur yang homogen, dalam kondisi ideal, sebuah sel dapat membelah hanya dalam waktu 10 menit (Maier, 2008).

### **1. *Staphylococcus aureus***

*S.aureus* adalah bakteri yang bersifat patogen dan memiliki ketahanan terhadap antibiotik. *S. aureus* menyebabkan berbagai jenis infeksi seperti infeksi kulit ringan, keracunan makanan dan infeksi sistemik. *S. aureus* berbentuk bulat dan memiliki diameter 0,5 – 1,0  $\mu\text{m}$ , hidup berpasangan atau bergerombol (Karimela et al. 2017). *S. aureus* resisten terhadap banyak antibiotik misalnya tetrasiklin, streptomisin, kloramfenikol, ampisilin, eritromisin, dan penisilin. Seiring dengan meningkatnya resistensi bakteri harus diimbangi dengan penemuan obat baru (Diyantika et al. 2017).

*S. aureus* biasanya dibiakkan dalam agar Manitol, yang biasanya dibuktikan dengan adanya perubahan warna merah ke kuning.

*S. aureus* mampu tumbuh pada media yang mengandung natrium klorida 7,5%, namun bakteri lain tidak dapat tumbuh pada konsentrasi garam tersebut. *S. aureus* merupakan penghasil enzim katalase yang mampu menghidrolisis hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) menjadi air dan gelembung gas. *S. aureus* juga menunjukkan kemampuan untuk menghasilkan enzim koagulase yang dapat membedakannya dari *Staphylococcus* jenis lainnya, seperti *Staphylococcus epidermidis* (Hayati et al. 2019).

## 2. *Salmonella thypi*

Bakteri *Salmonella thypi* adalah bakteri bentuk batang, gram negatif, hidup dalam saluran pencernaan manusia maupun hewan. *S. thypi* yang masuk bersama makanan dan minuman yang tercemar akan menyebabkan demam enterik. Demam enterik dapat di kelompokkan menjadi dua yaitu demam tipoid atau tipus (typhus) yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi*, sedangkan demam paratipoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella paratyphi* A, B, dan C (*S. paratyphi* A, B, dan C) (Sandika dan Suwandi, 2017).

Kebanyakan serotipe *Salmonella* tumbuh dengan kisaran suhu 6.7 sampai 45 °C dengan suhu optimum 35 sampai 37 °C, tetapi beberapa serotipe bisa tumbuh di suhu serendah 2 sampai 4 °C atau setinggi 54 °C. *Salmonella* sensitif terhadap panas dan bisa mati pada suhu 70 °C atau lebih (Wahyuningsih et al. 2019).

## 2.8 Jamur

Jamur merupakan organisme heterotrofik, berspora, tidak berklorofil yang memperoleh nutrisi dari senyawa organik (Fitriani, dkk., 2018). Jamur adalah mikroorganisme eukariotik kemoorganotrof yang dapat dibedakan dalam dua bentuk dasar yaitu cendawan dan ragi. Cendawan adalah jamur multiseluler yang memiliki filamen berupa percabangan tubulus yang berbentuk silinder. Sebuah filamen tunggal disebut hifa. Hifa biasanya tumbuh di sepanjang permukaan cabang dan membentuk jumbai kompak. Jika hifa memiliki septum, gerakan sitoplasma dapat terjadi karena adanya pori-pori di tengah septum (Sequeira dan Sen, 2004).

Ragi adalah jamur uniseluler, dimana selnya berbentuk bulat dan oval. Pembelahan sel biasanya terjadi dengan pembentukan tunas, dimana sel baru

terbentuk dari sel induk. Pembentukan septum didahului dengan munculnya cincin filamen yang mengandung kitin dalam jumlah besar (Siquiera dan Sen, 2004).

### **1. *Candida albicans***

*C. albicans* adalah patogen jamur oportunistik yang ada sebagai komensal tidak berbahaya di saluran pencernaan dan genitourinari di sekitar 70% manusia dan sekitar 75% wanita menderita infeksi *Candida* setidaknya sekali dalam hidup mereka. *Candida* menjadi patogen oportunistik untuk pasien *immunocompromised*, untuk beberapa individu imunologis lemah, atau bahkan untuk orang sehat. Infeksi yang disebabkan oleh *C. albicans* umumnya dikenal sebagai kandidiasis. Kandidiasis dapat diklasifikasikan dalam dua kategori tergantung pada tingkat keparahan penyakit. Pada kategori pertama adalah infeksi mukosa dan yang paling terkenal di antara infeksi mukosa ini adalah sariawan yang ditandai dengan bintik-bintik putih pada membran yang terinfeksi. Infeksi ini umumnya mengenai sel epitel gastrointestinal, vagina, atau mukosa orofaring (Kabir et al. 2012).

*C. albicans* ditumbuhkan pada media SDA, memiliki koloni yang khas berwarna putih. Koloni berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin, dan tampak seperti pasta dan berbau sangat khas seperti aroma tape. Secara mikroskopis dengan pewarnaan *actofenol cotton blue* dan lugol dapat diamati struktur seperti ragi atau *yeast like*. Sel ragi atau dikenal dengan blastospora berukuran besar, berbentuk bulat atau seperti botol. Sel ini dapat berkembang menjadi klamidospora yang berdinding tebal. Selain itu pengamatan mikroskopis juga menunjukkan terdapat hifa semu atau *pseudohifa* (Bintari et al. 2020).

### **2. *Malassezia furfur***

*M. furfur* adalah jamur dengan sifat lipofilik dimorfik yang merupakan flora normal pada kulit manusia ditandai dengan bercak lesi yang bervariasi mulai dari hipopigmentasi, kemerahan sampai kecoklatan atau hiperpigmentasi pada kulit, biasanya pada dada, punggung atas, lengan atau perut. Lesinya kronis dan terjadi sebagai bercak-bercak macular (daerah kecil yang berbentuk bulat) pada kulit yang berbeda warna yang bisa membesar dan bergantung, peradangan dan iritasi minimal (Rahmawati dan Rasiyanto, 2019).

Pemilihan media kultur sangat penting untuk mendorong pertumbuhan *Malassezia*. Media yang digunakan untuk pertumbuhan *M. furfur* adalah media SDA (yang merupakan media selektif dengan pH rendah sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Syafina et al. 2020)).

Bentuk koloni *M. furfur* dengan pengamatan secara makroskopis. Memiliki bentuk yang mirip dengan koloni bakteri, berelevasi cembung, berwarna krem kekuningan dan bertekstur lembut, dan dengan pengamatan secara mikroskopik *M. furfur* memiliki spora berbentuk oval dan hifa pendek tidak bercabang. (Alawiyah et al. 2016).

## **2.9 Penentuan Berat Molekul Protein dengan SDS-PAGE**

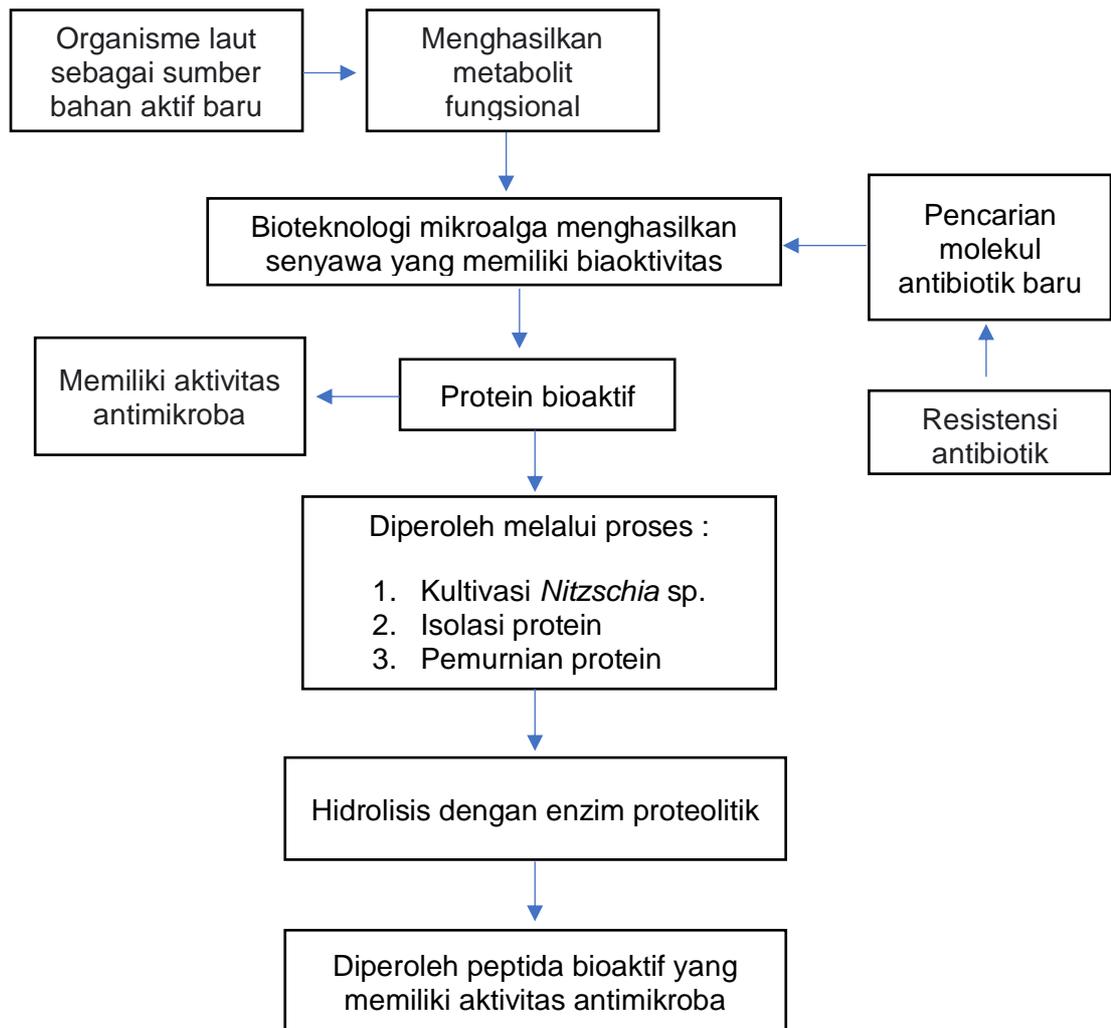
SDS-Page adalah metode elektroforesis untuk menganalisa pita protein secara kualitatif yang digunakan untuk menentukan berat molekul suatu protein dan memantau purifikasi protein. Protein dalam gel diperlihatkan dengan pewarnaan *Commassie Brilliant Blue*. SDS-PAGE menggunakan sistem *gel discontinue* yang terdiri dari *stacking gel* dan *separating gel*. Proses elektroforesis dijalankan pada arus 20 mA dan tegangan 50 volt. Gel kemudian diwarnai dengan *commassie brilliant blue R250* (Kaimudin, 2016).

SDS-PAGE didasarkan pada kemampuan SDS membentuk kompleks dengan protein. SDS berasosiasi dengan molekul protein yang bersifat nonpolar melalui interaksi hidrofobik, sedangkan kepala kutub dari molekul SDS memberikan muatan negatif ke kompleks SDS-protein (Pavlova et al. 2017).

Penentuan berat molekul menggunakan SDS-PAGE dinilai relatif sederhana, terjangkau, cepat dan menguntungkan disebabkan karena besarnya pori gel, serta perbandingan konsentrasi akrilamida dan bis-metilen akrilamida, oleh sebab itu gel poliakrilamida dapat digunakan tidak hanya untuk pemisahan dari berbagai protein, tetapi juga untuk membandingkan berat molekulnya. Migrasi protein di dalam gel poliakrilamida terutama ditentukan oleh muatan molekul dan juga dipengaruhi oleh ukuran molekul. Protein yang dipisahkan dengan SDS-PAGE dapat dikarakterisasi berdasarkan berat molekulnya dengan satuan Kilo Dalton (kDa) (Rachmania et al. 2017).

## 2.10 Kerangka Pikir

Keanekaragaman hayati laut tersebut mendorong minat bagi para peneliti untuk mengkaji kandungan senyawa aktif dari organisme laut sebagai sumber bahan aktif baru. Lingkungan di sekitar organisme laut yang ekstrim, agresif dan kompetitif menyebabkan organisme ini menghasilkan metabolit untuk digunakan sebagai suplemen nutrisi, dan agen terapeutik. Senyawa fungsional peptida bioaktif, enzim, asam lemak tak jenuh, vitamin, dan polisakarida diperoleh dari organisme laut (Pujiastuti et al. 2019). Mikroalga telah menjadi organisme target dalam pencarian molekul antibiotik baru yang diperlukan untuk menghadapi resistensi terhadap antibiotik yang berdampak pada kemanjuran terapi konvensional terhadap infeksi bakteri pada manusia dan hewan. Mikroalga telah mengembangkan strategi toleransi dan pertahanan untuk melawan paparan bakteri, virus, dan jamur patogen (Guzman et al. 2019). Biomassa dari mikroalga memiliki kuantitas dan kualitas protein lebih baik jika dibandingkan dengan protein makanan tradisional. Protein enzim yang dihidrolisis dari mikroalga memiliki bioaktivitas. Salah satu mikroalga yang memiliki bioaktivitas sebagai antimikroba adalah *Nitzschia sp.* *Nitzschia sp.* menghasilkan senyawa antimikroba berupa peptida bioaktif yang dapat diperoleh dengan beberapa tahap diantaranya kultivasi *Nitzschia sp.*, isolasi dan pemurnian protein, hidrolisis protein. Peptida bioaktif yang dihasilkan diuji aktivitas antimikrobanya yang ditunjukkan pada Gambar 6.



Gambar 6. Kerangka Pikir Penelitian

## 2.11 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diajukan dalam penelitian ini berdasarkan kerangka pikirnya diantaranya :

1. *Nitzschia* sp menghasilkan protein dan peptida bioaktif yang memiliki aktivitas antimikroba.
2. Protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia* sp mampu menghambat pertumbuhan mikroba uji *S. thypi*, *S. aureus*, *C. albicans*, dan *M. fufur*.
3. Protein dan peptida bioaktif dari *Nitzschia* sp memiliki efektivitas antimikroba yang berbeda.