

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Spirulina memiliki berbagai manfaat penting dalam budidaya perairan, terutama sebagai pakan alami yang bernilai gizi tinggi. Mikroalga ini mengandung protein dalam jumlah besar, lengkap dengan asam amino esensial, vitamin, mineral, dan asam lemak tak jenuh seperti gamma-linolenic acid (GLA), sehingga sangat efektif digunakan sebagai pakan tambahan untuk ikan, udang, dan organisme budidaya lainnya. Pemberian spirulina terbukti mampu meningkatkan laju pertumbuhan, efisiensi pemanfaatan pakan, serta daya tahan tubuh hewan akuatik. Kandungan pigmen alami seperti fikosianin dan beta-karoten juga berfungsi sebagai antioksidan yang memperkuat sistem imun. Selain itu, spirulina sering digunakan dalam budidaya ikan hias karena mampu mempercerah warna tubuh ikan secara alami berkat kandungan karotenoidnya. Dalam hal kesehatan lingkungan budidaya, spirulina dapat membantu menekan pertumbuhan mikroorganisme patogen dan mengurangi ketergantungan pada penggunaan antibiotik. Meskipun bukan fungsi utamanya, spirulina juga dapat membantu menjaga stabilitas kualitas air dalam sistem budidaya tertutup atau akuaponik. Karena dapat dibudidayakan dengan memanfaatkan limbah organik, spirulina sangat cocok diterapkan dalam sistem budidaya berkelanjutan untuk mendukung efisiensi dan ramah lingkungan.

Salah satu sumber bahan antibakteri potensial berasal dari mikroalga alami, salah satunya adalah *Spirulina platensis*, mikroalga berwarna hijau kebiruan yang termasuk dalam kelompok Cyanobacteria. Spirulina tersebar luas di berbagai wilayah Indonesia dan dikenal memiliki kandungan nutrisi tinggi seperti protein, vitamin, mineral, serta pigmen bioaktif seperti fikosianin, klorofil, beta karoten, dan xantofil. Mikroalga ini bersifat autotrof dan memiliki morfologi khas berupa sel silindris yang membentuk koloni spiral (heliks), sehingga juga dikenal sebagai alga biru-hijau berfilamen (Buwono & Hasanah, 2018). Selain itu, Spirulina memiliki berbagai manfaat kesehatan seperti meningkatkan sistem imun, bersifat antioksidan, antiinflamasi, serta berpotensi sebagai agen antimikroba alami yang ramah lingkungan.

Infeksi akibat bakteri patogen masih menjadi permasalahan kesehatan yang serius, baik pada manusia, hewan, maupun organisme akuatik seperti ikan. Hingga saat ini, antibiotik merupakan terapi utama dalam penanggulangan infeksi bakteri. Namun, penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak terkontrol telah menimbulkan permasalahan resistensi antimikroba, yaitu kemampuan bakteri untuk bertahan terhadap efek antibiotik (Pradipta *et al.*, 2012). Kondisi ini mendorong kebutuhan mendesak akan pengembangan agen antibakteri alternatif yang efektif namun tidak memicu resistensi.

Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa *Spirulina platensis* memiliki potensi sebagai agen antibakteri. Misalnya, Elshouny *et al.* (2017) menemukan bahwa ekstrak etanol Spirulina mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian lain oleh Nihal *et al.* (2018) juga membuktikan bahwa ekstrak air Spirulina efektif terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Cutibacterium acnes*. Aktivitas antibakteri ini diduga dipengaruhi oleh faktor lingkungan selama proses kultivasi, termasuk pH media, yang memengaruhi metabolisme sel dan sintesis metabolit sekunder bioaktif.

Penggunaan parameter pH berbeda dalam kultivasi bertujuan untuk mengoptimalkan produksi senyawa antibakteri. Beberapa studi, seperti yang dilakukan oleh Raoof *et al.* (2006) dan Safaei *et al.* (2019), menunjukkan bahwa variasi pH berpengaruh terhadap laju pertumbuhan dan komposisi biokimia *Spirulina*, termasuk kandungan fikosianin, protein, dan polisakarida yang semuanya berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri.

Berbeda dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan ekstrak pelarut organik atau air, dalam penelitian ini *Spirulina* digunakan dalam bentuk utuh (non-ekstrak). Pendekatan ini bertujuan untuk mempertahankan integritas seluruh senyawa bioaktif alami yang mungkin hilang atau terdegradasi selama proses ekstraksi. Selain itu, penggunaan biomassa *Spirulina* utuh lebih mencerminkan aplikasi praktis di bidang akuakultur, misalnya sebagai aditif pakan atau bahan campuran media perendaman, di mana mikroalga tidak melalui proses ekstraksi. Hal ini juga mempertimbangkan efisiensi biaya dan kemudahan aplikasi di lapangan, sehingga hasil penelitian ini memiliki nilai terapan yang lebih tinggi bagi pengembangan terapi alternatif terhadap infeksi bakteri.

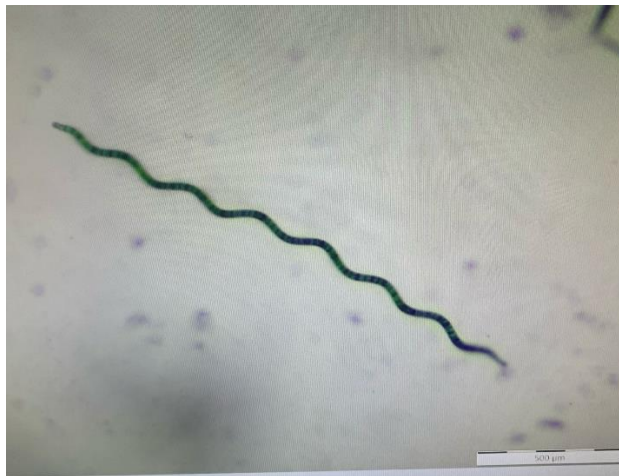
Khususnya dalam bidang akuakultur, infeksi bakteri seperti *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menjadi ancaman serius karena dapat menyebabkan luka, infeksi sekunder, maupun infeksi sistemik pada ikan. Oleh karena itu, penelitian mengenai potensi antibakteri *Spirulina* terhadap kedua bakteri ini menjadi sangat relevan. Beberapa studi melaporkan bahwa *Spirulina*, baik dalam bentuk ekstrak air maupun pelarut organik, mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri tersebut. Pemberian *Spirulina* dalam pakan ikan juga terbukti meningkatkan daya tahan tubuh ikan terhadap infeksi bakteri secara tidak langsung melalui peningkatan sistem imun.

Berdasarkan uraian tersebut, dapat disimpulkan bahwa *Spirulina platensis* memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai agen antibakteri alternatif, terutama terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* yang merupakan patogen umum pada ikan. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibakteri *Spirulina* yang berasal dari wilayah Indonesia menggunakan metode difusi agar, metode standar dalam pengujian antimikroba, untuk menentukan sensitivitas bakteri terhadap senyawa antibakteri pada konsentrasi tertentu.

## 1.2 Teori

### 1.2.1 Biologi *Spirulina platensis*

*S. platensis* merupakan mikroalga yang menyebar secara luas, dapat ditemukan di berbagai tipe lingkungan, baik di perairan payau, laut dan tawar (Ciferri, 1983). Ciri-ciri morfologinya yaitu filamen yang tersusun dari trikoma multiseluler berbentuk spiral yang bergabung menjadi satu, memiliki sel berkolom membentuk filamen terpilih menyerupai spiral, tidak bercabang, autotrof, dan berwarna biru kehijauan (Gambar 1).



**Gambar 1.** *Spirulina platensis* (Dokumentasi pribadi).

Bentuk tubuh *S. platensis* yang menyerupai benang merupakan rangkaian sel yang berbentuk silindris dengan dinding sel yang tipis, berdiameter 1-12  $\mu\text{m}$ . Filamen *Spirulina* sp. hidup berdiri sendiri dan dapat bergerak bebas (Tomaselli, 1997). *S. platensis* berwarna hijau tua di dalam koloni besar yang berasal dari klorofil dalam jumlah tinggi. *S. platensis* memiliki struktur trichoma spiral dengan filamen-filamen bersifat mortal dan tidak memiliki heterosit. Sel *S. platensis* berukuran relatif besar yaitu 110  $\mu\text{m}$ , sehingga dalam proses pemanenan dengan menggunakan kertas saring lebih mudah (Borowitzka M.A., 1988). Klasifikasi *S. platensis* menurut Bold dan Wyne (1985) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Protista  
 Divisi : Cyanophyta  
 Kelas : Cyanophyceae  
 Ordo : Nostocales  
 Famili : Oscillatoriaceae  
 Genus : *Spirulina*  
 Spesies : *Spirulina platensis*

Struktur sel *Spirulina* hampir sama dengan tipe sel alga lainnya dari golongan cyanobacteria. Dinding sel merupakan dinding sel gram-negatif yang terdiri dari 4 lapisan, dengan lapisan utamanya tersusun dari peptidoglikan yang membentuk lapisan koheren. Peptidoglikan berfungsi sebagai pembentukan pergerakan pada *S. platensis* yang membentuk spiral teratur dengan lebar belokan 26-28  $\mu\text{m}$ , sedangkan sel-sel pada trichoma memiliki lebar 6-8  $\mu\text{m}$  (Eykelenburg, 1977). Bagian 4 tengah dari nukleoplasma mengandung beberapa karboksissom, ribosom, badan silindris, dan lemak. Membran tilakoid berasosiasi dengan pikobilisom yang tersebar disekeliling sitoplasma. *Spirulina* sp. mempunyai kemampuan untuk berfotosintesis dan mengubah energi cahaya menjadi energi kimia dalam bentuk karbohidrat (Mohanty *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Kandungan Nutrisi

Analisis kimia dari *S. platensis* dimulai pada tahun 1970 yang menunjukkan *Spirulina* sebagai sumber yang sangat kaya protein, vitamin dan mineral.

Kandungan protein pada *S.platensis* bekisar antara 60%-70% dari berat kering, mengandung provitamin A tinggi, sumber  $\beta$ -karoten yang kaya vitamin B12 dan digunakan dalam pengobatan anemia, kandungan lipid sekitar 4-7%, serta karbohidrat sekitar 13,6% (Carrieri *et al.*, 2010). *S.platensis* juga mengandung kalium, protein dengan kandungan Gamma Linolenic Acid (GLA) yang tinggi (Tokusoglu dan Uunal, 2006) serta vitamin B1, B2, B12 dan C (Brown *et al.*, 1997), sehingga sangat baik apabila dijadikan pakan ataupun bahan untuk makanan dan obat-obatan.

Komposisi pigmen pada *S. platensis* merupakan komposisi pigmen yang kompleks dan umum ditemukan pada alga biru hijau. Komposisi tersebut diantaranya adalah klorofil- a, xanthophyll, fikosianin dan karotenoid yang terdiri dari myxoxanthophyll, beta karoten, dan zeaxanthin (Christwardana dan Hadiyanto, 2012).

*S.platensis* dapat ditumbuhkan dalam media yang berbeda bahkan dalam media limbah. *S.platensis* tumbuh dengan memanfaatkan gula sebagai sumber karbon, dan hidrolisat protein sebagai sumber nitrogen. Bahan-bahan organik yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroalga ini terdapat melimpah dalam limbah–limbah yang berasal dari tanaman seperti limbah tapioka, limbah lateks, dan kelapa sawit. Berdasarkan penelitian dari Sumiarsa *et al.*, (2011), diketahui bahwa *S.platensis* berhasil dijadikan sebagai biofilter pada limbah cair peternakan sapi. Limbah cair peternakan sapi mengandung bahan organik yang dimanfaatkan oleh *S.platensis* sebagai bahan makanan khususnya nitrat (NO<sub>3</sub>). Nitrat adalah bentuk nitogen utama diperairan alami dan merupakan nutrisi utama dalam pertumbuhan alga (Effendi, 2003).

### 1.2.3 Faktor Pertumbuhan

Kelangsungan hidup dan pertumbuhan suatu mikroalga sangat erat kaitannya dengan ketersediaan nutrisi (unsur hara) serta kondisi lingkungan. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh media kultur/nutrien, intensitas cahaya, pH, aerasi dan suhu (Lavens and Sorgeloos, 1996).

#### a. Media Kultur/Nutrien

Nutrien merupakan faktor yang sangat penting untuk pertumbuhan dan komposisi biokimia mikroalga. Kondisi nutrisi yang optimum diperlukan untuk mendapatkan nilai produktivitas kultur mikroalga yang tinggi disertai kualitas biomassa yang baik. Konsentrasi nutrisi yang rendah dapat menyebabkan penurunan laju pertumbuhan karena sel-sel alga kekurangan unsur makanan. Pertumbuhan *S.platensis* membutuhkan bermacam-macam nutrisi yang secara umum dibagi menjadi unsur makro dan unsur mikro. Unsur makro merupakan nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah besar yaitu terdiri atas N, P, K, Na, S, C, H, O, Mg. Sementara itu, unsur mikro merupakan nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit yaitu terdiri atas Bo, Mo, Cu, Zn dan Co (Fogg and Thake, 1987). Komponen vitamin yang tersedia dalam media juga dapat mempercepat pertumbuhan terutama kandungan vitamin B12 (Becker, 1995; Andersen, 2005). Menurut Richmond (1988) dalam Borowitzka (1994), faktor utama dalam media sangat bergantung pada komposisi hara nitrogen dan fosfor. Berkurangnya nitrogen dan fosfor menyebabkan penurunan konsentrasi CO<sub>2</sub> dan O<sub>2</sub>.

Nitrogen merupakan komponen esensial dari struktur dan fungsional protein pada sel mikroalga. Secara umum, mikroalga memiliki kemampuan yang terbatas untuk

memproduksi material penyimpan nitrogen ketika tumbuh pada kondisi nitrogen yang mencukupi kecuali sianofisin dan fikosianin (Boussiba and Richmond, 1980). Sementara fosfor adalah makro nutrisi yang memegang peranan penting dalam proses metabolisme seluler dengan membentuk berbagai struktur dan fungsi dari komponen-komponen yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroalga. Beberapa gejala dari kekurangan fosfor mirip pada kultur dengan nitrogen terbatas. Kandungan klorofil cenderung mengalami penurunan sedangkan kandungan karbohidrat akan mengalami peningkatan pada kondisi penurunan senyawa fosfor (Belay, 2002).

## **b. Intensitas Cahaya**

Cahaya merupakan sumber energi dalam proses fotosintesis yang berguna untuk pembentukan senyawa karbon organik. Intensitas cahaya sangat menentukan pertumbuhan fitoplankton yaitu dilihat dari lama penyinaran dan panjang gelombang yang digunakan untuk fotosintesis. Cahaya berperan penting dalam pertumbuhan mikroalga, tetapi kebutuhannya bervariasi yang disesuaikan dengan kedalaman kultur dan kepadatannya. Kedalaman dan kepadatan kultur yang lebih tinggi menyebabkan intensitas cahaya yang dibutuhkan tinggi. Akan tetapi, intensitas cahaya yang terlalu tinggi dapat menyebabkan fotoinhibisi dan pemanasan. Penggunaan lampu dalam kultur mikroalga minimal dinyalakan 18 jam per hari, hal tersebut dilakukan sampai mikroalga dapat tumbuh dengan konstan dan normal (Coutteau, 1996). Menurut Suryati (2002), intensitas cahaya yang optimal untuk pertumbuhan *S.platensis* berkisar antara 1500-3000 lux dan tidak melebihi 4000 lux untuk menghindari foto inhibisi.

## **c. pH**

Penentuan kisaran pH media kultur penting untuk pertumbuhan *S.platensis*. Kisaran pH merupakan salah satu faktor penentu bagi pertumbuhan *S.platensis* yang dapat menentukan kemampuan biologi mikroalga dalam memanfaatkan unsur hara (Fogg and Thake 1987). Kisaran pH berperan untuk menentukan konsentrasi CO<sub>2</sub> dan keseimbangan antara bikarbonat dan karbonat. Keberadaan CO<sub>2</sub> sebagai hasil perubahan bikarbonat menjadi karbonat berlangsung sampai absorpsi dari udara mencapai keadaan seimbang dengan penggunaan CO<sub>2</sub> oleh *S. platensis* pada saat pH meningkat sampai melewati ambang batas maka kecepatan metabolisme dari *S.platensis* akan menurun. Selain itu, pH juga berpengaruh terhadap penyediaan nutrisi dan keadaan fisiologis *S. platensis* (Ciferri, 1983).

Derajat keasaman atau pH digambarkan sebagai keberadaan ion hidrogen. Variasi pH dapat mempengaruhi metabolisme dan pertumbuhan kultur mikroalga antara lain mengubah keseimbangan karbon anorganik, mengubah ketersediaan nutrisi dan mempengaruhi fisiologi sel. Kisaran pH untuk pertumbuhan *S. platensis* antara 8,5 –10,5 (Cifferi, 1983).

#### d. Suhu

Suhu merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi pertumbuhan fitoplankton. Perubahan suhu berpengaruh terhadap proses kimia, biologi dan fisika. Peningkatan suhu dapat menurunkan suatu kelarutan bahan dan dapat menyebabkan peningkatan kecepatan metabolisme dan respirasi fitoplankton di perairan. Secara umum suhu optimal dalam kultur mikroalga berkisar antara 20- 30°C (Hariyati, 2008). Suhu dalam kultur diatur sedemikian rupa bergantung pada medium yang digunakan. Suhu di bawah 16°C dapat menyebabkan kecepatan pertumbuhan turun, sedangkan suhu diatas 36°C dapat menyebabkan kematian. Beberapa mikroalga tidak tahan terhadap suhu yang tinggi. Pengaturan suhu dalam kultur mikroalga dapat dilakukan dengan menggunakan alat pengatur suhu udara (Taw, 1990).

Menurut Lavens and Sorgeloos (1996), *S. platensis* yang paling umum dibudidayakan mampu mentolerir suhu antara 16 dan 27°C. Suhu lebih rendah dari 16°C akan memperlambat pertumbuhan, sedangkan yang lebih tinggi dari 35°C akan mematikan bagi sejumlah spesies.

#### 1.2.4 Bakteri Patogen pada Ikan

Bakteri patogen merupakan mikroorganisme penyebab penyakit yang dapat menyerang ikan dan dapat menimbulkan kematian massal pada ikan budidaya (Pardamean *et al.*, 2021). Penyakit bakteri yang menyerang ikan merupakan salah satu jenis penyakit infeksius. Penyakit ini terjadi dari interaksi yang tidak serasi antara tiga komponen utama, yaitu lingkungan, biota, dan organisme penyebab penyakit (Irianto, 2005).

Berdasarkan perbedaan komposisi dan struktur dinding selnya, bakteri dibedakan menjadi Gram-positif seperti *S. aureus* dan Gram-negatif seperti *E. coli*. Perbedaan susunan dinding sel dapat menyebabkan perbedaan kesensitifan bakteri terhadap senyawa tertentu. Bakteri Gram-positif memiliki struktur dinding sel yang tebal (15-80 nm) dan mempunyai lapisan tunggal (mono) peptidoglikan sebagai lapisan tunggal yang merupakan komponen utama dimana lebih dari 50% berat kering pada beberapa bakteri (Pelczar & Chan, 1988).

##### a. *S. aureus*

*Staphylococcus* berasal dari kata *staphyle* berarti untai buah anggur dan *coccus* berarti bakteri yang memiliki morfologi berbentuk bulat seperti buah anggur dengan diameter 0,75-1,25µm, termasuk bakteri gram positif anaerobic fakultatif, tidak membentuk spora, dan non motil (Lisnawati dan Prayoga, 2020). Namun kadang ditemukan gram negatif diantara segerombolan bakteri yang telah difagosit dan biakan yang hampir mati (Warsa, 2011).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang mempunyai daya tahan paling kuat, karena termasuk golongan bakteri yang tidak memiliki kemampuan membentuk spora. Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat hidup selama lebih dari satu bulan di keadaan kering padakain, benang, dan dalam nanah (Syahrurahman *et al.*, 2010). *Staphylococcus aureus*

mudah tumbuh dalam media dengan suhu 37°C dan kondisi aerobik.

Bakteri *Staphylococcus aureus* tumbuh optimum pada pH 7,4 dan suhu 37°C, dapat ditumbuhkan dengan menginokulasi ke Nutrient Broth. Media Nutrient Broth termasuk dalam media cair yang paling sering digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Pada pembedahan padat bila diamati dibawah mikroskop bakteri ini akan nampak bergerombol seperti buah anggur, sedangkan pada pembedahan cair akan membentuk rantai pendek dengan susunan lebih dari empat sel Lisnawati dan Prayoga (2020).

#### **b. *E. coli***

*Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang termasuk golongan coliform dan hidup normal di dalam kotoran manusia maupun hewan, oleh karena itu disebut juga koliform fekal. *E. coli* adalah bakteri bersifat Gram negatif, berbentuk batang dan tidak membentuk spora, *E. coli* umum ditemukan dalam air, sehingga keberadaannya dalam air dapat dianggap sebagai petunjuk terjadinya pencemaran kotoran dalam arti luas, baik dari kotoran hewan maupun manusia (Nuha, 2013).

Selain sebagai indikator pencemaran, beberapa strain *E. coli* juga diketahui bersifat patogen dan dapat menyebabkan berbagai penyakit, mulai dari diare ringan hingga infeksi saluran kemih, bahkan infeksi sistemik seperti sepsis. Strain patogen seperti *E. coli* enterotoksigenik (ETEC), enteropatogenik (EPEC), dan enterohemoragik (EHEC) memiliki faktor virulensi spesifik, seperti toksin atau adhesin, yang memungkinkan mereka menginfeksi jaringan inang. Oleh karena itu, pengendalian pertumbuhan dan penyebaran *E. coli* menjadi hal yang penting tidak hanya dalam konteks lingkungan, tetapi juga dalam industri pangan dan kesehatan masyarakat.

Dalam penelitian ini, keberadaan *E. coli* digunakan sebagai model bakteri Gram negatif untuk menguji aktivitas antibakteri dari ekstrak *Spirulina platensis*. Karakteristik dinding sel Gram negatif yang terdiri dari lapisan peptidoglikan tipis dan membran luar lipopolisakarida membuat *E. coli* cenderung lebih resisten terhadap berbagai jenis agen antimikroba dibandingkan bakteri Gram positif. Oleh sebab itu, efektivitas ekstrak *S. platensis* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* dapat menjadi indikator potensi senyawa bioaktif dalam mikroalga tersebut, terutama terhadap bakteri dengan struktur sel kompleks. Hasil uji zona hambat yang relatif kecil menunjukkan bahwa senyawa antibakteri dalam *Spirulina* mungkin memiliki keterbatasan dalam penetrasi atau efektivitas terhadap bakteri Gram negatif ini, sehingga perlu dilakukan optimasi lanjutan baik dari segi metode ekstraksi maupun konsentrasi senyawa aktif yang digunakan.

### **1.2.5 Uji Aktivitas Antibakteri**

Pengujian antibakteri merupakan metode yang bertujuan untuk menentukan potensi suatu zat yang diduga atau telah memiliki aktivitas sebagai antibakteri dalam larutan terhadap suatu bakteri (Datu, 2017). Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini menggunakan metode difusi agar (Zainuddin, 2006).

Metode difusi agar digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba atau

sering juga dinamakan uji daya hambat. Metode difusi agar dilakukan dengan bahan uji yang telah dilarutkan dalam pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam sumuran atau diteteskan pada *paper disc*. Selanjutnya ditanam dalam medium padat yang telah berisi mikroba uji. Setelah inkubasi diamati adanya zona bening di sekitar sumuran atau *paper disc*. Kemampuan bahan uji menghambat bakteri uji ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar *paper disc* uji dan dievaluasi dimana ukuran zona bening  $\geq 20$  mm tergolong sangat kuat (*very strong inhibition*),  $\geq 15 - 19$  mm tergolong kuat (*strong inhibition*),  $\geq 10 - 14$  mm tergolong sedang (*moderate inhibition*) dan  $< 10$  mm tergolong lemah (*weak inhibition*) (Zainuddin, 2006). Daerah hambatan yang terbentuk merupakan daerah bening di sekitar *paper disc*, yang menunjukkan bakteri patogen atau mikroorganisme yang diuji telah dihambat oleh senyawa antimikrobal yang berdifusi ke dalam agar dari *paper disc* (Amsterdam, 1992).

Difusi lempeng agar (*Disk-Diffusion Assay*) digunakan terhadap bakteri uji dan sebagai kontrol positif digunakan antibiotik dengan pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali. Ekstrak yang didapatkan dari pelarut ditetesi pada masing-masing *paper disc* dengan diameter berukuran 6 mm, sedangkan untuk kontrol negatifnya digunakan pelarut yang sama pada proses maserasi. Penggunaan pelarut pada *paper disc* bertujuan untuk membuktikan bahwa pelarut yang digunakan tidak memberikan pengaruh sebagai antibakteri dan digunakan sebagai nilai koreksi jika terdapat zona bening di sekitar *paper disc* pelarut. Untuk kontrol positifnya sendiri menggunakan ciprofloxacin yang pada dasarnya bersifat sebagai antibakteri. Kontrol positif akan digunakan sebagai tolak ukur dalam menentukan kemampuan ekstrak menghambat bakteri. Hal ini dapat dilihat dari nilai dari zona bening yang dihasilkan ekstrak, dimana jika nilai yang dihasilkan mendekati atau melebihi nilai kontrol positif maka ekstrak berpotensi sebagai antibakteri (Zainuddin, 2006).

### 1.3 Tujuan dan Manfaat

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis terkait kandungan Antibakteri *Spirulina platensis* yang dikultur pada pH berbeda, selanjutnya akan dibuktikan melalui eksperimen dengan memberikan perbedaan perlakuan pH. Hasil dari penelitian ini diharapkan menjadi acuan dalam pengembangan teknologi kultur *Spirulina platensis* yang lebih efisien dan menguntungkan. Kultur *Spirulina platensis* memiliki potensi besar dalam menghasilkan antibakteri, pigmen alami yang berfungsi sebagai antioksidan dan agen antikanker. Hasil penelitian ini juga diharapkan menjadi sumber literatur untuk penelitian selanjutnya dalam mengoptimalkan kondisi kultur guna meningkatkan kandungan antibakteri pada *Spirulina platensis*.

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2024- April 2025, kultur dan pemeliharaan *Spirulina* dilakukan di *Hatchery* Departemen Perikanan serta uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Laut Departemen Ilmu Kelautan Fakultas Ilmu kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin.

### 2.2 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu:

**Tabel 1.** Alat yang digunakan

| No. | Nama Alat                | Fungsi                                |
|-----|--------------------------|---------------------------------------|
| 1.  | <i>Autoclave</i>         | Sterilisasi alat dan bahan            |
| 2.  | Mikropipet               | Mengambil larutan                     |
| 3.  | <i>Laminary air flow</i> | Ruang kerja steril                    |
| 4.  | Lemari pendingin         | Penyimpanan sampel                    |
| 5.  | <i>Hot plate</i>         | Untuk memanaskan medium               |
| 6.  | <i>Stirer</i>            | Untuk ekstraksi                       |
| 6.  | Oven                     | Sterilisasi alat                      |
| 7.  | Vortex                   | Menghomogenkan suspensi bakteri       |
| 8.  | Timbangan Analitik       | Menimbang bahan                       |
| 9.  | Cawan Petri              | Wadah tumbuh bakteri                  |
| 10. | Labu Erlenmeyer          | Wadah penyimpanan larutan             |
| 11. | Gelas Ukur               | Mengukur larutan                      |
| 12. | Mistar                   | Mengukur diameter zona hambat bakteri |
| 13. | Tabung Eppendorf         | Wadah                                 |
| 14. | Bunsen                   | Sterilisasi jarum ose                 |

- |     |               |                                    |
|-----|---------------|------------------------------------|
| 15. | Tabung Reaksi | Mereaksikan dua larutan atau lebih |
| 16. | Rak Tabung    | Menyimpan tabung reaksi            |
| 17. | Inkubator     | Tempat menumbuhkan Bakteri         |

---

**Tabel 2.** Bahan yang digunakan

| No. | Nama Bahan                  | Fungsi                                   |
|-----|-----------------------------|------------------------------------------|
| 1.  | <i>Spirulina platensis</i>  | Sampel Uji                               |
| 2.  | Akuades                     | Pelarut polar                            |
| 3.  | Ciprofloxacin               | Kontrol positif                          |
| 4.  | Kertas saring Whatman 40 mm | Menyaring simplisa                       |
| 5.  | Aluminium foil              | Penutup wadah agar tidak terkontaminasi  |
| 6.  | Plastik wrap                | Penutup sampel agar tidak terkontaminasi |
| 7.  | Alkohol 70%                 | Cairan pembersih alat                    |
| 8.  | Spiritus                    | Bahan bakar Bunsen                       |
| 9.  | Plastik Klip                | Kantong pembungkus Cawan petri           |
| 10. | <i>Paper disk</i> 6 mm      | Kertas bahan uji difusi agar             |

---

### 2.3 Organisme uji

*Spirulina* yang digunakan adalah *Spirulina* yang diperoleh dari Laboratorium Mikroalga Terintegrasi, Pusat Riset Limnologi dan Sumberdaya Air-BRIN KST Soekarno Cibinong yang dimasukan dan dikemas pada tube 250 mL kemudian dikultur dan diperbanyak di *Hatchery* Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanuddin Makassar.

### 2.4 Wadah Pemeliharaan

Pemeliharaan *Spirulina* menggunakan wadah berupa erlenmeyer 500 ml, toples kaca berkapasitas 2,5 liter dan galon berkapasitas 19 liter dengan tambahan aerasi.

## 2.5 Pengaturan pH

Pengaturan pH adalah proses penting untuk menyesuaikan tingkat keasaman atau kebasaan suatu larutan agar sesuai dengan kebutuhan tertentu. Jika pH larutan terlalu tinggi (basa), maka pH dapat diturunkan dengan menambahkan zat asam, seperti asam klorida (HCl) untuk efek yang cepat, atau asam asetat ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) untuk penurunan yang lebih lembut dan aman, terutama pada aplikasi biologis. Dalam beberapa kasus, gas karbon dioksida ( $\text{CO}_2$ ) juga digunakan untuk menurunkan pH, seperti dalam sistem akuarium atau pengolahan air. Sebaliknya, jika pH terlalu rendah (asam), maka dapat dinaikkan dengan menambahkan basa, seperti natrium hidroksida (NaOH) atau kalium hidroksida (KOH) untuk hasil cepat, atau natrium bikarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) jika diperlukan penyesuaian yang lebih ringan.

Dalam bidang pertanian atau akuakultur, kapur (kalsium karbonat/ $\text{CaCO}_3$ ) sering digunakan untuk meningkatkan pH tanah atau air. Untuk menjaga pH tetap stabil dalam jangka waktu tertentu, terutama pada eksperimen laboratorium atau kultur mikroorganisme, larutan buffer seperti buffer fosfat, buffer asetat, atau buffer Tris digunakan. Pengukuran pH yang akurat dapat dilakukan menggunakan pH meter digital, sedangkan untuk pengukuran cepat namun kurang akurat bisa digunakan kertas lakmus atau indikator pH. Selama proses penyesuaian pH, penting untuk menambahkan zat pengatur secara perlahan sambil diaduk dan dipantau agar perubahan pH terjadi secara terkendali.

Pedoman umum penggunaan  $\text{NaHCO}_3$  adalah 0,5 - 1,0 g/L  $\text{NaHCO}_3$  direkomendasikan untuk meningkatkan pH sebesar 1 poin. Untuk penentuan dosis yang lebih tepat, Hitung massa  $\text{NaHCO}_3$  yang dibutuhkan

$$\text{Massa NaHCO}_3 \text{ (g)} = (\text{pH target} - \text{pH awal}) \times \text{Volume kultur (L)} \times 0,825$$

Ket :

0,825 adalah faktor konversi yang diperoleh dari massa molar  $\text{NaHCO}_3$  (84 g/mol). Untuk Pengaplikasiannya  $\text{NaHCO}_3$  akan diencerkan untuk meminimalkan risiko lonjakan pH secara tiba-tiba.  $\text{NaHCO}_3$  yang telah dihitung sesuai dosis akan diencerkan sebelum dimasukkan dalam media kultur untuk memastikan terlarutnya  $\text{NaHCO}_3$  dengan sempurna.

## 2.6 Prosedur Penelitian

### 2.6.1. Sterilisasi

Wadah yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer 500 ml, sebelum digunakan wadah disterilkan menggunakan oven dengan suhu 180 derajat celcius selama 2 jam. Selain itu, medium yang digunakan juga dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121 derajat celcius dengan tekanan 1 atm, tujuan dari sterilisasi ini yaitu untuk memurnikan wadah dan medium dari segala bentuk kehidupan baik mikroorganisme ataupun jamur sehingga diharapkan tidak mengkontaminasi kultur yang akan dilakukan.

## 2.6.2 Pembuatan Medium SAG - Germani

Media kultur yang digunakan merupakan modifikasi dari media *Spirulina* yang berasal dari koleksi kultur alga (SAG–Germani). Media ini terdiri atas dua larutan utama, yaitu Larutan 1 dan Larutan 2, serta satu larutan mikronutrien, dengan total volume akhir sebanyak 1.000 mL. Ketiga komponen tersebut disiapkan secara terpisah dalam wadah berbeda, masing-masing sebagai Solution 1, Solution 2, dan larutan mikronutrien, sebelum dicampurkan untuk membentuk media kultur akhir.

**Tabel 3.** Medium SAG - Jerman

| Senyawa                                                                | Kuantitas (g) |
|------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>Larutan 1 (Dilarutkan dalam 500 mL akuades)</b>                     |               |
| NaHCO <sub>3</sub>                                                     | 136,1         |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                                        | 40.3          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                        | 5             |
| <b>Larutan 2 (Dilarutkan dalam 500 mL akuades)</b>                     |               |
| NaNO <sub>3</sub>                                                      | 25            |
| K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>                                         | 10            |
| NaCl                                                                   | 10            |
| MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O                                   | 2             |
| CaCl <sub>2</sub> .7H <sub>2</sub> O                                   | 0.4           |
| EDTA (Titriplex III, Merck)                                            | 0.8           |
| Micronutrient Solution                                                 | 1.0 mL        |
| <b>Micronutrient Komponen Larutan (Dilarutkan dalam 50 mL akuades)</b> |               |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                                         | 2.86          |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O                    | 0.0177        |
| CuSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                                   | 0.079         |
| ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O                                   | 0.222         |
| MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O                                   | 1.81          |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O                  | 0.1           |

Pembuatan media kultur *Spirulina platensis* dilakukan dengan mencampurkan tiga larutan utama, yaitu 100 mL Solution 1, 50 mL Solution 2, dan 5 mL larutan mikronutrien ke dalam wadah bersih seperti erlenmeyer atau gelas ukur. Setelah ketiga larutan tersebut ditambahkan, aquades dimasukkan secukupnya hingga total volume mencapai tepat 1.000 mL (1 liter). Dengan demikian, jumlah aquades yang ditambahkan adalah sebesar 845 mL. Ketiga larutan dan aquades kemudian diaduk secara merata hingga homogen. Setelah tercampur, dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter digital. Penyesuaian pH dilakukan secara bertahap sesuai perlakuan yang dirancang, yaitu pH 9,3 untuk Perlakuan I, pH 9,6 untuk Perlakuan II, dan pH 9,9 untuk Perlakuan III.

Penyesuaian dilakukan dengan menambahkan larutan NaOH 1N untuk menaikkan pH atau HCl 1N untuk menurunkannya, menggunakan pipet tetes sambil terus diaduk agar pH tetap stabil. Penting untuk memastikan bahwa penyesuaian pH dilakukan sebelum volume akhir mencapai 1 liter, agar penambahan larutan penyesuai pH tidak membuat volume melebihi batas.

Jika diperlukan, aquades ditambahkan terakhir untuk menyempurnakan volume menjadi tepat 1.000 mL setelah pH stabil. Media yang telah homogen dan pH-nya sesuai kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15–20 menit. Media ini siap digunakan untuk inokulasi kultur *Spirulina* dalam penelitian.

### 2.6.3 Pemeliharaan dan Pengamatan

Penelitian ini menggunakan metode *batch culture* dengan pemeliharaan *Spirulina* dalam wadah erlenmeyer berkapasitas 500 mL, yang disusun pada rak kultur dengan aerasi menggunakan filter kertas Whatman No. 41 serta intensitas cahaya 2.000-2.500 lux, *Spirulina* dikultur pada suhu 25 °C dengan lama pemeliharaan selama 12 hari.

Media kultur disiapkan dalam erlenmeyer 500 mL, masing-masing diberikan starter *Spirulina* sebanyak 25 mL. Proses kultur berlangsung selama 7-14 hari, dengan masa panen pada hari ke-10-14. Kultur dilakukan dengan perbandingan 1:10, misalnya untuk wadah 300 mL digunakan 30 mL *Spirulina* dan 270 mL media. Setelah kultur dalam erlenmeyer, proses dilanjutkan ke skala toples 2 L untuk memperbanyak sampel, karena uji kandungan membutuhkan sampel kering dalam jumlah besar. Setelah itu, kultur diperbesar ke wadah galon dengan volume 19 L.

Pengamatan dilakukan setiap hari menggunakan mikroskop untuk mengetahui pertumbuhan *Spirulina* dengan menghitung kepadatan sel menggunakan *sedgewick rafter*. Data pertumbuhan diperoleh melalui pengukuran harian menggunakan Mikroskop Olympus Stereo SZ61 dengan satuan 1.0 mm dan pembesaran 29.7-40. Data yang diperoleh kemudian dianalisis untuk menentukan pH terbaik bagi pertumbuhan serta melakukan analisis kandungan antibakteri.

### 2.6.4 Rancangan Penelitian

Kultur *Spirulina* akan dilakukan dengan kondisi modulasi pH yang di rancang sesuai perlakuan yaitu.

- a. Perlakuan I : Kultur *Spirulina* dengan pH 9,3
- b. Perlakuan II : Kultur *Spirulina* dengan pH 9,6
- c. Perlakuan III : Kultur *Spirulina* dengan pH 9,9

Kultur *Spirulina platensis* dalam penelitian ini dilakukan dengan pengaturan pH media kultur sesuai dengan perlakuan yang telah ditetapkan, yaitu tiga variasi pH: 9,3; 9,6; dan 9,9. Media kultur yang digunakan merupakan media SAG - Jerman yang telah disiapkan dalam erlenmeyer 500 mL. Setelah media dicampur, dilakukan pengukuran pH awal menggunakan pH meter digital yang telah dikalibrasi. Penyesuaian pH dilakukan secara hati-hati dengan menambahkan larutan NaOH 1N untuk menaikkan pH atau larutan HCl 1N untuk menurunkan pH, hingga mencapai nilai pH yang diinginkan sesuai dengan masing-masing perlakuan. Perlakuan I menggunakan pH 9,3, perlakuan II menggunakan pH 9,6, dan perlakuan III menggunakan pH 9,9. Setelah pH disesuaikan dan stabil, media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15–20 menit atau dengan filtrasi steril jika diperlukan. Setelah media dingin dan pH kembali dicek, dilakukan inokulasi dengan starter *Spirulina* sebanyak 25 mL ke dalam 500 mL media.

Kultur kemudian dipelihara selama 12 hari di bawah kondisi terkontrol, yaitu suhu 25°C, intensitas cahaya 2.000–2.500 lux, serta aerasi menggunakan filter kertas Whatman No. 41. Pengamatan terhadap pertumbuhan dilakukan setiap hari untuk mengevaluasi pengaruh variasi pH terhadap aktivitas dan kepadatan sel *Spirulina*.

|    |    |    |
|----|----|----|
| C3 | B1 | A1 |
| B3 | A3 | C1 |
| A2 | C2 | B2 |

**Gambar 2.** Tata letak wadah kultur *S.platensis* setelah pengacakan

Kultur *Spirulina platensis* dilakukan pada suhu 30°C dengan intensitas cahaya sebesar 2.500 lux dan penambahan aerasi menggunakan aerator untuk menjaga suplai oksigen dan sirkulasi media. Media kultur disiapkan masing-masing dalam erlenmeyer berkapasitas 500 mL, kemudian diinokulasikan dengan starter *Spirulina* sebanyak 30 mL. Proses awal kultur berlangsung selama 12 hari, setelah itu kultur dipindahkan ke dalam toples kaca berkapasitas 2,5 L dan dikultur kembali selama 12 hari, kemudian dipindahkan di galon kapasitas 19 L. Proses ini diulang dengan sistem perbesaran bertahap menggunakan perbandingan 1:10 antara starter dan media baru, hingga diperoleh volume kultur *Spirulina* yang sesuai dengan kebutuhan untuk uji aktivitas antibakteri. Seluruh proses pemeliharaan berlangsung selama 12 hari di bawah kondisi yang terkontrol.

## 2.6.5 Pengukuran Parameter

### a. Laju Pertumbuhan

Laju pertumbuhan *S.platensis* dilakukan setiap hari dengan cara yang sama pada saat menghitung kepadatan, yaitu dengan mendokumentasikan *S. platensis* menggunakan *Sedgewick Rafter counting chamber*. Menurut Yusuf (2014), pertumbuhan populasi *S. platensis* dapat dihitung dari hari pertama sampai puncak populasi dengan menggunakan rumus:

$$G = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t} \times 100\%$$

Keterangan:

- G = Laju pertumbuhan populasi *S.platensis* (%/hari)  
 $N_t$  = Kepadatan *S.platensis* pada puncak populasi (sel/mL)  
 $N_0$  = Kepadatan *S.platensis* pada awal pemeliharaan (sel/mL)  
 $t$  = Lama pemeliharaan (hari)

### b. Kepadatan Populasi Sel

Pengukuran kepadatan populasi *Spirulina platensis*. dilakukan pada pagi hari. Pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan mikropipet dari kultur dalam erlenmeyer. Sampel *Spirulina sp.* kemudian ditempatkan pada *Sedgewick Rafter counting chamber* untuk dihitung di bawah mikroskop dengan perbesaran 29.7-40.

Dokumentasi dilakukan dengan mengambil gambar menggunakan kamera HP pada lensa mikroskop untuk memungkinkan perhitungan jumlah sel *Spirulina platensis*.

Pada waktu lain, metode yang sama diterapkan pada setiap perlakuan hingga seluruh sampel selesai dianalisis. Waktu (hari) pencapaian puncak populasi *S. platensis* ditentukan berdasarkan grafik pertumbuhan, yaitu saat terjadi peningkatan jumlah sel hingga mencapai titik maksimum, yang kemudian diikuti oleh penurunan jumlah sel pada hari berikutnya.

### c. Produksi Biomassa

Produksi biomassa *S. platensis* dilakukan melalui proses panen yang dimulai dengan penyaringan kultur menggunakan kertas saring Whatman No. 41. Kultur *Spirulina platensis* sebanyak 300 mL dari masing-masing erlenmeyer disaring untuk memisahkan biomassa dari medium pertumbuhan. Untuk mempercepat pemisahan air dari biomassa, digunakan *vacum pump*, sehingga *Spirulina platensis* yang tertahan di kertas saring memiliki kadar air yang lebih rendah sebelum proses pengeringan.

Setelah penyaringan selesai, kertas saring yang telah mengandung biomassa *Spirulina platensis* kemudian dikeringkan dalam oven pada suhu tertentu selama 1 jam hingga mencapai kondisi kering. Setelah proses pengeringan, kertas saring ditimbang untuk mengetahui berat akhir, kemudian perhitungan dilakukan dengan mengurangkan berat awal kertas saring sebelum penyaringan. Selisih berat tersebut mencerminkan biomassa kering *Spirulina platensis* yang berhasil dipanen.

Rumus untuk menghitung biomassa kering *Spirulina platensis* adalah sebagai berikut:

$$B = W_t - W_0$$

Keterangan:

- B = Biomassa kering *S. platensis* (g)  
 $W_t$  = Berat kertas saring setelah proses pengeringan (g)  
 $W_0$  = Berat awal kertas saring sebelum penyaringan (g)

## 2.7 Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi Agar

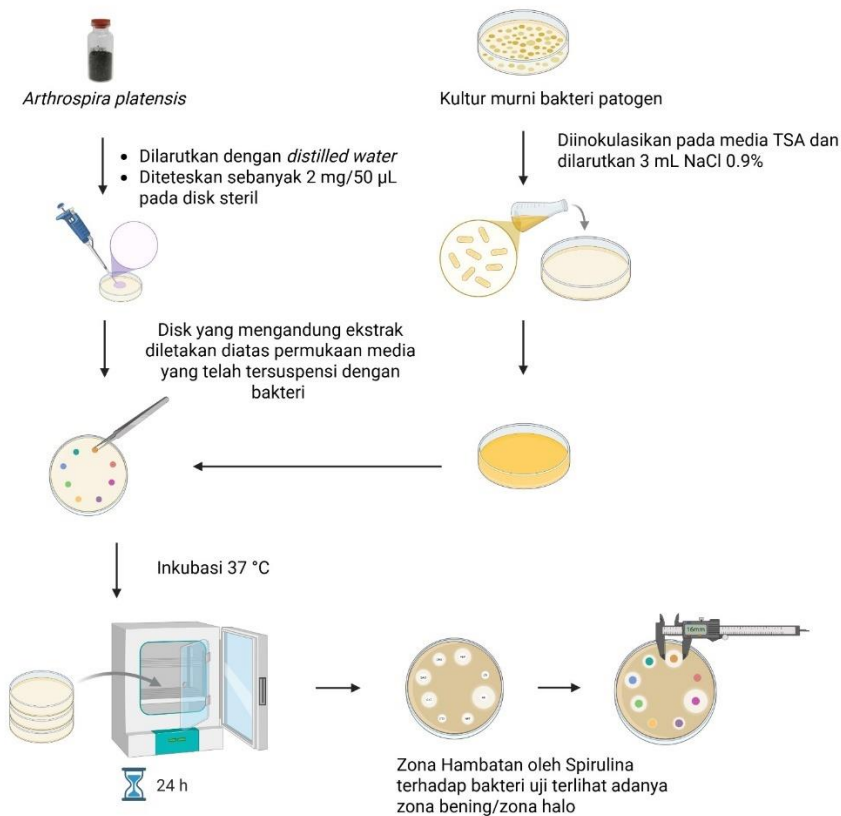
Metode uji aktivitas antibakteri yang digunakan merujuk pada metode yang telah digunakan sebelumnya yaitu metode difusi agar (Zainuddin *et al.*, 2019; 2020)(Gambar 3). Ekstrak kasar dilarutkan kembali dengan masing-masing pelarutnya kemudian ditetaskan pada permukaan *paper disk* dengan konsentrasi 2mg/50µl/disc. *Paper disk* kemudian dikering anginkan pada *laminary flow*.

Seluruh isolat bakteri uji dikultur pada media *Tryptic Soy Agar*(TSA) dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Pembuatan suspensi bakteri uji dilakukan dengan cara mengambil 2 ose kultur murni bakteri, kemudian disuspensikan ke dalam 3 mL larutan fisiologis NaCL 0,9% steril dan diaduk hingga merata. Sebanyak 200µl suspensi bakteri dengan kepadatan masing-masing  $10^7$  CFU/ml dicampurkan ke dalam media agar yang hangat dan diaduk perlahan di dalam cawan petri dan dibiarkan memadat.

Setiap jenis ekstrak ditetaskan sebanyak 50 µl pada *paper disk* yang berbeda dan kemudian pelarut dibiarkan menguap. Disk kemudian diletakkan secara hati-hati dan

aseptis pada permukaan media agar yang telah dihomogenkan dengan bakteri. Kemudian diinkubasi pada suhu 28°C selama 24 jam. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik ciprofloxacin 30 ppm dan kontrol negatif yaitu akuades.

Setelah masa inkubasi, aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona hambat (zona bening/zona halo) disekitar *paper disk* yang diukur dengan menggunakan mistar/jangka sorong. Penentuan tingkat aktivitas antimikroba berdasarkan diameter zona hambat menurut Zainuddin(2006) terdapat pada Tabel 4.



**Gambar 3.** Skema kerja uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi agar

**Tabel 4.** Tingkat aktivitas antimikroba berdasarkan diameter zona hambat (Zainuddin, 2006)

| Diameter zona hambat (mm) | Aktivitas antibakteri |
|---------------------------|-----------------------|
| ≥20                       | Sangat tinggi         |
| 15 - <20                  | Tinggi                |
| 10 - <15                  | Sedang                |
| >6 - <10                  | Lemah                 |
| 6                         | Tidak ada aktivitas   |

## 2.8 Analisis Data

Pengaruh perlakuan terhadap parameter yang diamati dianalisis dengan *Analysis of Varians* (ANOVA). Variabel yang dihitung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan, biomassa, kepadatan dan aktivitas antibakteri spirulina. Dengan menggunakan perangkat lunak komputer program SPSS versi 26,0 untuk menganalisis pengaruh perlakuan terhadap parameter. Jika terdapat perbedaan di antara perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Tuckey.