

Bab II Tinjauan Pustaka

II.1 Mikroalga

Mikroalga merupakan mikroorganisme yang termasuk dalam tumbuhan tingkat rendah. Mikroalga dikelompokkan dalam filum Thallophyta karena tidak memiliki akar, batang dan daun namun memiliki klorofil yang mampu melakukan fotosintesis (Utami, 2014). Mikroalga dapat hidup di air tawar, payau, air laut, dan tempat basah yang lazim disebut fitoplankton, memiliki bentuk yang bervariasi seperti filamen atau lembaran, spiral, dan bulat (Utami, 2014).



Gambar II.1 Macam-macam Bentuk Mikroalga
(Sumber : <http://www.biofarmshawaii.com/> diakses pada 30 Oktober 2018)

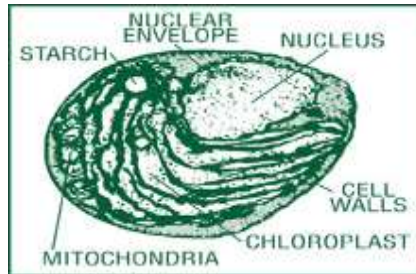
Sebagian kecil mikroalga digolongkan sebagai prokariot, namun pada umumnya dalam klasifikasi mikroalga termasuk ke dalam eukariot. Mikroalga dapat berupa plankton yang sebagian besar hidup secara uniseluler atau dapat juga ditemukan sebagai bentik yang berada di dasar perairan dangkal yang masih terjangkau sinar matahari. Mikroalga bentik dapat tumbuh dengan menempel di batu (*epilithic*),

lumpur atau pasir (*epipellic*), tanaman lain (*epifit*), atau menempel pada hewan lainnya (*epizoic*) (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.2 Morfologi Mikroalga *Chlorella vulgaris*

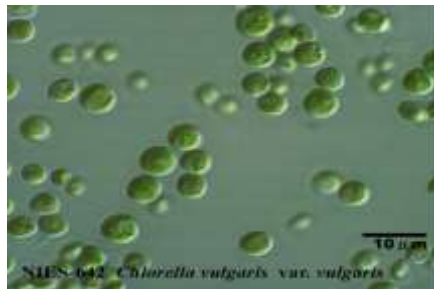
Alga hijau dari genus *Chlorella* ditempatkan dibawah ordo Chlorococcales dan famili Oocystaceae. Sel ditemukan sebagai sel tunggal, koloni atau filamen dan cenderung berkumpul menjadi koloni, hijau kekuning-kuningan, diameter 4 sampai 8 μm , dan tanpa flagella. Mikroalga berukuran antara 1-100 μm (Pradhan dkk., 2014). *Chlorella vulgaris* memiliki bentuk bulat, lonjong dan garis di tengah sel antara 2-8 μm berbentuk mangkuk atau pita melengkung dengan atau tanpa pirenoid.

Struktur sel mikroalga *Chlorella vulgaris* terdiri dari nukleus (inti), *dense body* (badan golgi), kloroplas, pirenoid, mitokondria dan *starch* (Pati) (Utami, 2014). Dinding sel adalah hialin yang halus dan tipis yang terdiri dari selulosa dan pektin serta glukukan. Tiap-tiap selnya terdapat satu buah inti dan satu kloroplas. Kloroplas dikelilingi oleh dua selaput membran tanpa retikulum endoplasma dan didalamnya terdapat tilakoid yang ditumpuk membentuk grana. Pirenoid (jika ada) terdapat dalam kloroplas dan sering kali ditembus oleh tilakoid. Terdapat molekul-molekul yang melingkar dari DNA kloroplas dan terkonsentrasi dalam sejumlah gumpalan kecil (diameter 1-2 μm) (Barsanti dan Gualtieri, 2006).



Gambar II.2 Struktur Morfologi *Chlorella* sp.. (Vashishta, 1978)

Kingdom :	Plantae
Phylum :	Chlorophyta
Kelas :	Chlorophyceae
Ordo :	Chlorococcales
Famili :	Oocystaceae
Genus :	<i>Chlorella</i>
Spesies :	<i>Chlorella vulgaris</i>



Gambar II.3 Bentuk Sel Mikroalga *Chlorella vulgaris*

(Sumber:http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/unicells/non_flagellated/CHLORELLA/Chlorella_Image_page.htm
Diakses pada 30 Oktober 2018)

Mikrolaga *Chlorella vulgaris* berkembangbiak secara vegetatif dengan cara membelah diri dan pembentukan spora. Masing-masing sel induk membelah menghasilkan 4, 8 atau 16 spora yang dibebaskan bersama dengan pecahnya sel induk. Spora yang dibebaskan akan membentuk sel *Chlorella vulgaris* baru (Utami, 2014). Chlorophyta berupa fotoautotrop tetapi bisa juga heterotrop. *Chlorella vulgaris* bersifat fotoautotrof, yaitu dapat membentuk makanannya sendiri melalui proses fotosintesis. Tubuhnya terdiri atas satu sel (uniseluler) dan ada pula yang banyak sel (multiseluler) (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.3 Kandungan Mikroalga *Chlorella vulgaris*

Mikroalga memiliki kemampuan intrinsik untuk menyerap H₂O dan CO₂ dengan bantuan sinar matahari untuk mensintesis senyawa organik kompleks. Hasil sintesis terakumulasi dan/atau disekresikan sebagai metabolit primer atau sekunder (Pradhan dkk., 2014), berupa substansi potensial yang digunakan dalam industri makanan, farmasi dan kosmetik. Chlorophyceae adalah kelas alga hijau yang berasal dari filum Chlorophyta memiliki klorofil *a* dan *b*, β - dan γ -karoten, dan beberapa xantofil sebagai pigmen aksesori. Chlorophyceae membutuhkan karbon dioksida, beberapa nutrien dan cahaya untuk berfotosintesis serta hidup di air tawar atau laut. Polisakarida yang terdapat dalam mikroalga *Chlorella vulgaris* berupa pati dalam bentuk butiran di dalam kloroplas. *Chlorella* mengandung pigmen fotosintetik berwarna hijau yaitu klorofil *-a* dan *-b* dalam kloroplasnya dengan satu pirenoid, kurang lebih terletak ditengah. Klorofil yang terkandung dalam mikroalga berperan pada proses fotosintesis dengan bantuan H₂O, CO₂ dan sinar matahari untuk menghasilkan energi yang

digunakan untuk biosintesis sel, pertumbuhan dan penambahan sel, bergerak atau berpindah dan reproduksi (Yosti, 2017).

Sejumlah besar ekstrak alga ditemukan memiliki aktivitas antibakteri. Mikroalga sebagai bahan alam bahari memiliki potensi untuk menghasilkan senyawa bioaktif yang sulit untuk disintesis secara kimia. Sebagian besar senyawa tersebut terakumulasi dalam biomassa dari mikroalga, dan disekresikan selama pertumbuhannya ke lingkungan (Pradhan dkk., 2014).

Kelompok utama senyawa antibakteri yang ditemukan dalam mikroalga adalah asam lemak, lipid, pigmen, polifenol, karbohidrat, hidrokarbon sederhana dan beberapa turunan lainnya. Selain memiliki aktivitas sebagai antibakteri, mikroalga juga menghasilkan beberapa vitamin penting seperti vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat (Fasya dkk., 2013). Menurut Pradhan dkk., (2014) lebih dari 20 vitamin dan mineral ditemukan dalam *Chlorella*, termasuk zat besi, kalsium, kalium, magnesium, fosfor, pro vitamin A, vitamin C, B₁, B₂, B₅, B₁₂, E, dan K, inositol dan asam folat. Mikroalga famili Oocystaceae menghasilkan asam lemak tak jenuh omega-3, 6, dan 9, serat, vitamin, protein, dan mineral (Yosti, 2017).

Chlorella vulgaris adalah genus alga hijau uniseluler yang mengandung protein tingkat tinggi (50 hingga 70% dari bahan kering), lipid, vitamin dan mineral. *Chlorella* adalah sumber makanan yang memiliki nutrisi yang tinggi diantaranya mengandung 60% protein, 18 asam amino (termasuk semua asam amino esensial), dan berbagai

vitamin dan mineral. Ketika dikeringkan, kandungan *Chlorella* sekitar 45% protein, 20% lemak, 20% karbohidrat, 5% serat dan 10% mineral dan vitamin.

Inti sel *Chlorella* mengandung kompleks peptida nukleotida unik yang dikenal sebagai faktor pertumbuhan *Chlorella* (CGF). CGF dapat meningkatkan pertumbuhan sel *Chlorella*, merangsang perbaikan jaringan dan penyembuhan sampai taraf tertentu. Selain itu, *Chlorella* juga merupakan sumber asam lemak esensial yang diperlukan untuk berbagai fungsi biokimia penting, termasuk keseimbangan hormon. *Chlorella* juga mengandung klorofil (3 hingga 5%), β -karoten, dan DNA/RNA.

Pradhan dkk., (2014) telah mengisolasi senyawa antibakteri dari mikroalga *Chlorella*, berupa campuran asam lemak yaitu *Chlorellin*. Pada campuran tersebut diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Senyawa antibakteri bertindak selektif terhadap mikroba tetapi memiliki efek minimal terhadap host atau tidak mempengaruhi fungsi host. Secara luas senyawa antibakteri memiliki efektivitas bakterisida atau bakteriostatik (Pradhan dkk., 2014). Mekanisme kerja antibakteri dapat dikategorikan berdasarkan struktur bakteri atau fungsi yang dipengaruhi oleh senyawa aktif dari mikroalga.

II.4 Faktor-faktor Pertumbuhan Mikroalga

Pertumbuhan mikroalga dalam kultur dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain : unsur hara (nutrisi), suhu, derajat keasaman(pH), cahaya, salinitas air laut, konsentrasi CO₂ (aerasi).

II.4.1 Unsur Hara (Nutrisi)

Media merupakan tempat hidup bagi mikroalga yang pemilihannya ditentukan oleh jenis mikroalga yang akan dikultivasi. Penggunaan media kultur yang berbeda akan berpengaruh terhadap waktu *lag phase* dan konstanta pertumbuhan spesifik serta kepadatan akhir. Pertumbuhan mikroalga akan optimal jika nutrisi yang dibutuhkan mencukupi. Nutrisi yang dibutuhkan terdiri dari makronutrien dan mikronutrien. Makronutrien merupakan nutrisi yang dibutuhkan dalam jumlah besar yaitu C, H, O, N, K, Mg dan P. Sedangkan mikronutrien merupakan nutrisi yang diperlukan dalam jumlah yang kecil tetapi harus ada diantaranya seng, tembaga, boron adalah senyawa esensial bagi pertumbuhan sel (Utami, 2014).

Di antara nutrisi tersebut, unsur N dan P merupakan unsur yang biasa menjadi faktor pembatas untuk pertumbuhan mikroalga. Unsur nitrogen dibutuhkan sebagai unsur pembentuk struktur protein, DNA, RNA, dan ATP. Dalam kultivasinya, setiap mikroalga membutuhkan nutrisi untuk dapat berkembang biak. Biasanya, digunakan medium premix (medium utama) dengan komposisi makro dan mikronutrien lengkap, contohnya medium Walne (Abyor, 2012).

II.4.2 Suhu

Suhu pertumbuhan mikroalga idealnya sedekat mungkin dengan suhu dimana organisme tersebut berasal. Suhu optimum untuk pertumbuhan mikroalga adalah antara 16 dan 27°C, tetapi suhu ini dapat berubah-ubah sesuai dengan tempat, komposisi media kultur, dan strain mikroalga yang digunakan. Suhu 18-20°C sering digunakan untuk menumbuhkan mikroalga. Suhu <16°C dapat memperlambat pertumbuhan mikroalga dan suhu >35°C dapat menimbulkan kematian pada beberapa mikroalga (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.4.3 Derajat Keasaman (pH)

Mikroalga tumbuh dalam rentang pH 7–9 dengan rata-rata pH optimum berkisar antara 8,2–8,7 (Lavens dan Sorgeloos, 1996). Mikroalga dapat hidup mulai dari lingkungan yang sangat asam (pH mendekati 0). Pengontrolan pH kultur mikroalga adalah salah satu faktor penting karena bila pH medium tidak sesuai maka akan berpengaruh pada pembelahan sel mikroalga dan mengakibatkan kegagalan kultur bahkan kematian sel mikroalga. Ketika kepadatan sel meningkat, akan terjadi sedikit penurunan pH kultur akibat sisa metabolisme (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.4.4 Intensitas Cahaya

Cahaya diperlukan bagi pertumbuhan mikroalga dan berperan dalam proses fotosintesis. Intensitas cahaya untuk tiap mikroalga berbeda-beda untuk dapat tumbuh secara optimum. Alga hijau meningkat pertumbuhannya pada suhu tinggi dan intensitas cahaya tinggi (Kawaroe dkk., 2010), tetapi cahaya bisa saja menjadi faktor pembatas pertumbuhan pada mikroalga (*limiting factor*). Hal ini terjadi pada

bagian air yang lebih dalam atau lebih keruh atau intensitas cahaya yang digunakan pada kultur terlalu tinggi.

Penyinaran dengan menggunakan lampu selama kultur digunakan sebagai pengganti cahaya matahari. Intensitas cahaya yang digunakan disesuaikan dengan kedalaman kultur dan kepadatan sel alga. Pada kedalaman dan konsentrasi sel yang tinggi, intensitas cahaya harus ditingkatkan agar dapat menembus kultur. Selain itu, pencahayaan yang terlalu tinggi harus dihindari. Banyak spesies mikroalga tidak dapat tumbuh dengan baik di bawah penerangan konstan, meskipun mikroalga yang dibudidayakan berkembang secara normal. Oleh karena itu, siklus terang / gelap (LD) digunakan (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.4.5 Salinitas

Salinitas adalah faktor yang berpengaruh terhadap pertumbuhan organisme yang hidup di air. Salinitas berfungsi untuk mempertahankan tekanan osmotik antara protoplasma organisme dengan air sebagai lingkungan hidupnya (Kawaroe dkk., 2010). Pertumbuhan mikroalga laut sangat dipengaruhi oleh perubahan salinitas. Kebanyakan spesies tumbuh dengan salinitas lebih rendah dibandingkan dengan habitat aslinya. Salinitas optimum untuk pertumbuhan mikroalga adalah 20-25 g/L (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

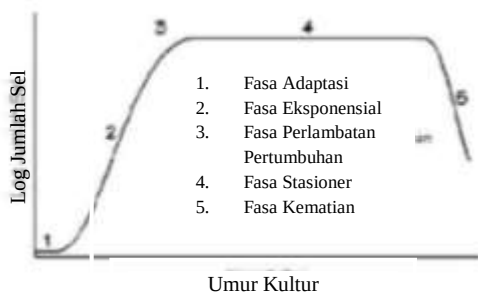
II.4.6 Konsentrasi CO₂ (aerasi)

Aerasi atau pengaliran CO₂ digunakan sebagai sumber karbon selain itu udara juga dibutuhkan untuk mencegah terjadinya pengendapan

mikroalga di dasar wadah atau bejana tempat tumbuh mikroalga dan untuk memastikan bahwa semua sel terkena cahaya dan nutrisi. Udara dalam bentuk CO₂ digunakan sebagai sumber karbon yang dibutuhkan dalam proses fotosintesis (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.5 Fase Pertumbuhan Mikroalga

Pada umumnya, pola pertumbuhan mikroalga terbagi menjadi 5 tahap yang terdiri dari fase adaptasi/lag, fase logaritmik/eksponensial, fase perlambatan pertumbuhan, fase stasioner, dan fase kematian (Utami, 2014).



Gambar II.4 Pola Pertumbuhan Mikroalga

Sumber: Lavens dan Sorgeloos (1996)

II.5.1 Fase Adaptasi/Lag

Fase adaptasi/lag ditandai dengan adanya penambahan kelimpahan mikroalga tetapi dalam jumlah sedikit. Hal ini akibat adanya perubahan kondisi lingkungan medium tumbuh dari kondisi awal ke medium yang baru (Kawaroe dkk., 2010), terjadi penyesuaian sistem metabolisme pertumbuhan mikroalga, penyesuaian terhadap medium

baru serta dimulainya penyerapan nutrisi dari medium (Lavens dan Sorgeloos, 1996).

II.5.2 Fase logaritmik/eksponensial

Pada fase ini nutrisi, pH, CO₂, dan mikroalga sedang dalam kondisi yang sangat baik (Barsanti dan Gualtieri, 2006) sehingga terjadi proses pembelahan sel mikroalga dengan adanya penambahan biomassa yang sangat cepat yang ditandai dengan perubahan warna kultur menjadi lebih pekat. Oleh sebab itu, untuk keperluan budi daya sebaiknya pemanenan dilakukan pada akhir fase eksponensial karena pada fase ini struktur sel masih berada pada kondisi normal dan secara nutrisi terjadi keseimbangan antara nutrisi dalam medium dan nutrisi dalam sel (Kawaroe dkk., 2010).

II.5.3 Fase perlambatan pertumbuhan

Fase penurunan pertumbuhan (*declining growth phase*) dimana terjadi pengurangan kecepatan pertumbuhan sel mikroalga yang disebabkan oleh berkurangnya kuantitas nutrisi, pH, karbondioksida, dan faktor fisika-kimia pertumbuhan berada di bawah batas normal, sehingga mempengaruhi kecepatan pembelahan sel dibandingkan pada fase sebelumnya (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.5.4 Fase stasioner

Fase stasioner ditandai dengan adanya pertumbuhan mikroalga yang terjadi secara konstan karena jumlah sel yang membelah sama dengan jumlah sel yang mati. Hal ini disebabkan oleh berkurangnya nutrisi dalam medium yang tidak lagi mendukung mikroalga untuk bisa melakukan pembelahan sel. Selain itu, semakin bertambahnya

populasi mikroalga dalam kultur mengakibatkan bertambah pekatnya medium. Hal ini berpengaruh pada penetrasi cahaya yang terhalang oleh bayangannya sendiri (*self-shading*). Sehingga terjadi persaingan dalam pemenuhan kebutuhan akan cahaya di antara mikroalga tersebut (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.5.5 Fase kematian

Fase kematian ditandai dengan kematian mikroalga yang terjadi karena adanya perubahan kualitas air. Rendahnya nutrisi dan tingginya jumlah sel mikroalga mati yang melepaskan metabolit sekunder dapat menghambat pertumbuhan sel (Barsanti dan Gualtieri, 2006). Fase ini dapat diamati dari warna medium yang berubah menjadi lebih keruh, terdapat buih di permukaan medium, serta terjadi endapan pada dasar tempat yang digunakan untuk budi daya mikroalga tersebut (Kawaroe, dkk., 2010).

II.6 Teknik Kultivasi Mikroalga

Teknik pengkulturan mikroalga terdiri dari tiga jenis, yaitu teknik *batch*, teknik berkesinambungan (*continue*), dan teknik semi-berkesinambungan (*semi-continue*).

II.6.1 Teknik kultur *batch*

Teknik kultivasi mikroalga yang paling umum adalah teknik kultur *batch*. Teknik ini dilakukan dengan cara menginokulasi sejumlah kultur mikroalga dan mengkultivasinya, dalam metode ini sel alga dibiarkan tumbuh dan bereproduksi dalam wadah tertutup. Satu set kultur *batch* dapat berupa labu Erlenmeyer 250 ml dengan kapas/kasa dan udara digelembungkan ke dalam kultur untuk mempertahankan

kadar oksigen dan karbon dioksida serta mencegah terjadinya sedimentasi.

Kultivasi dilakukan selama periode pertumbuhan tertentu dan dipanen ketika kepadatan mikroalga mencapai maksimum. Teknik ini merupakan sistem tertutup, memiliki volume terbatas, dan medium terbatas. Kerapatan sel alga terus meningkat sampai nutrisi habis, sedangkan komponen nutrisi dari medium kultur menurun seiring waktu. Setelah nutrisi digunakan oleh sel, kultur mati kecuali jika ditambahkan nutrisi kedalam media.

Teknik ini memiliki kelebihan yaitu memerlukan peralatan yang sederhana, fleksibel dan biaya rendah. Namun dalam skala besar, metode ini kurang efisien karena setelah dipanen, kolam harus dibersihkan dan dibutuhkan banyak medium (air tawar atau laut) serta inokulum mikroalga yang baru untuk kultivasi selanjutnya, selain itu harus dilakukan upaya pencegahan kontaminan. Kultur *batch* juga membutuhkan banyak tenaga kerja untuk memanen, membersihkan, mensterilkan, mengisi ulang medium dan nutrisi, dan menginokulasi mikroalga ke dalam wadah (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.6.2 Teknik Kultur Berkesinambungan (*Continue*)

Teknik kultur berkesinambungan (*continue*) prinsipnya adalah penambahan nutrisi diberikan secara berkelanjutan yang disertai dengan pemanenan kultur. Tujuan dari perlakuan ini agar kultur mencapai laju pertumbuhan maksimum, karena kebutuhan nutrisi selalu terpenuhi setiap waktu. Kelemahan dari teknik ini adalah pengelolaannya yang relatif mahal, sehingga sistem ini hanya

diterapkan dalam skala kecil. Namun, kualitas mikroalga lebih terjamin dibandingkan dengan teknik kultur *batch* (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.6.3 Teknik kultur semi-berkesinambungan (*semi-continue*)

Teknik *semi-continue* dilakukan dengan menambahkan media dan nutrisi ke dalam kultur dengan cara membuka penutup, dan setelah medium mengalir maka wadah kultur ditutup kembali. Biakan kultur dibiarkan selama 24 jam. Pemanenan dilakukan secara parsial dan berperiode. Kultur dibiarkan kembali dan kemudian diikuti dengan penambahan nutrisi dan medium (air tawar atau laut) hingga mencapai volume awal kultur. Kekurangan dari teknik ini adalah umur kultur tidak dapat diprediksi, rentan kontaminan, dan penurunan kualitas kultur apabila dibudidaya dalam jangka panjang. Kelebihannya yaitu karena biakan tidak dipanen sepenuhnya, metode semi kontinyu menghasilkan lebih banyak alga daripada metode *batch* (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.7 Teknik Pemanenan Mikroalga

Setelah dilakukan proses kultivasi, selanjutnya diperlukan pemilihan teknik pemanenan yang tepat untuk memperoleh biomassa mikroalga, disesuaikan dengan jenis dan kuantitas kultur (skala kecil atau besar). Teknik pemanenan mikrolaga diantaranya :

II.7.1 Flokulasi

Flokulasi merupakan teknik pemanenan dengan cara membuat agregat dari sel mikroalga dengan menambahkan flokulan, sehingga sel mikroalga mengendap dan lebih mudah untuk dikumpulkan. Senyawa

flokulan yang biasa digunakan adalah natrium hidroksida (NaOH). Metode ini cocok diterapkan pada kultur berskala besar karena praktis dan relatif murah dibandingkan dengan menggunakan membran filtrasi. Namun, metode ini tidak cocok digunakan untuk mikroalga jenis diatom karena mikroalga ini memiliki rongga pada tubuhnya yang akan menyebabkan senyawa flokulan masuk ke dalam tubuh diatom dan merusak komponen di dalam selnya.

II.7.2 Teknik Filtrasi

Teknik filtrasi dilakukan dengan cara mengalirkan atau menghisap kultur sel mikroalga ke membran filtrasi agar sel mikroalga dapat tertahan dan lebih mudah dikumpulkan. Sebelum dilakukan proses filtrasi, kultur sel mikroalga lebih baik didiamkan terlebih dahulu agar mengendap, sehingga proses filtrasi dapat dilakukan dengan volume kultur yang lebih sedikit. Teknik ini dapat diterapkan untuk kultivasi skala kecil dan besar, namun memerlukan biaya yang lebih besar untuk membran (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.7.3 Teknik Sentrifugasi

Teknik sentrifugasi merupakan proses pemanenan dengan memanfaatkan gaya sentrifuga dan gravitasi, sehingga sel mikroalga dapat terpisah dari mediumnya lalu mengendap (Barsanti dan Gualtieri, 2006).

II.8 Metode Ekstraksi

Secara umum metode ekstraksi dibagi dua macam yaitu ekstraksi tunggal dan ekstraksi bertingkat. Ekstraksi tunggal adalah melarutkan bahan yang akan diekstrak dengan satu jenis pelarut. Kelebihan dari

metode ini yaitu sederhana dan tidak memerlukan waktu yang lama, akan tetapi rendemen yang dihasilkan sangat sedikit. Adapun metode ekstraksi bertingkat adalah melarutkan bahan atau sampel dengan menggunakan dua atau lebih pelarut. Kelebihan dari metode ekstraksi bertingkat ini ialah dapat menghasilkan rendemen dalam jumlah yang besar dengan senyawa yang berbeda tingkat kepolarannya.

Ekstraksi dapat dilakukan dengan bermacam-macam metode tergantung dari tujuan ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan dan senyawa yang diinginkan. Metode ekstraksi yang paling sederhana adalah maserasi. Maserasi merupakan proses ekstraksi cara dingin yang dilakukan dengan cara merendam sampel dalam cairan penyari yang dilakukan pada suhu ruang. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan dan zat aktif di dalam sel dan di luar sel maka larutan didesak keluar. Peristiwa ini berulang-ulang kali terjadi sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan diluar dan didalam sel (Lukman, 2016). Keuntungan menggunakan metode ekstraksi maserasi antara lain mudah, tidak menggunakan suhu tinggi sehingga stabilitas bahan dapat tetap terjaga dan alat serta proses yang dibutuhkan cukup sederhana.

Pada proses perendaman dalam isolasi senyawa bahan alam akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel. Sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik, dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama

perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa yang akan diekstraksi. Metode maserasi dapat dilakukan modifikasi seperti berikut :

II.8.1 Modifikasi maserasi melingkar

Maserasi melingkar adalah penyarian yang dilakukan menggunakan cairan penyari yang selalu bergerak dan menyebar (berkesinambungan) sehingga kejenuhan cairan penyari merata. Keuntungan cara ini antara lain, cairan penyari akan didistribusikan secara seragam, sehingga memperkecil kepekatan setempat, waktu yang diperlukan lebih singkat.

II.8.2 Modifikasi maserasi digesti

Maserasi digesti adalah cara maserasi dengan menggunakan panas lemah, yaitu pada suhu 40-50°C. Cara ini hanya dapat dilakukan untuk bahan yang zat aktifnya tahan terhadap pemanasan. Dengan pemanasan akan diperoleh keuntungan dimana daya melarutkan senyawa oleh cairan penyari akan meningkat. Sehingga pemanasan tersebut mempunyai pengaruh yang sama dengan pengadukan, dan koefisien difusi berbanding lurus dengan suhu dan berbanding terbalik dengan kekentalan, hingga kenaikan suhu akan berpengaruh pada kecepatan difusi.

II.8.3 Modifikasi maserasi melingkar bertingkat

Maserasi melingkar bertingkat sama dengan maserasi melingkar tetapi pada maserasi melingkar bertingkat dilengkapi dengan beberapa

bejana penampungan sehingga tingkat polaritas cairan penyari akan berbeda-beda.

II.9 Jerawat

Jerawat atau *acne vulgaris* adalah kelainan berupa peradangan pada lapisan pilosebaceus (folikel rambut) yang disertai penyumbatan dan penimbunan bahan keratin. Biasanya jerawat timbul di daerah wajah, leher, dada dan punggung yang ditandai adanya komedo (*white-head* dan *black-head*), *papul* (benjolan merah), *pustule* (benjolan meradang berisi nanah), *nodul/kista* (benjolan keras di bawah kulit).

Apabila saluran pilosebacea tersumbat, maka minyak kulit (sebum) tidak dapat keluar dan mengumpul di dalam saluran, saluran menjadi membengkak sehingga terjadi komedo. Komedo merupakan permulaan terbentuknya jerawat, baik komedo terbuka (*blackhead*) atau komedo tertutup (*whitehead*). Empat mekanisme utama yang terlibat dalam pembentukan lesi jerawat yaitu adanya peningkatan produksi sebum, peluruhan keratinosit, pertumbuhan bakteri dan terjadinya inflamasi. Terdapat dua jenis lesi pada jerawat yakni lesi non inflamasi dan lesi inflamasi. Lesi non inflamasi terdiri dari komedo terbuka (*blackhead*) atau komedo tertutup (*whitehead*). Lesi inflamasi terdiri dari papula, pustula, nodula dan luka.

Mikroorganisme yang berperan dalam patogenesis jerawat salah satunya adalah *Propionibacterium acnes* dengan cara memproduksi metabolit yang dapat bereaksi dengan sebum sehingga meningkatkan proses inflamasi (Rahmi dkk., 2015).

II.10 Bakteri *Propionibacterium acnes*

Propionibacterium acnes merupakan bakteri Gram positif berbentuk batang dan merupakan flora normal kulit yang ikut berperan dalam pembentukan jerawat. *Propionibacterium acnes* mengeluarkan enzim hidrolitik yang menyebabkan kerusakan folikel polisebasea dan menghasilkan enzim lipase, hialuronidase, protease, lesitinase, dan neuroamidase yang memegang peranan penting pada proses peradangan. *Propionibacterium acnes* mengubah asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh yang menyebabkan sebum menjadi padat. Jika produksi sebum bertambah, *Propionibacterium acnes* juga akan bertambah banyak yang keluar dari kelenjar sebacea, karena *Propionibacterium acnes* merupakan pemakan lemak. Pengobatan jerawat dilakukan dengan cara memperbaiki abnormalitas folikel, menurunkan produksi sebum, menurunkan jumlah koloni *Propionibacterium acnes* atau hasil metabolismenya dan menurunkan inflamasi pada kulit. Populasi bakteri *Propionibacterium acnes* dapat diturunkan dengan memberikan suatu zat antibakteri (Rahmi dkk., 2015).

Klasifikasi *Propionibacterium acnes* :

- Kingdom : Bacteria
- Phylum : Actinobacteria
- Class : Actinobacteridae
- Ordo : Actinomycetales
- Familia : Propionibacteriaceae
- Genus : Propionibacterium
- Spesies : *Propionibacterium acnes* (Brooks, 2008)



Gambar II.5 Morfologi *Propionibacterium acnes*

Sumber : Bruggemann dkk. (2012)

II.11 Antibakteri

Infeksi mikroba terjadi bila mikroba mampu melewati *barrier* mukosa atau kulit dan menembus jaringan tubuh. Pada umumnya tubuh berhasil mengeliminasi mikroba tersebut dengan respon imun yang dimiliki. Tetapi ketika bakteri tersebut berkembangbiak dengan cepat maka akan terjadi infeksi mikroba yang disertai dengan inflamasi. Antibakteri yang digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri disebut antibiotika. Antibiotika adalah substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme hidup yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme lain (Team Medical Mini Notes, 2017).

II.11.1 Antibiotika Klindamisin

Klindamisin memiliki efek bakteriostatik atau bakterisidal bergantung pada konsentrasi obat, jenis organisme, dan lokasi infeksi. Obat ini pada umumnya aktif terhadap *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyrogenes*, *S. anaerobic*, *S. viridans*, dan *Actinomyces isrealii*. Klindamisin juga aktif terhadap *Bacteroides fragilis* dan kuman anaerob lainnya.

Klindamisin bekerja dengan menghambat sintesis protein dengan cara berikatan dengan ribosom 50s. Selain itu, klindamisin mampu menginhibisi bakteri *Propionibacterium acnes* dan memberikan aktivitas komedolitik dan antiinflamasi. Ekskresi utama klindamisin adalah melalui hati, empedu, dan urin (Jawetz, 2013).

II.12 Metode Uji Antibakteri

Potensi senyawa antibakteri terhadap bakteri penyebab penyakit dapat ditentukan dengan 2 metode pokok yaitu difusi agar dan dilusi (NCCLS, 2009).

II.12.1 Metode Difusi Agar

1. Metode Perforasi

Dilakukan dengan cara melubangi media agar yang telah memadat. Media cair pada suhu 45-54°C dicampurkan dengan suspensi mikroba pada cawan petri dan dibiarkan memadat, kemudian dibuat lubang dengan perforator yang memiliki diameter 6-8 mm, zat uji dimasukkan ke dalam lubang lalu di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diameter hambatan diukur dengan jangka sorong.

2. Metode Silinder

Dilakukan dengan menggunakan silinder gelas steril dengan diameter 4,4 mm. Silinder gelas steril diletakkan di atas permukaan media agar yang telah memadat yang sebelumnya telah diinokulasi mikroba uji. Kemudian zat uji dimasukkan ke dalam silinder, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diameter hambatan diukur disekitar silinder.

3. Metode cakram kertas

Dilakukan dengan mencampurkan zat uji dengan cakram kertas, lalu cakram kertas diletakkan diatas media agar yang telah diinokulasi mikroba uji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diameter hambat diukur disekitar cakram.

II.12.2 Metode dilusi

Metode ini biasanya digunakan untuk menentukan nilai KHM dan KBM. Metode dilusi terdiri dari :

1. Metode Pengenceran Tabung

Merupakan metode yang dilakukan dengan cara mensuspensikan zat uji dalam media yang cocok menggunakan tabung steril. Ke dalam tabung dimasukkan pembenihan cair, dalam tabung pertama ditambahkan suspensi zat uji, kemudian dikocok dan dipindahkan sebanyak 1 mL ke dalam tabung kedua dan seterusnya sampai tabung terakhir. Ke dalam tiap tabung ditambahkan 0,1 mL suspensi mikroba uji yang telah diinkubasi sebelumnya. Satu tabung untuk kontrol pembenihan dan satu tabung lain untuk mikroba uji, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

2. Metode Pengenceran Agar

Merupakan metode dimana zat yang akan diuji dicampurkan dengan agar steril yang masih mencair pada suhu 45-50°C sampai homogen dalam cawan petri steril dan dibiarkan memadat. Mikroba dioleskan pada permukaan agar dengan ose secara merata. Konsentrasi hambat minimum ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada permukaan agar konsentrasi tertentu hasil pengenceran.

3. Mikrodilusi

Merupakan metode dengan menggunakan sejumlah volume kecil *broth* pada mikropate yang memiliki *well* berbentuk bulat atau kerucut. Setiap *well* dapat berisi sebanyak 0,1 mL *broth*. Pengujian dilakukan dengan menyiapkan larutan uji yang telah dilakukan pengenceran dan mikroba uji. Pengenceran larutan uji dan suspensi mikroba dicampur dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

II.13 Sediaan Emulgel

Emulgel terdiri dari dua bagian :

1. Emulsi
2. Gel

Emulsi :

Emulsi merupakan sistem bifasik dimana satu cairan yang tidak larut didispersikan ke dalam cairan lainnya. Hal ini menyebabkan sistem ini menjadi tidak stabil sehingga perlu distabilkan oleh zat pengemulsi. Emulsi dapat berupa w/o (*water in oil*) atau o/w (*oil in water*). Sediaan emulsi topikal dapat dengan mudah dibersihkan dari permukaan kulit dan memiliki kemampuan penetrasi yang baik (Dev dkk., 2015).

Gel :

Istilah “gel” menggambarkan keadaan fisik dengan sifat antara padatan dan cairan. Gel merupakan sistem semi padat terdiri dari suspensi yang dibuat dari partikel anorganik yang kecil atau molekul organik yang besar, terpenetrasi oleh suatu cairan (Departemen Kesehatan RI, 1995). Gel terdiri dari polimer yang mengembang didalam cairan atau didalam strukturnya. Rigiditas gel ditentukan oleh

jumlah cairan yang terperangkap (Dev dkk., 2015). Formulasi gel umumnya memberikan pelepasan obat yang lebih cepat dibandingkan dengan salep dan krim. Gel memiliki keterbatasan yaitu pada obat yang bersifat hidrofobik. Sehingga untuk mengatasi keterbatasan ini dibuat sediaan emulgel (Nurdianti dkk., 2018).

Emulgel :

Emulgel merupakan kombinasi antara emulsi dan gel. Sediaan emulgel adalah emulsi, baik itu tipe minyak dalam air (M/A) maupun air dalam minyak (A/M) yang dibuat menjadi sediaan gel dengan mencampurkan emulsi kedalam basis gel. Emulgel membantu menyatukan bahan aktif hidrofobik dalam fase minyak kemudian globul minyak terdispersi dalam fase air (emulsi M/A) yang selanjutnya emulsi ini dapat dicampurkan dalam basis gel (Yani dkk., 2016). Emulgel memiliki kelebihan untuk penggunaan dermatologi yaitu stabil secara termodinamik, transparan, isotropik, kemudahan dalam preparasi serta tingkat absorpsi dan difusi yang tinggi. (Nurdianti dkk., 2018).

Bahan pembentuk gel yang digunakan adalah *hidroxy propil metil cellulosa* (HPMC). HPMC dapat membentuk gel yang jernih dan bersifat netral serta memiliki viskositas yang stabil pada penyimpanan jangka panjang. Untuk emulgel, pemilihan emulgator merupakan faktor yang penting untuk diperhatikan karena mutu dan kestabilan suatu emulgel banyak dipengaruhi oleh emulgator. Emulgator yang digunakan adalah Tween 80 dan Span 80, keduanya merupakan emulgator non ionik. Penggunaan emulgator non ionik

karena aktifitasnya relatif tidak tergantung suhu dan tidak mengiritasi (Aisyah dkk., 2017).

II.14 Uji Bioautografi

Bioautografi, berasal dari kata bio yang berarti makhluk hidup dan autografi yang berarti melakukan aktivitas sendiri. Bioautografi merupakan suatu metode pendeteksian untuk menemukan senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi. Uji bioautografi dilakukan dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Ciri khas dari prosedur bioautografi berdasarkan atas teknik difusi agar dengan cara senyawa antimikroba dipindahkan dari lapisan KLT ke medium agar yang telah diinokulasikan bakteri uji. Zat dalam kromatogram akan berdifusi ke media agar, lempeng diangkat dan diinkubasi. Dari hasil inkubasi pada suhu dan waktu tertentu akan terlihat zona hambat di sekeliling spot dari KLT yang telah ditempelkan pada media agar. Zona hambat terbentuk karena adanya aktivitas senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan yang diuji terhadap pertumbuhan mikroorganisme uji, bercak yang menyebabkan hambatan kemudian dicocokkan dengan hasil deteksi kromatogramnya dengan metode deteksi KLT yang sesuai. Dengan demikian dapat diperkirakan senyawa yang bertanggung jawab aktif sebagai antimikroba (Datu, 2017).

Ada tiga pendekatan yang berbeda pada bioautografi untuk menentukan aktivitas antimikroba diantaranya menggunakan KLT - difusi agar atau bioautografi kontak, bioautografi langsung dan pencilupan atau bioautografi agar *overlay* (Neha dkk., 2013). KLT terkait dengan uji biologis atau untuk deteksi senyawa kimia yang

menunjukkan sifat biologis umumnya disebut KLT-Bioautografi. KLT merupakan metode cocok untuk mengetahui senyawa dalam sampel dengan deteksi bioautografi karena lapisan terbuka yang memungkinkan penguapan pelarut, dan memisahkan banyak sampel secara paralel (Choma dan Jesionek, 2015).

II.14.1 Bioautografi Langsung

KLT-Bioautografi Langsung adalah salah satu dari tiga metode KLT-Bioautografi di mana pemisahan, pengujian dan visualisasi dilakukan langsung pada lapisan KLT. Prinsip kerja dari metode ini adalah suspensi mikroorganisme uji dalam medium cair disemprotkan pada permukaan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang telah dihilangkan sisa-sisa eluen yang menempel pada lempeng kromatografi. Setelah itu dilakukan inkubasi pada suhu dan waktu tertentu.

Mikroorganisme tumbuh secara langsung di permukaan KLT kecuali spot pada antimikroba. Visualisasi biasanya dilakukan dengan menyemprotkan pada KLT dengan garam tetrazolium seperti MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Dehidrogenase dari mikroorganisme hidup mengubah garam tetrazolium menjadi formazan ungu. Spot berwarna krem yang muncul dengan latar belakang ungu, yang disebut zona inhibisi, menunjukkan adanya zat antimikroba.

II.14.2 Bioautografi kontak

Metode bioautografi kontak didasarkan atas difusi dari senyawa antimikroba yang telah dipisahkan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi tersebut

ditempatkan diatas permukaan medium agar yang telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Setelah 15-30 menit, lempeng kromatografi tersebut dipindahkan dan diangkat dari permukaan medium. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari lempeng kromatografi ke dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Hal ini ditandai dengan adanya bercak yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji, tampak pada permukaan dan membentuk zona yang jernih pada media agar.

II.14.3 Bioautografi Pencelupan atau agar *overlay*

Pada prakteknya metode ini dilakukan dengan cara lempeng kromatografi yang telah dielusi, diletakkan dalam cawan petri, sehingga permukaannya tertutup oleh medium agar yang telah disuspensikan mikroba uji. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.