

SKRIPSI

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

Disusun dan diajukan oleh

ZILHAYAI

H041171018



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

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

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

**ZILHAYAI
H041171018**

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

LEMBAR PENGESAHAN

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

Disusun dan diajukan oleh:

ZILHAYAI
H041 17 1018

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

Menyetujui:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama

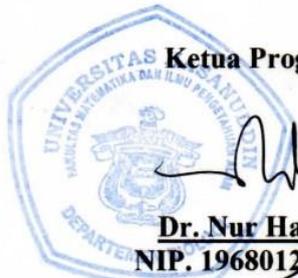
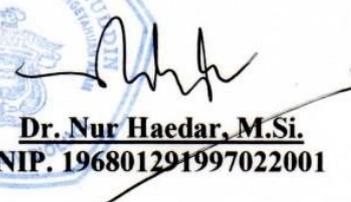


Prof. Dr. Diravah R. Husain, DEA.
NIP 196005251986012001



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

Ketua Program Studi



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

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

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

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

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

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

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

Makassar, 12 Agustus 2021

Yang menyatakan


Zilhayai

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Salam sejahtera untuk kita semua

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

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

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

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

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

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

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

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

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

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

Makassar, Juli 2021

Penulis

ABSTRAK

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

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

ABSTRACT

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

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

DAFTAR ISI

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

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

DAFTAR GAMBAR

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

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

DAFTAR TABEL

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

DAFTAR LAMPIRAN

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

BAB 1

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

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

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

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

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

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

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

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

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

I.2 Tujuan Penelitian

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

I.3 Manfaat Penelitian

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

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

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

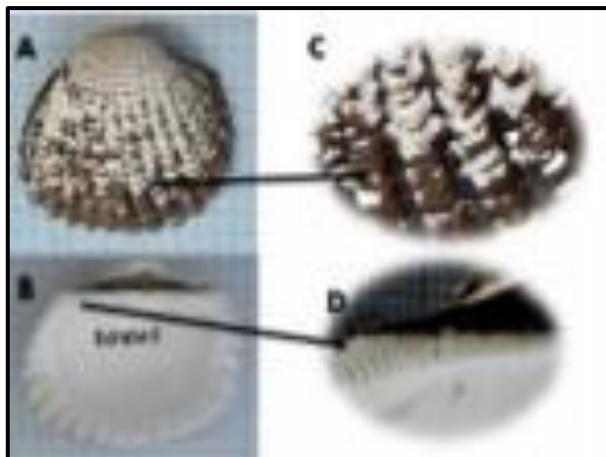
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kerang darah *Anadara granosa* L.

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

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



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

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

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

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

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

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

II.1.1 Klasifikasi

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

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

II.2 *Spirulina platensis*

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

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

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

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



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

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

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

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

II.2.1 Klasifikasi

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

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

II.3 *Streptococcus mutans*

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

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



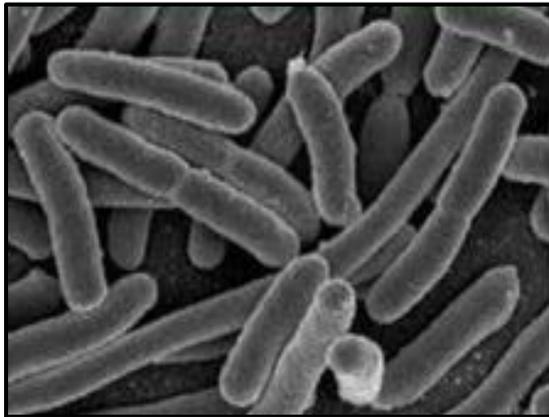
Gambar 3. Morfologi *Streptococcus mutans* (Nugraha, 2008)

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

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

II.4 *Escherichia coli*

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



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

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

II.5 Antibakteri

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

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

II.6 Mekanisme Kerja Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi atas lima kelompok yaitu:

1. Merusak dinding sel

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

2. Merusak membran sel

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

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

3. Menghambat sintesis protein

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

4. Menghambat transkripsi

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

5. Menghambat jalur metabolisme

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

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

II.7 Metode Uji Daya Hambat Pada Bakteri

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

1. Metode Difusi

a. Metode difusi cakram agar

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

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

b. Metode gradien antimikroba (Etest)

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

c. Metode difusi sumur agar

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

d. Metode difusi sumbat agar

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

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

1. Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi (KLT-Bioautografi)

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

a. Difusi agar

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

mana senyawa antimikroba kontak dengan lapisan agar.

b. Bioautografi langsung

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

c. Bioassay hamparan agar-agar

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

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

2. Metode Dilusi (Pengenceran)

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

a. Metode pengenceran kaldu

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

b. Metode pengenceran agar

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

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

II.8 Fortifikasi

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

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

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

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

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

BAB III

METODE PENELITIAN

III.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu rak tabung, tabung reaksi, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, cawan petri, pipet tetes, jarum ose bulat, bunsen, sendok tanduk, spatula, batang pengaduk, corong, gegep, pinset, jangka sorong, oven, *Laminar Air Flow* (LAF), *vortex*, *magnetic stirrer*, *hot plate*, spektrofotometer, *rotary evaporator*, otoklaf, inkubator, lemari pendingin, timbangan digital, pipa kapiler, *chamber*, lampu UV 254 dan 365 nm.

III.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yakni isolat bakteri: *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli.*, kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. yang telah difortifikasi *Spirulina platensis*, simplisia kerang darah *Anadara granosa* L., media NA (*Nutrient Agar*), media MHA (*Mueller Hinton Agar*), *blank disk*, NaCl 0,9% steril, alkohol 70%, etanol 96%, ciprofloxacin, akuades, lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT) ukuran 20 × 20 cm berlapis gel silika 60 GF₂₅₄, *sput*, kloroform:etanol (90:10), kertas saring, *aluminium foil*, plastik *wrap*, dan kapas.

III.3 Metode Kerja

III.3.1 Ekstraksi

Simplisia isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. yang telah di fortifikasi *Spirulina platensis* dikeluarkan dan ditimbang sebanyak 200 g. Di samping itu, simplisia kerang darah *Anadara granosa* L. ditimbang sebanyak 100

g. Kemudian masing-masing simplisia dari isi kapsul dan simplisia dari kerang darah *Anadara granosa* L. dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan simplisia:pelarut yakni 1:3 hingga simplisia terendam dan dibiarkan selama 1 hari sambil sesekali diaduk. Bejana maserasi ditutup rapat menggunakan plastik *wrap* dan didiamkan di tempat tertutup dan terlindung dari cahaya matahari. Setelah 1 hari dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring. Ampas yang diperoleh diremaserasi kembali dengan pelarut yang sama hingga hari ke 3. Maserat I, II & III dicampur dan diuapkan pada suhu 37°C menggunakan evaporator hingga diperoleh ekstrak kental.

III.3.1.1 Pembuatan Larutan Uji

Bahan yang diekstrak sebelumnya dibuat variasi konsentrasi tinggi dan rendah. Konsentrasi tinggi meliputi 25%, 50%, 75%, 100% dengan cara ditimbang 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g, dan 1 g ekstrak etanol simplisia dari isi kapsul dan 1 g ekstrak *Anadara granosa* L. Adapun konsentrasi rendah meliputi 10%, 15%, 20%, 25% dengan cara ditimbang 0,10 g, 0,15 g, 0,20 g, 0,25 g dan 1 g ekstrak etanol simplisia dari isi kapsul dan 1 g ekstrak *Anadara granosa* L. Selanjutnya masing-masing ekstrak dilarutkan ke dalam etanol 96% hingga diperoleh volume larutan 1 mL.

III.3.1.2 Pembuatan Larutan Kontrol

Larutan kontrol positif yang digunakan yakni ciprofloxacin dengan konsentrasi 5 ppm. Tablet ciprofloxacin 500 mg digerus dan diambil sebanyak 1 g untuk dilarutkan ke dalam 100 mL akuades sehingga diperoleh larutan induk sebanyak 100 ppm. Kemudian, diambil 0,5 mL dari larutan induk dan dilarutkan ke dalam 10 mL akuades steril sehingga diperoleh larutan ciprofloxacin dengan

konsentrasi 5 ppm. Sedangkan untuk larutan kontrol negatif digunakan etanol 96%.

III.3.2 Sterilisasi Alat dan Media

a. Sterilisasi alat dengan panas kering (udara kering)

Alat-alat gelas berupa cawan petri, tabung reaksi, gelas kimia, gelas ukur, batang pengaduk, pipet tetes dan pencadangan terlebih dahulu disterilisasi dengan panas kering (udara kering) pada oven. Sterilisasi dilakukan selama 2 jam pada temperatur 180°C.

b. Sterilisasi alat dengan panas membara

Jarum ose disterilkan dengan sterilisasi panas membara pada nyala api bunsen sampai merah membara.

c. Sterilisasi media

Media yang digunakan disterilkan dengan sterilisasi basah menggunakan otoklaf. Sterilisasi ini dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

III.3.3 Pembuatan Media

a. Media NA (*Nutrient Agar*)

Sebanyak 2 gram media NA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades kemudian dipanaskan dengan *hot plate* sambil diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Media disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

b. Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Sebanyak 3,4 gram media MHA dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, selanjutnya media dipanaskan menggunakan *hot plate* sambil diaduk dengan

magnetic stirrer hingga homogen. Media disterilkan di dalam otoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

III.3.4 Penyiapan Bakteri Uji

III.3.4.1 Peremajaan Bakteri Uji

Isolat bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* diremajakan pada media agar miring NA (*Nutrient Agar*) lalu diinkubasi selama 1 × 24 jam pada suhu 37°C.

III. 3.4.2 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Isolat bakteri yang telah diremajakan pada media agar miring NA selama 24 jam, disuspensikan ke dalam NaCl fisiologis (NaCl 0,9%) steril dan diukur kekeruhannya menggunakan spektrofotometer hingga di diperoleh nilai transmittan yaitu 25%.

III.3.5 Uji Daya Hambat

Pada penelitian ini menggunakan metode difusi agar dengan bantuan *blank disk*. Suspensi bakteri uji (*Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*) masing-masing dipipet sebanyak 0,7 mL ke dalam erlenmeyer yang berisi media MHA dan digoyangkan hingga campuran homogen. Selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri secara merata dan didiamkan hingga memadat. Setelah media agak memadat, diambil *blank disk* dan direndam ke dalam larutan konsentrasi ekstrak isi kapsul (25%, 50%, 75%, 100%) dan kontrol kerang darah *Anadara granosa* L. dengan konsentrsi larutan (100%) yang telah dituang ke dalam plat tetes. Perendaman dilakukan selama 15 menit setelah itu diuapkan hingga *blank disk* tampak kering. letakkan *blank disk* pada bagian atas media yang telah memadat

dengan bantuan pinset steril, kemudian diinkubasi selama 1×24 jam dan 2×24 jam, diukur diameter zona hambatan pada masing-masing waktu inkubasi.

III.3.6 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. yang telah difortifikasi *Spirulina platensis* dilakukan pemisahan secara KLT. Ekstrak ditotolkan menggunakan pipa kapiler pada titik yang berbeda pada batas bawah pelat KLT berukuran 20×20 cm yang telah diaktivasi dalam oven selama 10 menit pada suhu 105°C . Pelat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* gelas yang berisi eluen kloroform:etanol (90:10). Eluen dalam *chamber* dijenuhkan terlebih dahulu dengan cara didiamkan selama 10 menit. Eluen akan bergerak sepanjang pelat lalu pelat dikeluarkan dari *chamber* ketika eluen mencapai batas ujung pelat yang telah ditentukan. Selanjutnya pelat dikeringkan pada suhu kamar hingga terbentuk noda. Pengamatan hasil elusi sampel dilakukan dengan menggunakan sinar UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 365 nm. Noda yang muncul ditandai dengan spatula (Kathiresan *et al.*, 2019).

III.3.7 Uji KLT-Bioautografi

Hasil identifikasi KLT menggunakan eluen kloroform:etanol (90:10) dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi yakni setiap noda yang terbentuk dikeruk menggunakan spatula dan dilarutkan ke dalam 2,5 mL etanol 96%, lalu divorteks dan didiamkan selama 24 jam hingga silika mengendap. Setelah itu, diambil larutan ekstrak uji yang diperoleh kemudian dilakukan pengujian aktivitas antibakteri kembali dengan metode difusi agar menggunakan *blank disk*. Diamati kembali zona hambatan yang terbentuk selama inkubasi 1×24 jam sebagai

bakteriostatik dan 2×24 jam sebagai bakterisida (Bashir *et al.*, 2014).

III.3.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan secara deskriptif dan disajikan secara kuantitatif dalam bentuk tabel. Data diperoleh dari hasil pengukuran diameter zona hambatan senyawa penghambat.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

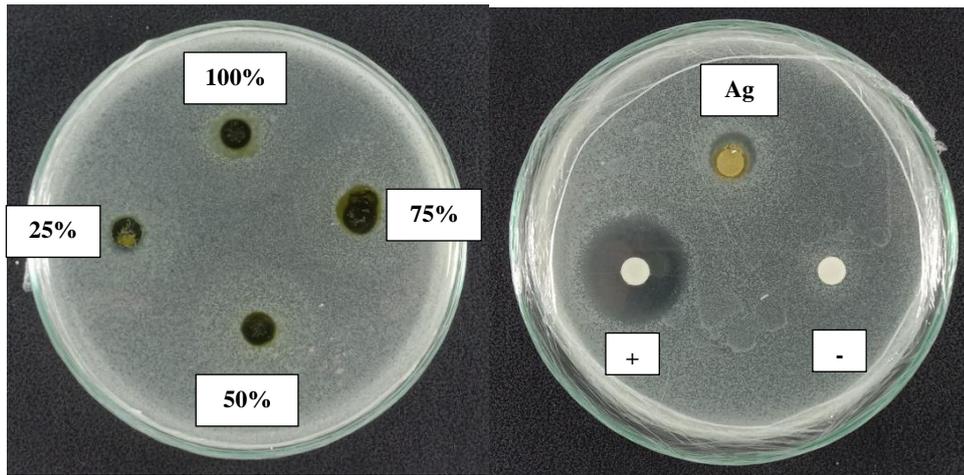
IV.1 Hasil Pengujian Daya Hambat Ekstrak Isi Kapsul terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*

Pengujian daya hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* dilakukan menggunakan metode difusi agar dengan mengamati ada tidaknya zona hambat yang terbentuk pada daerah pertumbuhan bakteri uji yaitu *Streptococcus mutans* (bakteri gram positif) dan *Escherichia coli* (bakteri gram negatif). Zona hambat yang terbentuk ditandai sebagai daerah bening yang terdapat di sekitar *blank disk* yang akan diukur diameter hambatannya menggunakan jangka sorong. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan sifat bakteristatik dan bakterisidal.

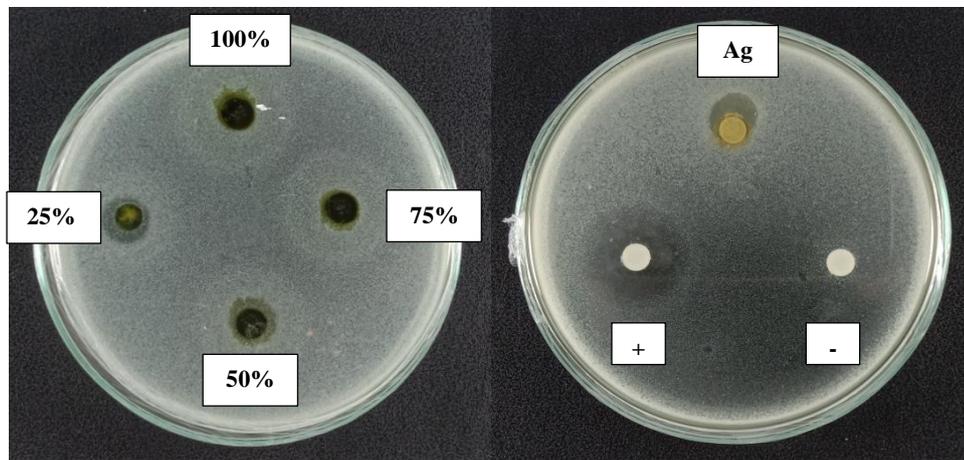
Metode difusi agar ini menggunakan konsentrasi larutan ekstrak yang berbeda. Pertama, Ekstrak isi kapsul yang berisi hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis*, digunakan seri konsentrasi ekstrak yaitu 25%, 50%, 75% dan 100%. Kedua, dari ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. sebanyak 100%. Penggunaan beberapa konsentrasi ekstrak 25%, 50%, 75% dan 100%. Tujuannya untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas antibakteri dari isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* terhadap pertumbuhan bakteri gram positif *Streptococcus mutans* dan bakteri gram negatif *Escherichia coli*. Apabila dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri maka obat tersebut dapat digunakan sebagai obat antibiotik juga. Adapun maksud digunakan ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. 100%, hanya sebagai pembanding atau kontrol dari ekstrak hasil fortifikasi bahan yang

digunakan terhadap bakteri uji. Dalam penelitian ini juga digunakan kontrol positif dan kontrol negatif. Ciprofloxacin sebagai kontrol positif merupakan larutan pembanding efek antara obat antibakteri baku dengan larutan ekstrak uji dalam hal ini ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi. Etanol sebagai kontrol negatif untuk menghindarkan kemungkinan adanya efek antibakteri.

Hasil pengamatan uji daya hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* dapat dilihat pada **Gambar 5**, **Gambar 6** dan hasil pengukuran diameter zona hambatan dilihat pada **Tabel 1**.



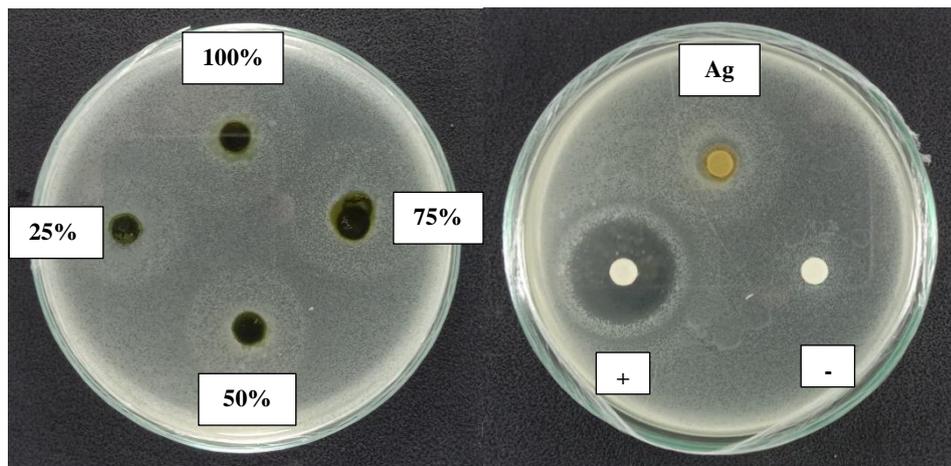
(A)



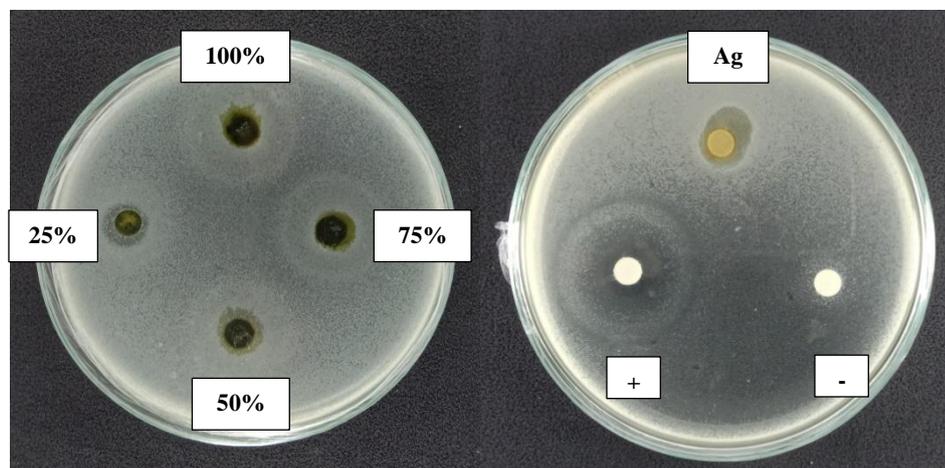
(B)

Gambar 5. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 1×24 jam pada suhu 37°C .

Keterangan: A (*Streptococcus mutans*), B (*Escherichia coli*), Ag (*Anadara granosa* L.), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).



(A)



(B)

Gambar 6. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 2×24 jam pada suhu 37°C .

Keterangan: A (*Streptococcus mutans*), B (*Escherichia coli*), Ag (*Anadara granosa* L.), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Isi Kapsul Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*.

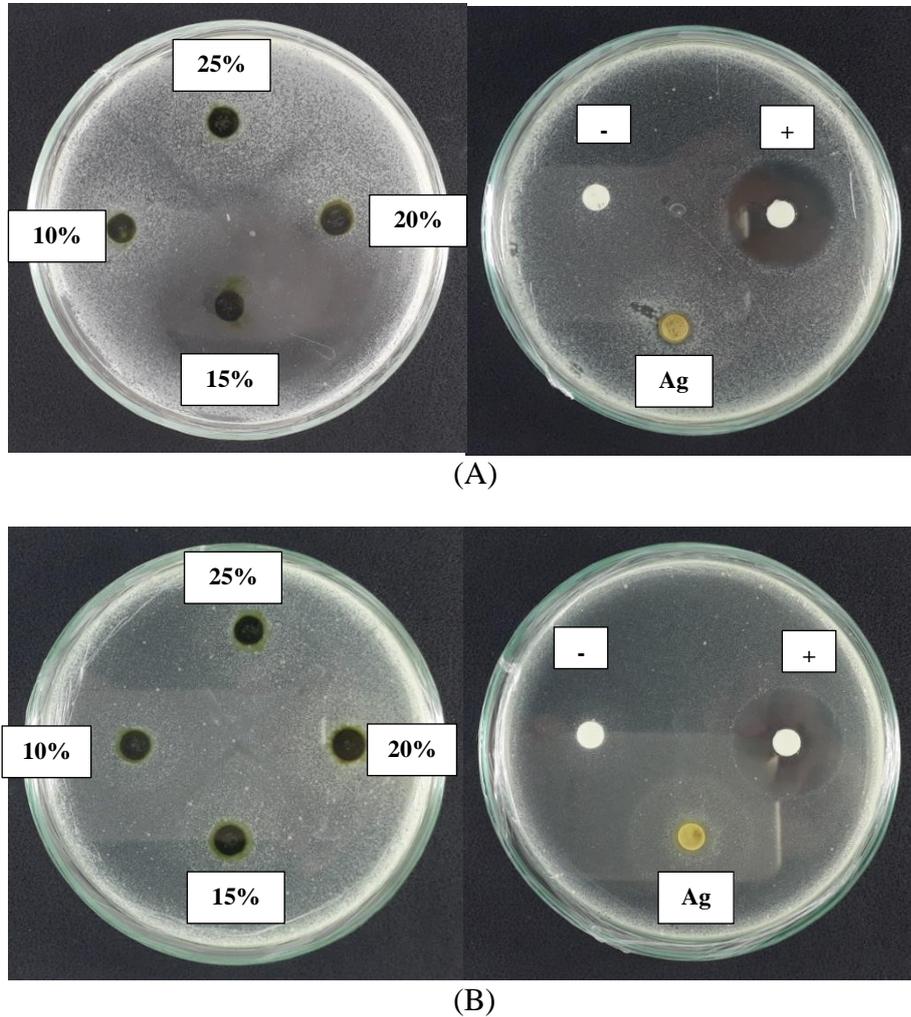
Perlakuan	Rata-rata Diameter Zona Hambatan (mm)			
	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	1 × 24 jam	2 × 24 jam	1 × 24 jam	2 × 24 jam
25%	7,10	7,22	7,85	9,75
50%	0	0	0	0
75%	0	0	0	0
100%	0	0	0	0
Ag 100%	10,32	10,48	10,78	12,22
Kontrol (+)	24,15	23,90	24,45	24,08
Kontrol (-)	0	0	0	0

Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk dari ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi terhadap bakteri uji, pada **Tabel 1** terlihat bahwa dari 4 jenis perlakuan konsentrasi yang digunakan, hanya pada konsentrasi yang lebih rendah yakni 25% yang menunjukkan aktivitas penghambatan. Luas zona hambat yang terbentuk pada *Streptococcus mutans* sebesar 7,10 mm selama inkubasi 1 × 24 jam. Setelah inkubasi selama 2 × 24 jam, luas zona hambat meningkat menjadi 7,22 mm. Hal yang sama juga terlihat terbentuknya zona hambat pada *Escherichia coli* sebesar 7,85 mm pada inkubasi 1 × 24 jam dan mengalami peningkatan hingga 9,75 mm pada inkubasi 2 × 24 jam. Menurut Davis dan Stout, (1971), diameter zona hambatan yang terbentuk pada ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi tergolong pada kategori sedang yakni 5-10 mm daripada diameter hambatan ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. yakni >10 mm yang termasuk kategori kuat dan ciprofloxacin dengan rata-rata >24 mm termasuk dalam kategori sangat kuat.

Terbentuknya zona hambat pada konsentrasi 25% kemungkinan kemampuan daya hambat ekstrak yang digunakan lebih efektif pada konsentrasi yang lebih rendah. Terbentuknya zona hambat tidak selalu meningkat seiring meningkatnya konsentrasi ekstrak. Hal ini disebabkan karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada waktu tertentu (Septiani *et al.*, 2017). Oleh karena itu, untuk membuktikan adanya efek antibakteri yang ditunjukkan pada konsentrasi 25% perlu dilakukan uji daya hambat kembali dengan menggunakan konsentrasi yang lebih rendah yakni 10%, 15%, 20%, dan 25%. Pada umumnya penggunaan konsentrasi yang rendah dari ekstrak antibakteri alami yang digunakan, akan mengganggu aktivitas pembentukan energi dari sel bakteri. Berbeda halnya jika konsentrasi dinaikkan dapat membunuh bakteri karena adanya interupsi dari protein dinding sel dan menghambat pertumbuhan komponen dinding sel (Lobritz *et al.* 2015; Mariani *et al.* 2020).

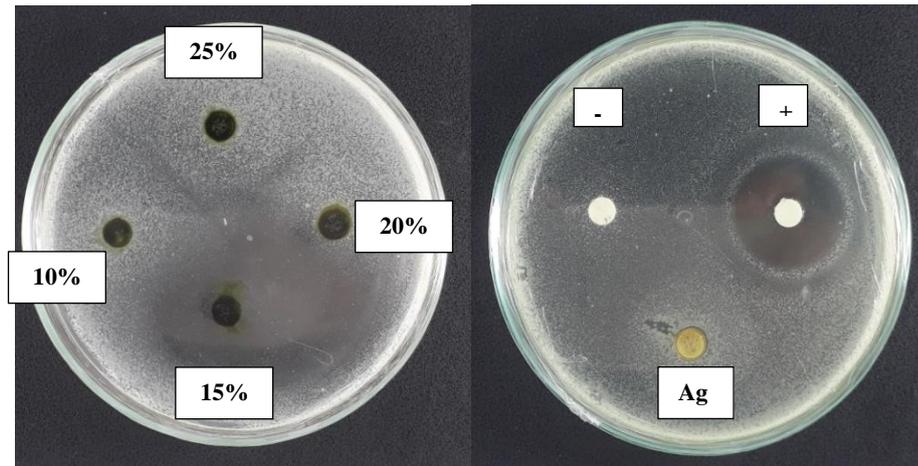
Adapun hasil yang diperoleh dapat dilihat pada **Gambar 7**, **Gambar 8** dan

Tabel 2.

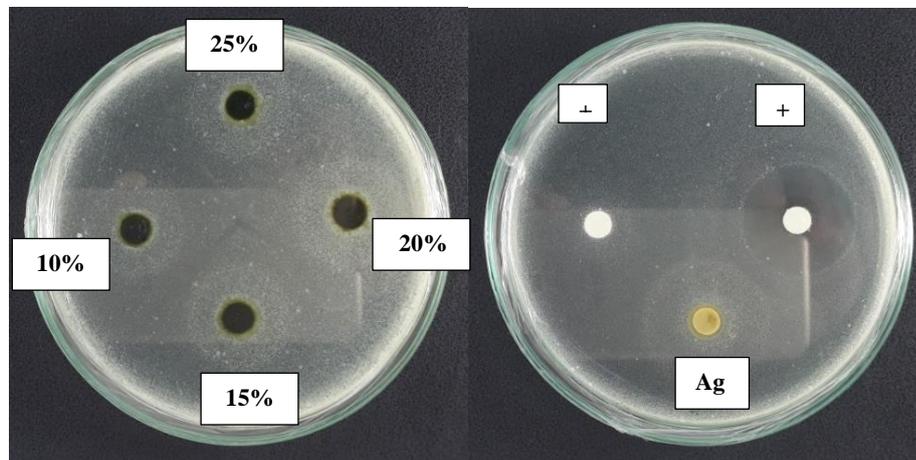


Gambar 7. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 1×24 jam pada suhu 37°C .

Keterangan: A (*Streptococcus mutans*), B (*Escherichia coli*), Ag (*Anadara granosa* L.), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).



(A)



(B)

Gambar 8. Hasil uji daya hambat ekstrak hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* setelah inkubasi 2×24 jam pada suhu 37°C .

Keterangan: A (*Streptococcus mutans*), B (*Escherichia coli*), Ag (*Anadara granosa* L.), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).

Tabel 2. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Isi Kapsul pada Konsentrasi Rendah Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*.

Perlakuan	Rata-rata Diameter Zona Hambatan (mm)			
	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Escherichia coli</i>	
	1 × 24 jam	2 × 24 jam	1 × 24 jam	2 × 24 jam
10%	0	0	0	0
15%	0	0	0	0
20%	0	0	0	0
25%	0	0	0	0
Ag 25%	8,15	8,45	9,25	9,32
Kontrol (+)	25,50	25,42	26,08	25,90
Kontrol (-)	0	0	0	0

Berdasarkan **Tabel 2** hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi, menunjukkan bahwa semua konsentrasi yang digunakan yakni 10%, 15%, 20% dan 25%, tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya interaksi tidak sinergis atau antagonis antar senyawa-senyawa bioaktif yang terdapat dalam kerang darah *Anadara granosa* L. dengan *Spirulina platensis*. Selain itu kemungkinan adanya senyawa antagonis dari *Spirulina platensis* yang menghambat kerja senyawa yang ada pada kerang darah *Anadara granosa* L. atau sebaliknya. Menurut Putri *et al.* (2017), Antagonisme adalah kondisi saling mengganggu atau menghambat kerja satu sama lain atau zat kimia mengganggu zat kimia lain jika digabung antarkeduanya.

Hasil uji daya hambat sebelumnya pada konsentrasi 25% yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji dengan zona hambat yang tergolong sedang >7 mm diduga hanya etanol (pelarut ekstrak) yang memberikan efek hambatan karena etanol dapat membunuh bakteri. Etanol

digunakan sebagai kontrol negatif untuk membuktikan apakah respon penghambatan berasal dari sampel uji dan bukan disebabkan oleh kontrol negatif. Hasil menunjukkan pada kontrol negatif tidak memiliki zona hambatan.

Penggunaan ekstrak kerang darah *Anadara granosa* sebagai pembanding dari ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi, pada konsentrasi 100% (Uji daya hambat 1) dan konsentrasi 25% (uji daya hambat 2) selalu memperlihatkan adanya aktivitas antibakteri yang termasuk dalam kategori sedang >5-10 (David dan Stout 1971). Luas zona hambat yang terbentuk pada bakteri *Streptococcus mutans* adalah 8,15 mm pada inkubasi 1 × 24 jam (**Gambar 7**) dan mengalami peningkatan sebesar 8,45 mm pada inkubasi 2 × 24 jam (**Gambar 8**). Sedangkan pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 9,25 mm pada inkubasi 1 × 24 jam (**Gambar 7**), meningkat pula menjadi 9,325 mm pada inkubasi 2 × 24 jam (**Gambar 8**). Adanya aktivitas antibakteri yang meningkat oleh ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. terhadap kedua bakteri uji setelah inkubasi 2 × 24 jam dapat disimpulkan bahwa senyawa metabolit kerang darah *Anadara granosa* L. bersifat bakterisidal ditandai dengan tidak adanya penyempitan zona hambat yang signifikan dan aktivitas tersebut lebih kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* daripada bakteri *Streptococcus mutans*. Hal ini dipengaruhi oleh perbedaan struktur kimia komponen penyusun dinding sel bakteri uji yang kinerjanya mampu diganggu oleh ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. Menurut Muharni *et al.* (2017) bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri gram positif yang memiliki peptidoglikan pada dinding sel lebih tebal sehingga membentuk suatu struktur yang kaku dan lebih sederhana sehingga memudahkan senyawa antibakteri masuk ke dalam sel dan menemukan sasaran untuk bekerja. Sedangkan

bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang mempunyai sifat rentan terhadap beberapa antibiotik sebab memiliki struktur dinding sel yang relatif kompleks dan berlapis tiga dimana lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah berupa lipopolisakarida dan lapisan dalam berupa peptidoglikan.

Kemampuan daya hambat ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. terhadap pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif sejalan dengan hasil penelitian Kumar *et al.* (2017) terhadap (*Vibrio harveyi*, *Staphylococcus aureus*) dan Dewiningsih *et al.* (2017) yang menyebutkan bahwa adanya aktivitas antibakteri oleh ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. disebabkan oleh kandungan senyawa metabolit seperti flavonoid, alkaloid, steroid yang bersifat sebagai antibakteri. Hal tersebut diperkuat oleh Pelczar dan Chan, (2008) dalam jurnal Septiani *et al.* (2017), bahwa senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel bakteri antara lain fenol, flavonoid, dan alkaloid. Senyawa flavonoid mampu merusak dinding sel sehingga menyebabkan kematian sel, mekanisme kerjanya dengan mengganggu fungsi metabolisme mikroorganisme dengan merusak dinding sel dan mendenaturasi protease sel mikroorganisme (Muharni *et al.*, 2017). Sedangkan mekanisme kerja alkaloid dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut, selain itu juga komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Nurhasanah dan Endang, 2020).

Adapun Antibiotik ciprofloxacin yang digunakan sebagai kontrol positif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* juga memiliki aktivitas antibakteri yang tergolong sangat kuat. Pada bakteri

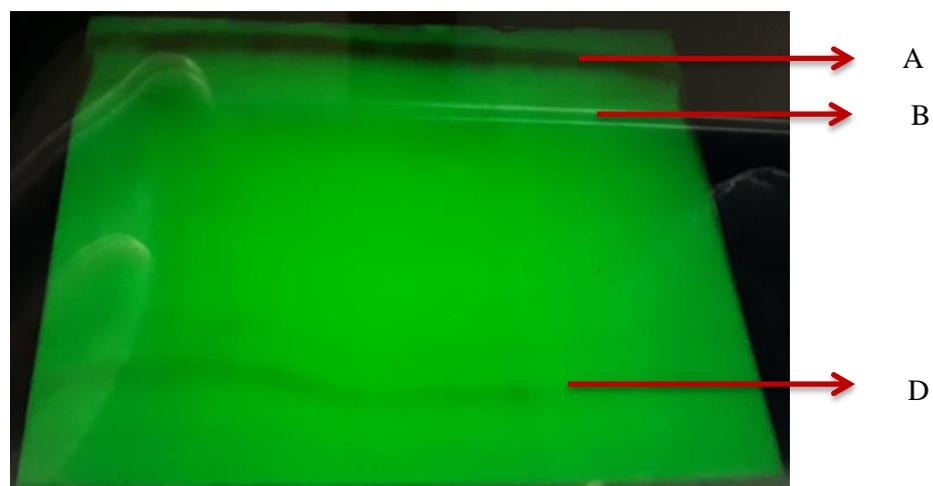
Streptococcus mutans aktivitas penghambatan sebesar 25,50 mm pada inkubasi 1 × 24 jam (**Gambar 7**) dan 25,42 mm pada inkubasi 2 × 24jam (**Gambar 8**). Pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 26,08 mm pada inkubasi 1 × 24 jam (**Gambar 7**) dan 25,90 mm pada inkubasi 2×24 jam (**Gambar 8**). Menurut Faidiban *et al.* (2020), ciprofloxacin dengan zona hambat yang tergolong kuat merupakan antibiotik dengan spektrum luas dan termasuk dalam golongan florokuinon yang paling umum digunakan dengan mekanisme kerja menghambat DNA girase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV yang terdapat dalam bakteri. Ciprofloxacin dengan kemampuannya menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* bersifat bakteriostatik. Hal tersebut ditandai dengan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar zona bening setelah masa inkubasi 2 × 24 jam dan ditandai berdasarkan zona penghambatan dengan pinggiran tidak tegas. Hal ini sesuai dengan yang dilaporkan oleh Yulinery & Nurhidayat (2015) bahwa zona penghambatan dengan pinggiran tidak tegas dikategorikan bersifat bakteriostatik, yakni kemampuan daya hambat komponen antibakteri hanya pada pertumbuhan sel bakteri uji, sehingga sebagian bakteri uji tetap tumbuh di daerah zona bening.

IV.2 Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

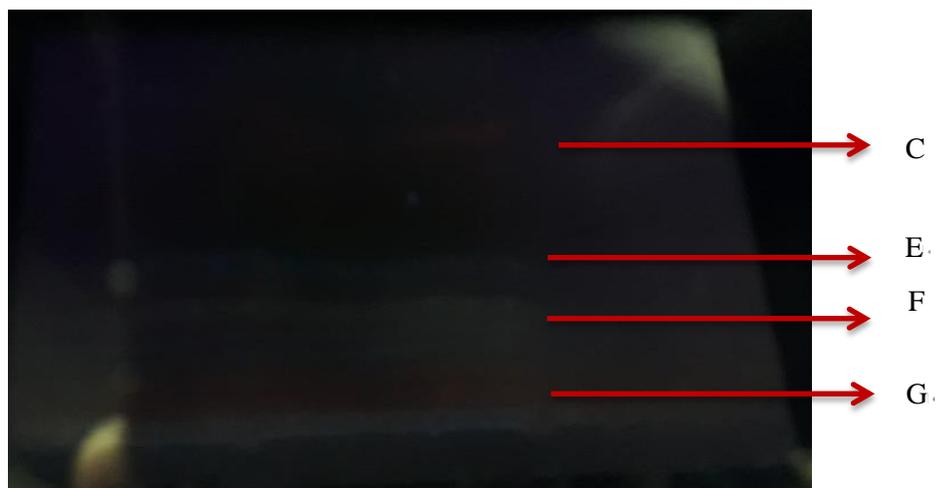
Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa secara fisika-kimia berdasarkan dengan komponen fase diam dan fase gerak (Trimulyani *et al.*, 2019). Analisis kromatografi dilakukan dengan metode KLT-Preparatif ukuran 20×20 cm dan silica gel 60 GF₂₅₄ sebagai fase diam serta fase gerak (eluen) menggunakan kloroform:etanol dengan perbandingan 90:10 hasil pemisahan terbaik uji pendahuluan yang dilakukan

sebelumnya. Plat silica gel sebagai fase diam ditentukan batas bawah dan batas atas. Pengujian dilakukan dari ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi yang ditotolkan sepanjang batas bawah plat kemudian dilakukan pengamatan pada sinar UV 254 dan 365 nm.

Hasil pemisahan ekstrak setelah dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis dapat dilihat pada **Gambar 9**.



(A)



(B)

Gambar 9. Profil Kromatografi Lapis ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi dengan fase diam silica gel 60 GF₂₅₄ dan fase diam (eluen) kloroform:etanol (90:10) pada penampakan bercak UV 254 nm (A) dan 365 nm (B).

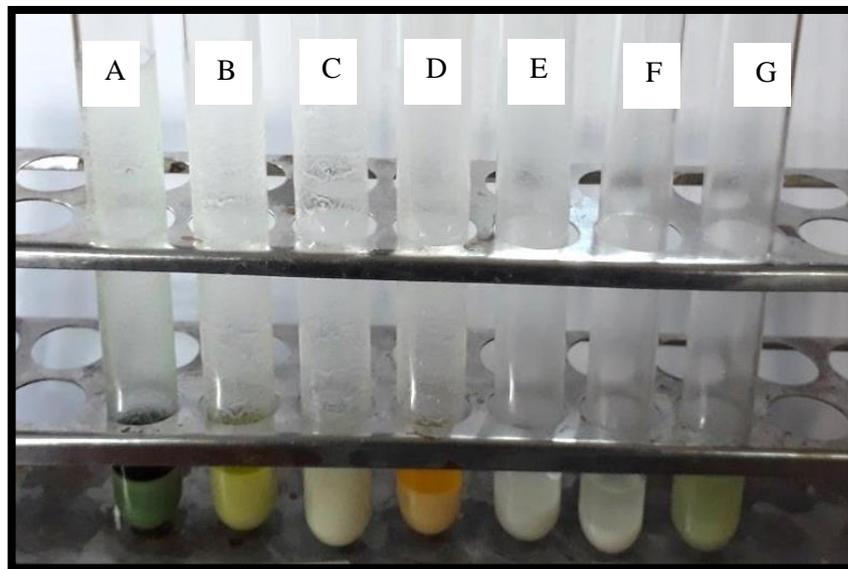
Gambar 9, memperlihatkan hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* yang diuji menggunakan fase diam Silica Gel 60 gf₂₅₄ dan fase gerak kloroform : etanol (90:10) yang diamati dibawah sinar UV 254 nm dan 365 nm. Pita yang diperoleh pada UV 254 nm sebanyak 3 pita dan 4 pita pada UV 365 nm. Timbulnya pita secara terpisah dikarenakan adanya senyawa-senyawa yang berbeda sifat kepolarannya.

Pita yang tampak pada UV 254 nm tidak terang hal ini karena panjang gelombang 254 nm pada dasarnya untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap. Menurut Ahmad *et al.* (2017), penampakan bercak noda pada UV 254 nm karena adanya kekuatan interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng KLT. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi, dan kembali ke keadaan semula pada waktu melepaskan energi. Berbeda halnya dengan pengamatan pada UV 365 nm, plat yang terlihat tampak gelap akan tetapi bercak tampak berfluoresensi. Hal tersebut terjadi akibat daya interaksi antara sinar UV dan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang terdapat pada noda. Sehingga noda yang terlihat dibawah lampu UV 365 nm tampak terang dikarenakan silica gel plat KLT tidak berfluoresensi.

IV.3 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi (KLT-B)

Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi dilakukan untuk mengidentifikasi bioaktivitas senyawa dari ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi *Anadara granosa* L dan *Spirulina platensis* yang telah dipisahkan melalui Kromatografi Lapis Tipis

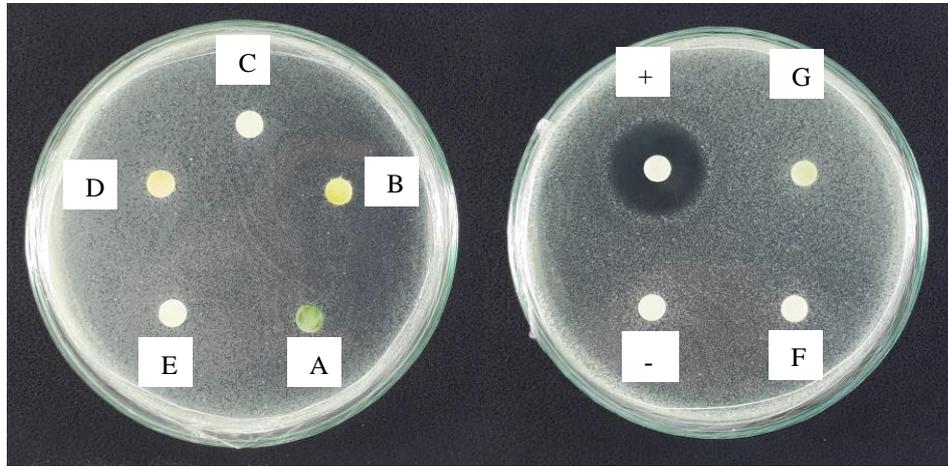
Silica Gel 60 gf₂₅₄ menggunakan eluen Kloroform: etanol (90:10) yang diamati dibawah sinar UV 254 nm dan UV 365 nm. Teknik KLT-bioautografi yang digunakan dengan cara difusi agar dengan melakukan isolasi hasil Kromatografi Lapis Tipis Preparatif dari masing-masing pita yang terbentuk. Kemudian diencerkan dengan etanol sebanyak 2,5 mL dan dilakukan uji daya hambat pada masing-masing ekstrak larutan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*.



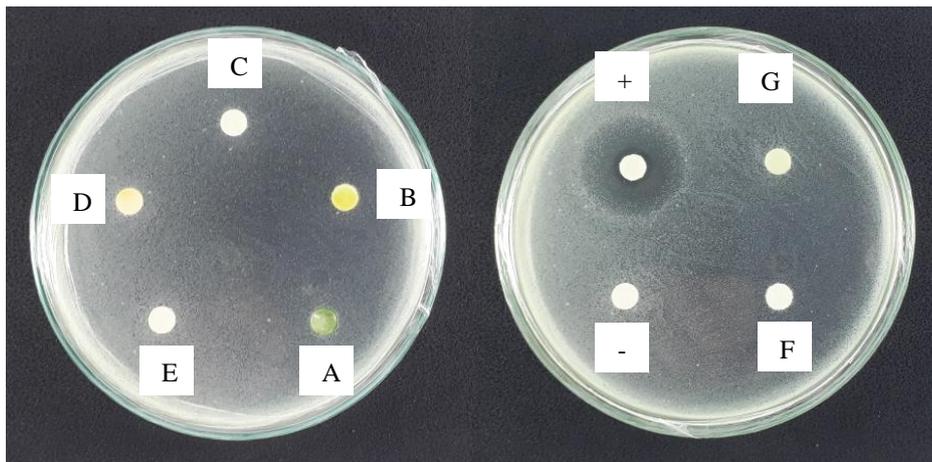
Gambar 10. Larutan ekstrak yang dikeruk dari hasil KLT-P

Hasil Pengamatan KLT-Bioautografi pada bakteri uji dapat dilihat pada

Gambar 11 dan **Gambar 12** berikut.



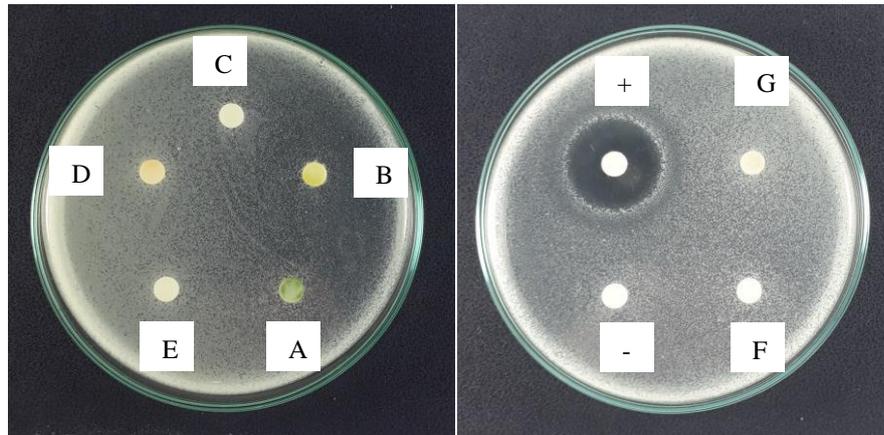
(A)



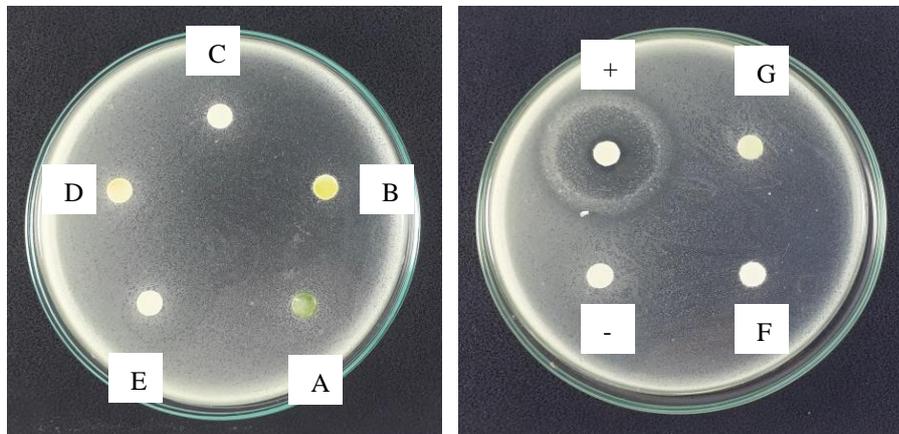
(B)

Gambar 11. Hasil Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi ekstrak isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* inkubasi 1×24 jam.

Keterangan: A (*Streptococcus mutans*), B (*Escherichia coli*) A-G (isolat ekstrak hasil fortifikasi), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).



(A)



(B)

Gambar 12. Hasil Kromatografi Lapis Tipis-Bioautografi ekstrak isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* inkubasi 2×24 jam jam.

Keterangan: A (*S. mutans*), B (*E. coli*), A-G (isolat ekstrak hasil fortifikasi), + (kontrol positif ciprofloxacin), - (kontrol negatif etanol).

Berdasarkan **Gambar 11** dan **Gambar 12** di atas, menunjukkan bahwa semua isolat dar ekstrak tidak menunjukkan adanya zona hambat yang terbentuk terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli*. Secara umum, tidak adanya aktivitas antibakteri yang ditimbulkan oleh ekstrak hasil fortifikasi terhadap bakteri gram positif *Streptococcus mutans* dan gram negatif *Escherichia*

coli, meskipun telah diuji dengan menggunakan konsentrasi yang lebih tinggi atau rendah serta melalui pemurnian melalui Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi diduga senyawa metabolit sekunder hasil ekstrak tersebut memang bersifat antagonis. Hal ini didukung oleh hasil penelitian Qing-Hu *et al.* (2002) yang menguji campuran ekstrak epigalokatekin galat yang dikenal sebagai penyusun utama dari *tea catechin* yang terdapat pada teh (*Camillia sinensis*) dan polymyxin B yang diujikan pada bakteri *Escherichia coli* melaporkan bahwa kandungan senyawa metabolit yang dimiliki oleh epigalokatekin galat seperti tanin dan polifenol tidak menunjukkan sinergisitas dengan polymyxin B dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Kemudian hal ini juga sesuai yang dilaporkan Basir *et al.* (2014) dan Qin *et al.* (2013), bahwa aktivitas antagonis dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang terdapat pada campuran dua atau lebih senyawa disebabkan kurangnya aktivitas dari metabolit sekunder yang dimiliki oleh salah satu senyawa campuran yang dikarenakan adanya penambahan senyawa lain yang digunakan.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

V.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa ekstrak isi kapsul kerang darah *Anadara granosa* L. difortifikasi mikroalga *Spirulina platensis* tidak menunjukkan potensi antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* berdasarkan uji daya hambat dengan variasi konsentrasi tinggi (25%, 50%, 75%, 100%) dan rendah (10%, 15%, 20%, 25%) meskipun telah melalui pemisahan Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi. Tidak adanya potensi antibakteri yang dimiliki diduga karena kandungan senyawa metabolit dalam ekstrak masing-masing kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* bersifat saling antagonis atau tidak sinergis.

V.2 Saran

Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan ekstrak simplisia secara terpisah dari ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* yang kemudian dicampur untuk mendapatkan konsentrasi campuran terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmad, I., Ardana, M., Sulistyarni, R., Prabowo, W.C dan Arifuddin, M. 2017. Phytochemical, TLC Profile, and Antioxidant Activity of Malinau Endemic Plant of Tabar Kedayan (*Aristolochia papilifolia* Ding Hou) Root Fractinos, *International Journal of ChemTech Research*, 10(2), pp.88-90.
- Bashir, S., Khan, B. M., Babar, M., Andleeb, S., Hafeez, M., Ali, S. and Khan, M. F. 2014. Assessment of Bioautography and Spot Screening of TLC of Green Tea (*Camellia*) Plant Extract as Antibacterial and Antioxidant Agents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 76(4): 267-378.
- Beimfohr, C. 2016. A Review of Research Conducted with Probiotic *E. coli* Marketed as Symbioflor. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Bacteriology*. 1-10. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3535621>.
- Balouiri M., Sadiki, M. and Ibsouda S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6 : 71–79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.
- Basri DF, Xian LW, Abd. Shukor, dan Latif J. 2014. Bacteriostatic Antimicrobial Combination Between Epsilon-Viniferin and Vancomycin Against Methicilin Resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed Research International*. 1-8. <https://dx.doi.org/10.1155/2014/461756>.
- Centres for Disease Control and Prevention*. 2017. *Antibiotic Antimicrobial Resistant*. diakses tanggal 20 April 2017. <<http://www.cdc.gov/>>.
- Chadare, F. J., Idohu, R., Nago, E., Affonfere, M., Agossadou, J., Fassinou, T. K., Kenou, C., Honfo, S., Azokpota, P., Linnemann, A. R. and Hounhouigan. 2018. Conventional and food-to-food fortification: An appraisal of past practices and lessons learned. *Food Science & Nutrition*. 7: 2781–2795. doi: 10.1002/fsn3.1133.
- Davis WW, Stout TR. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay, I: factors influencing variability and error. *Appl Microbiol*. 22 (4): 659-665.
- Devi, A. R., Susilowati, A. and Setyaningsih, R. 2019. Enumeration and pathogenic of *Vibrio* in cockle (*Anadara granosa*) in Bantul Yogyakarta. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON*. 5(1): 357-361. doi 10.13057/psnmbi/m050138.
- Dewiningsih, K., Widowati, I. dan Setyati, W. A. 2017. Skrining Aktivitas Antibakteri pada Ekstrak Metanol Jaringan Lunak Kerang Darah (*Anadara*

- Granosa) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Enggano*. 2(2): 229-238.
- Dianawati, N., Setyarini, W., Widjiastuti, I., Ridwan, R. D. and Kuntaman, K. 2020. The distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in children with dental caries severity level. *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)*. 53(1): 36-39. <http://e-journal.unair.ac.id/index.php/MKG>. DOI: 10.20473/j.djmk.v53.i1.p36-39.
- Dwicahyani, T., Sumardianto and Rianingsih, L. 2018. Bioactivity Test of Sea Cucumber *Holothuria atra* Extracts as Antibacterial Agent for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J. Peng.& Biotek*. 7(1): 15-24.
- Etebu, E. and Ariekpar, I. 2016. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*. 4, 90-101.
- Faidiban, A. N., Posangi, J., Wowor, P. M., dan Bara, R. A. 2020. Uji Efek Antibakteri *Chromodaris annae* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Medical Scope Journal*. 1(2): 67-70. Doi:<https://doi.org/10.35790/msj.1.2.2020.27847>.
- Febrina, L., Riris, I. D. dan Silaban, S. 2017. Activity antibacterial to *Escherichia coli* and antioxidant of extract water of leaf binara plant (*Artemisia vulgaris* L.) after blanching. *Jurnal Pendidikan Kimia*. 9(2): 311-317. <http://jurnal.unimed.ac.id/2012/index.php/jpk>.
- Ferial. E. W. 2012. Respon Spermatozoa Manusia Terhadap Gizi Kerang Darah Anadara granosa L. *Jurnal Balik Diwa*. 3(2): 53-57.
- Ferial. E. W., Asnady, M. and Juniarti, A. 2020. Quality of Spermatozoid Preclinical Analysis on Male Mice *Mus Musculus* L. *Technology Reports of Kansai University*. 62: 2477-2483.
- Firdiyani, F., Agustini, T. W. dan Ma'ruf W. F. 2015. Ekstraksi Senyawa Bioaktif Sebagai Antioksidan Alami *Spirulina platensis* Segar dengan Pelarut yang Berbeda. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 18(1): 28-37.
- Fitriah, Mappiratu and Prismawiryanti. 2017. Antibacterial Activity Test of Johar Plant Leaf Extract (*Cassia siamea* Lamk.) Using Several Levels of Solvent Polarity. *Kovalen Jurnal Riset Kimia*. 3(3): 242-251.
- Fransisca, M. and Dianursanti. 2019. The Effect of Adding Microalgae *Spirulina platensis* in Making Antibacterial Soap. *AIP Conference Proceedings*. 1-7. <https://doi.org/10.1063/1.5139330>.

- Freteš. H. D., Susanto, AB., Prasetyo, B. dan Limantara L. 2012. Carotenoid from macroalgae and microalgae: Health Potential, Application and Biotechnology. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 23 (2): 221-228. <https://www.researchgate.net/publication/304506351>. DOI:10.6066/jtip.2012.23.2.221.
- Hoseini, S. M., Khosravi, Darani, K. and Mozafari, M. R. 2013. Nutritional and Medicinal Applications of *Spirulina* Microalgae. In: Mini-Review in Medicinal Chemistry. 13, 1231-1237. *Bentham Science Publishers*. doi: 10.2174/1389557511313080009.
- Ilhamudin, M., Hilyana, S. and Astriana. 2019. Effect of Mangrove Density on Growth and Survival Rate of Blood Cockles (*Anadara granosa*). *Journal Perikanan*. 9(1): 75-85. DOI: <https://doi.org/10.29303/jp.v8i2.142>.
- Jamin, F., Abrar, M., Dewi, M., Yanrivina, S.V.S., Fakhurrazi, and Manaf, Z. H. 2015. Infection of *Escherichia coli* Bacteria on Chick *Gallus domesticus* at Lamboro Market Aceh Besar. *Journal Medica Veterinaria*. 9(1).
- Jebur, M. Sh. 2012. Impacts of virulence factors of *Streptococcus mutans* isolates on the pathogenesis of acute vaginitis. *International journal of Nursing and Midwifery*. 4(2): 16-20. DOI:10.5897/IJNM10.006.
- Karnisa, Y., Desrina and Widowati, I. 2019. Parasites Identification and Histopathology Changes on Blood Cooke (*Anadara granosa* Linnaeus, 1758). *Indonesian Journal of Marine Sciences*. 24(4): 171-178. doi: 10.14710/ik.ijms.
- Kapoor. G., Saigal, S. and Elongavan, A. 2019. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 33, 300-305. doi: 10.4103/joacp.JOACP.
- Kathireshan, Priya, T., Jasmine, K. D., Gayathri, G. and Kumar, M. R. R. 2019. Assessment of *in vitro* Antibacterial and Antifungal Activities of leaf extract of *Melia azedarach* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 81(2): 380-384.
- Kumar, D. S., Janakiram, P., Kumar, M. M. K., Geetha, G. K. 2017. Inhibitory activity of bio-active compounds isolated from *Anadara granosa* in shrimp health management. *World Journal Microbiol Biotechnol*. 33-207. Doi10.1007/s1 1274-017-2340-04.
- Kurmusoğlu, S., Gareayaghi, N. and Kocazeybek, B. S. Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. 1-9 DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85211>.

- Krzysciak, W., Koscielniak D., Papiez, M., Jurczak A. and Vyhouskaya, P. 2017. Methods of Biotyping of *Streptococcus mutans* Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries. *Hindawi Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article 1-16. <https://doi.org/10.1155/2017/6589543>.
- Lemos, J. A., Palmer, S.R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J. and Brady, L. J. 2019. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Published in final edited form as: Microbiol Spectr.*7(1).doi:10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018.
- Lobritz MA, Belenky P, Porteb CB, Gutierrez A, Yang JH, Schwarz EG, Dwyerh DJ, Khalila AS, dan Collins JJ. 2015. Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration. *PNAS.* 112 (27): 8173-8180. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1509743112>.
- Maghfirah, F., Saputri, D. and Basri. 2017. Aktivitas Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans* Setelah Dipapar dengan *Cigarette Smoke Condensate* dan Minuman Probiotik. *Journal Caninus Dentistry.* 2(1): 12-19.
- Marangoni, A., Foschi, C., Micucci, M., Palomino, R. A. N., Toschi, T. G., Vitali, B., Camarda, L., Mandrioli, M., Giorgio, M. D., Aldini, R., Corazza, I., Chiarini, A., Cevenini, R. and Budriesi, R. 2017. Research Article In vitro activity of *Spirulina platensis* water extract against different *Candida* species isolated from vulvo-vaginal candidiasis cases. . *PLoS ONE* 12(11): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188567>.
- Mariani Y, Yusro F, dan Wardenaar E. 2020. Aktivitas Ekstrak Methanol Daun Ulin (*Eusideroxylon Zwageri* Teijsm & Binn) Terhadap Empat Jenis Bakteri Patogen. *Jurnal Biologi Tropis,* 20(1), 94. <https://doi.org/10.29303/jbt.v20i1.1642>.
- Mawardi, dan Sarjani, T. M. 2017. The quality of *Anadara granosa* based on Cadmium metal test in the coastal area of Langsa in Aceh. *Jurnal Biologi Edukasi Edisi 19.* 9(1): 39-44.
- Muharni, Fitriya dan Farida, S. 2017. Antibacterial Assay of Ethanolic Musi Tribble Medicinal Plant in Musi Banyuasin, South Sumatera. *Jurnal Kefarmasian Indonesia.* 7(2):127-135. Doi:10.22435/jki.v7i2.6070.127-135.
- Nege, A. S., Masithah, E. D. and Khotib. J. 2020. Trends the Uses of *Spirulina* Microalga: A Mini-Review. *Scientific Journal Of Fisheries and Marine.* 12(1): 149-166. doi:10.20473/jipk.v12i1.17506.
- Neufeld, L. M., Baker, S., Garrett, G. S. and Haddad, L. 2017. Coverage and Utilization in Food Fortification Programs: Critical and Neglected Areas

of Evaluation. *The Journal of Nutrition*: 1015-1019. doi:10.3945/jn.116.246157.

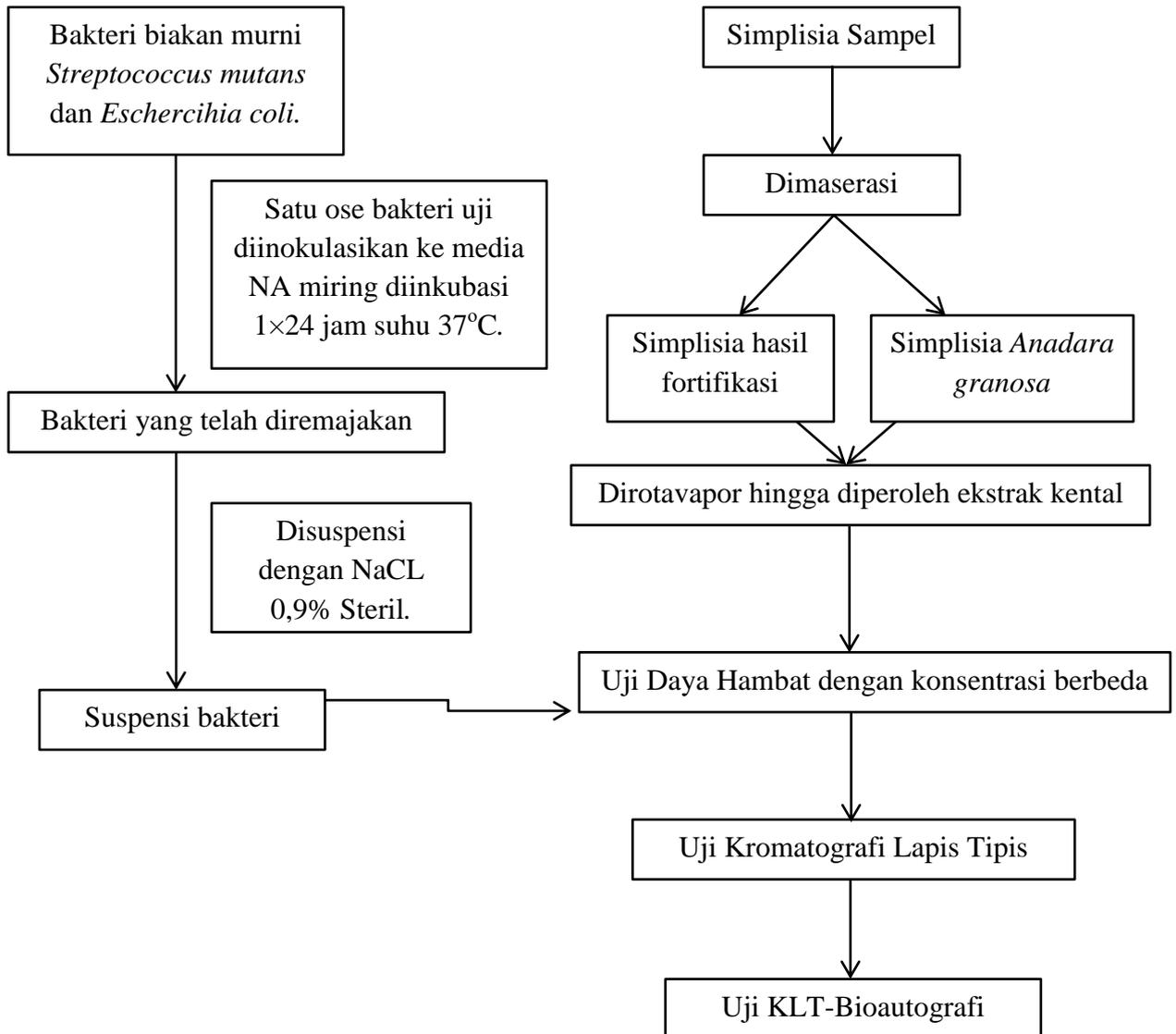
- Nisa, I. F., Handayani, O. W. K. and Rustiana, E. R. 2019. Analysis of *Escherichia coli* Existence Factors in Street Food at Primary School in Nggrogot District. *Public Health Perspective Journal*. 4(1): 23-29.
- Notonegoro, H., Setyaningsih, I. dan Tarman, K. 2018. The Active Compounds of *Spirulina platensis* Grown on Walne Media with Different NaNO_3 Concentration. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 3(2): 111-122. DOI: <http://dx.doi.org/10.15578/jpbkp.v13i2.555>.
- Nurahasanah, dan Endang, S. G. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Daun Kirinyuh (*Chromolaena odorata*) Terhadap Bakteri MDR (Multi Drug Resistant) dengan Metode KLT Bioautografi. *The journal of Biosciences*. 6(2):45-52. DOI. <https://doi.org/10.24114/jbio.v6i2.16600>.
- Nurliyana, M. R., Sahdan, M. Z., Wibowo, K. M., Muslihati, A., Saim, H., Ahmad, S. A., Sari, Y. and Mansor, Z. 2017. The Detection Method of *Escherichia coli* in Water Resources: A Review. *Journal of Physics: Conference Series*. 1-12. doi: 10.1088/1742-6596/995/1/012065.
- Nugraha, A. W. 2008. *Streptococcus mutans*, Si Plak Dimana-mana. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Paramita, S., Yasir, Y., Yuniati, Y. dan Sina, I. 2018. Analisis Bioautografi Lapis Tipis dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bawang Tiwai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb) Terhadap Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(9): 470-478.
- Pratiwi, W., Suwanti, L. T and Satyantini, W. H. 2016. Deeping Of Extract *Spirulina plantesis* To Ig-M, Spleen Tissue And Diferential Leucocyte Of Carp After Infected By *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Biosains Pascasarjana Universitas Airlangga, Indonesia* 18(3): 218-230.
- Prasadi, O., Setyobudiandi, I., Butet, N. A. dan Nuryati, S. 2016. Characteristics Morphologically of Family Arcidae in Different Coastal Waters (Karangantu and Labuan, Banten). *Jurnal Teknologi Lingkungan*. 17(1): 29-36.
- Putri R, Mursiti S dan Sumarni, W. 2017. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Temu Putih dan Temulawak Terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal MIPA*. 40(1): 43-47. <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/JM>.
- Qin R, Xiao K, Li B, Jiang W, Peng W, Zheng J, dan Zhou H. (2013). The Combination of Cathecin and Epicatechin Gallate From Fructus Crataegi Potentiates β -Lactam Antibiotics against Methicillin-resistnt *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. *International Journal*

- Qing-Hu Z, Hua-Zhao W, Yoda Y, Asano N, Hara Y, dan Shimamura T. (2002). Additive, Indifferent and Antagonistic Epigallocatechin Gallate with 12 non β -Lactam Antibiotics against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 50:1051-11054. <https://doi.org/10.1092/jac/dkf250>.
- Qiu, W., Zhou, Y., Li, Z., Huang, T., Xiao, Y., Cheng, L., Peng, X., Zhang, L. and Ren, B. 2020. Application of Antibiotic/Antimicrobial Agents on Dental Caries. *Hindawi BioMed Research International*. 1-11. <https://doi.org/10.1155/2020/5658212>.
- Ranganathan, V. and Akhila, CH. 2019. *Streptococcus mutans*: has it become prime perpetrator for oral manifestations? *Journal of Microbiology & Experimentation*. 7(4):207–213: DOI: 10.15406/jmen.2019.07.00261.
- Safari R., Amiri, R. and Kenari, E. 2020. Antioxidant and Antibacterial Activities of C-Phycocyanin from Common Name *Spirulina platensis*. *Ira Journal of Fisheries Sciences*. 19(4): 1911-1927. doi: 10.22092/ijfs.2019.118129.
- Sagar, A. 2016. Morphology of E.coli. Departemen Mikrobiologi, Kolese St. Xavier, Kathmandu, Nepal.
- Sahin, O. I. 2019. Effect of Spirulina Biomass Fortification for Biscuits and Chocolates. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 7(4): 583-587. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v7i4.583-587.2204>.
- Savitri, N. H., Indiasuti, D. N. and Wahyunitasari, M. R. 2019. Inhibitory Activity of Allium Sativum L. Extract Against *Streptococcus pyogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Vocational Health Studies*. 3: 72-77. doi: 10.20473/jvhs.V3I2.
- Setianingsih, R., Zulkifli, H. and Hanafiah, Z. 2016. Blood Clams Community (*Anadara granosa*) in The Eastern Coastal Waters of Banyuasin Regency South Sumatera). *Sriwijaya Journal of Environment*. 1(1):18-23. <https://dx.doi.org/10.22135>.
- Septiani, Dewi. E. N and Wijayanti, I. 2017. Antibacterial Activities of Seagrass Extracts (*Cymodocea rotundata*) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Available online at *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology (IJFST)*. 13(1): 1-6.
- Simmons, M. D., Miller, L. M., Sundstrom, M. O. and Johnson, S. 2020. Aptamer-Based Detection of Amphotericin B in Urine Samples. *Journal Antibiotics MDPI*. 1-16. doi:10.3390/antibiotics9100655.

- Sitompul, M. K. 2020. Identifikasi Keanekaragaman Jenis-Jenis Kerang (Bivalvia) Daerah Pasang Surut di Perairan Desa Teluk Bakau. *Jurnal Manajemen Riset dan Teknologi*. 2(1): 42-51.
- Soegianto, A., Putranto, T. W. C., Lutfi, W., Almirani, F. N., Hidayat, A. R., Muhammad, A., Firdaus, R. A., Rahmadhani, Y. S., Fadila, D. A. N. and Hidayat. D. 2020. Concentrations of Metals in Tissues of Cockle *Anadara granosa* (Linnaeus, 1758) from East Java Coast, Indonesia, and Potential Risks to Human Health. *International Journal of Food Science*. 1-9. <https://doi.org/10.1155.2020/5345162>.
- Solang, M. 2017. Blood cockle (*Anadara granosa*) supplementation to increase serum calcium level and femur growth of low-protein diet rat. *Nusantara Bioscience*. 9(1): 62-67. DOI: 10.13057/nusbiosci/n090111.
- Trimulyani, Y. W., Rokiban, A dan Sari, M. 2019. Ethanol, Chloroform, and N-hexane Fractions of Frangipani Flowers (*Plumeria acuminata* L.) As Antibacterial Against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* With Bioautography. *Jurnal Farmasi Lampung*. 8(2):111-122.
- Whiting, S. J., Kohrt, W. M., Warren, M. P., Kraenzlin, M. I. and Bonjour, J. P. 2016. Food fortification for bone health in adulthood: a scoping review. *European Journal of Clinical Nutrition*. 70: 1099-1105.
- Wulandari. R., Untari, Budi, Mulyani. dan Neti, L. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Fikosianin dan Eksopoliskarida *Spirulina platensis* Terhadap Bakteri Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* dan Vancomycin-Resistant *Enterococcus*. *Undergraduate Thesis*. Sriwijaya. University.
- Yasir, A. S., Wiranti, M. W. dan Wulantika, N. W. 2019. Ulasan Pustaka: Potensial *Spirulina platensis* of Activities, Antidiabetes, and antihipertens. *Journal of Pharmacy Malahayati*. 2(2): 164-174.
- Yulineri, T dan Nurhidayat, N. 2015. Antibacterial activity test of *Lactobacillus plantarum* isolated from passion fruits (*passiflora edulis*) and its relation to plantaricin gene (plnA). *Prosiding seminar nasional : Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. 1(2). Doi: <http://doi.org/10.13057/psnmbi/m0120217>.
- Zainuddin, Soesilo, N. P. dan Trijoko. Keragaman Genus Anadara Berdasarkan Karakter Morfologis Dan Habitat di Perairan Pantai, Kota Tarakan, Kalimantan Utara. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*. 3: 26-29.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema Kerja Ekstraksi, Uji Daya Hambat dan KLT Bioautografi Ekstrak Isi Kapsul Hasil Fortifikasi Kerang Darah *Anadara granosa* L dan *Spirulina platensis*



Lampiran 2. Hasil Ekstrak Simplisia



(A) (B)

Gambar 1. Proses maserasi, (a) simplisia isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis*, (B) Simplisia kerang darah *Anadara granosa* L.



(A) (B)

Gambar 2. (A) Ekstrak kental hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. dan *Spirulina platensis* dan (B) ekstrak kerang darah *Anadara granosa* L.



Gambar 3. Hasil pengenceran ekstrak sampel hasil fortifikasi dengan konsentrasi berbeda

Lampiran 3. Isolat bakteri uji



Lampiran 4. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* pada masa inkubasi 1×24 jam dan 2×24 jam (menggunakan konsentrasi tinggi).

Nama Bakteri Uji	Waktu inkubasi	Diameter Zona Hambatan (mm)						
		25%	50%	75%	100%	Ag 25%	Kontrol (+)	Kontrol (-)
<i>Streptococcus mutans</i>	1×24 jam	7,10	0	0	0	10,32	24,15	0
	2×24 jam	7,22	0	0	0	10,48	23,90	0
<i>Escherichia coli</i>	1×24 jam	7,85	0	0	0	10,78	24,45	0
	2×24 jam	9,75	0	0	0	12,22 5	24,08	0

Lampiran 5. Hasil pengukuran zona hambat ekstrak isi kapsul hasil fortifikasi kerang darah *Anadara granosa* L. terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan *Escherichia coli* pada masa inkubasi 1×24 jam dan 2×24 jam (menggunakan konsentrasi rendah).

Nama Bakteri Uji	Waktu inkubasi	Diameter Zona Hambatan (mm)						
		10%	15%	20%	25%	Ag 25%	Kontrol (+)	Kontrol (-)
<i>Streptococcus mutans</i>	1×24 jam	0	0	0	0	8,15	25,50	0
	2×24 jam	0	0	0	0	8,45	25,42	0
<i>Escherichia coli</i>	1×24 jam	0	0	0	0	9,25	26,08	0
	2×24 jam	0	0	0	0	9,325	25,90	0

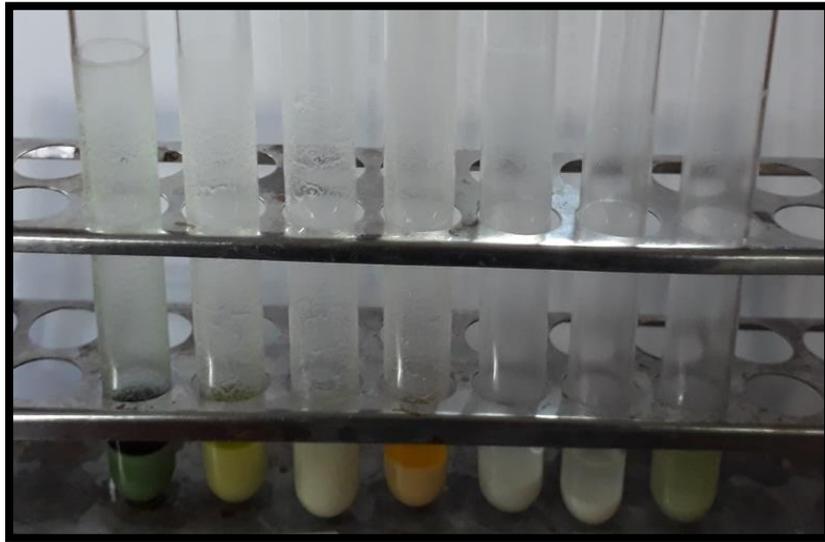
Lampiran 6. Hasil Kromatografi Lapis Tipis



Gambar. 5. Bercak noda yang tampak pada UV 245 nm

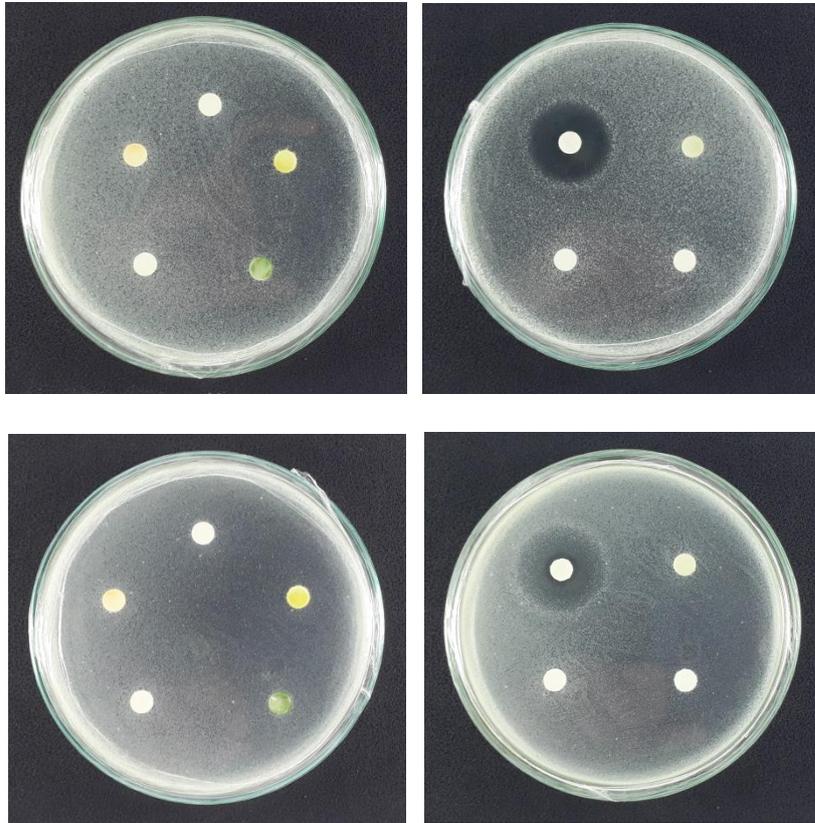


Gambar. 6. Bercak noda yang tampak pada UV 365 nm

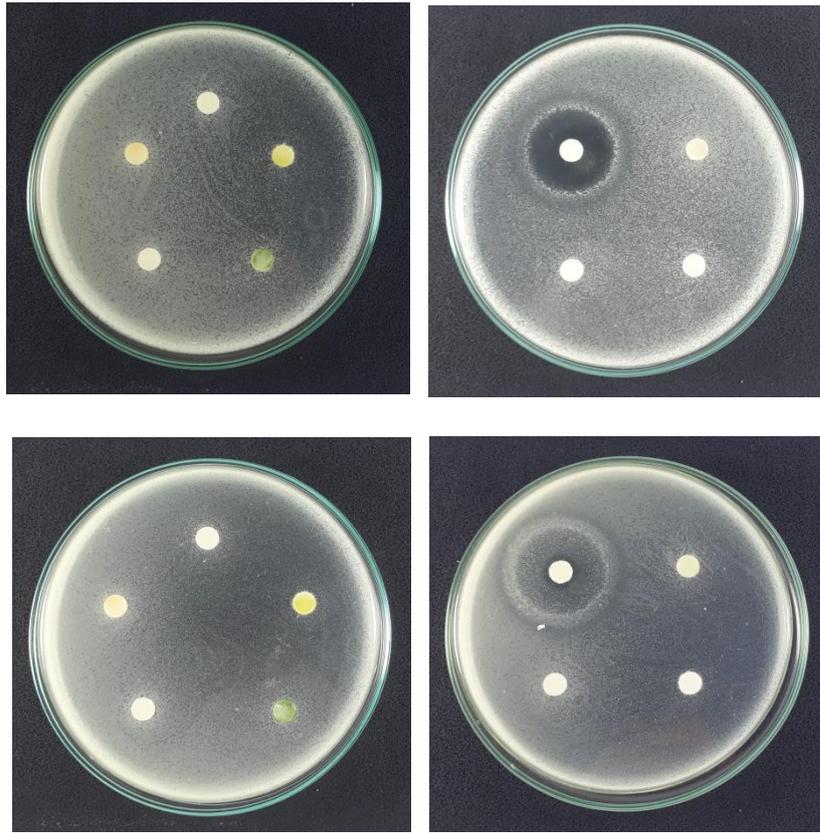


Gambar 7. Isolat hasil pemisahan kromatografi Lapis Tipis

Lampiran 7. Hasil Kromatografi Lapis Tipis Bioautografi



Gambar 8. Hasil KLT-Bioautografi inkubasi 1×24 jam



Gambar 9. Hasil KLT-Bioautografi 2 × 24 jam