

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN PENGUJIAN SENYAWA BIOAKTIF
DARI *Oscillatoria* sp. SEBAGAI ANTIBIOFILM BAKTERI *Escherichia coli*
RESISTEN KLORAMFENIKOL**

(Skripsi)

Oleh

TRI MARITAL



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

ABSTRACT

ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND BIOACTIVE COMPOUND TEST FROM *Oscillatoria* sp. AS AN ANTIBIOFILM OF *Escherichia coli* CHLORAMPHENICOL RESISTANT

BY

TRI MARITAL

The study of isolation, characterization, and bioactive compound test from microalgae *Oscillatoria* sp. as an antibiofilm of *Escherichia coli* chloramphenicol resistant has been carried out. Isolation and purification of compound T4M1 processed through some chromatography step. Purification of compound T4M1 used crystallization given compound T4M1 about 3.4 mg (0.002%). Compound T4M1 were white amorf crystal. Rf value of compound T4M1 used three different eluents system at silica plate gave results as follow, i.e.: Etil acetic : Hexane (8:2), Dichloromethane : Etil acetic (10:1), and Hexane 100% were 0.84; 0.6; and 0 respectively. Characterization by using FTIR showed presence of hidroxy group (O-H : stretching 3450 cm^{-1}), methyl aliphatic group (C-H : 2920 cm^{-1}), methyl symmetric group (C-H : 2850 cm^{-1}), carbonyl group (C=O : 1707 cm^{-1}), alkenes aliphatic (C=C : 1635 cm^{-1}), and amines group (C-N : 1382 cm^{-1}). Antibiofilm test at $100\text{ }\mu\text{g}$ dose gave result inhibition percentage 74% and there was no inhibition zone on antibacterial test at $100\text{ }\mu\text{g}$ dose. Based on FTIR data, compound T4M1 known was an aliphatic compound substituted by hidroxy, carbonyl, alkenes, amines groups and has bioactivity as an antibiofilm at $100\text{ }\mu\text{g}$ without kill the bacterial itself.

Kata Kunci : Antibiofilm ; *Oscillatoria* sp. ; Microalgae ; *Escherichia coli*.

ABSTRAK

ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN PENGUJIAN SENYAWA BIOAKTIF DARI *Oscillatoria* sp. SEBAGAI ANTIBIOFILM BAKTERI *Escherichia coli* RESISTEN KLORAMFENIKOL

Oleh

TRI MARITAL

Pada penelitian ini telah dilakukan studi isolasi, karakterisasi, dan pengujian senyawa bioaktif dari mikroalga jenis *Oscillatoria* sp. sebagai antibiofilm terhadap bakteri *Escherichia coli* yang resisten kloramfenikol. Proses isolasi dan pemurnian senyawa target melalui beberapa tahapan kromatografi. Hasil pemurnian menggunakan metode kristalisasi didapatkan senyawa murni T4M1 sebanyak 3,4 mg (0,002%). Senyawa T4M1 berupa kristal amorf berwarna putih. Nilai Rf pada KLT plat silika menggunakan tiga sistem eluen yang berbeda yaitu Etil asetat : Heksana (8:2), Diklorometana : Etil asetat (10:1), dan Heksana 100% berturut-turut adalah 0,84; 0,6; dan 0. Karakterisasi menggunakan FTIR menunjukkan adanya gugus hidroksi (O-H : vibrasi uluran pada 3450 cm^{-1}), gugus metil alifatik (C-H : 2920 cm^{-1}), metilen simetris (C-H : 2850 cm^{-1}), karbonil (C=O : 1707 cm^{-1}), alkena alifatik (1635 cm^{-1}), dan gugus amina (C-N : 1382 cm^{-1}). Hasil uji antibiofilm pada dosis $100\text{ }\mu\text{g}$ menunjukkan penghambatan sebesar 74% sedangkan tidak terdapat zona hambat pada uji antibakteri pada dosis $100\text{ }\mu\text{g}$. Berdasarkan data FTIR yang diperoleh diketahui senyawa T4M1 merupakan senyawa alifatik dengan substituen hidroksi, karbonil, alkena dan amina serta memiliki kemampuan sebagai antibiofilm pada dosis $100\text{ }\mu\text{g}$ tanpa mematikan bakteri itu sendiri.

Kata Kunci : Antibiofilm ; *Oscillatoria* sp. ; mikroalga ; *Escherichia coli*.

**ISOLASI, KARAKTERISASI, DAN PENGUJIAN SENYAWA BIOAKTIF
DARI *Oscillatoria* sp. SEBAGAI ANTIBIOFILM BAKTERI *Escherichia coli*
RESISTEN KLORAMFENIKOL**

Oleh

TRI MARITAL

Skripsi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2016**

Judul Skripsi

**: ISOLASI, KARAKTERISASI DAN PENGUJIAN
SENYAWA BIOAKTIF DARI *Oscillatoria* sp.
SEBAGAI ANTIBIOFILM BAKTERI *Escherichia*
coli RESISTEN KLORAMFENIKOL**

Nama Mahasiswa

: Tri Marital

Nomor Pokok Mahasiswa : 1217011065

Jurusan

: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

**Andi Setiawan, Ph.D.
NIP 195809221988111001**

2. Ketua Jurusan Kimia

**Dr. Eng. Surtpto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001**

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Andi Setiawan, Ph.D.



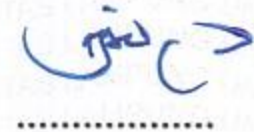
.....

Penguji I : Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono.

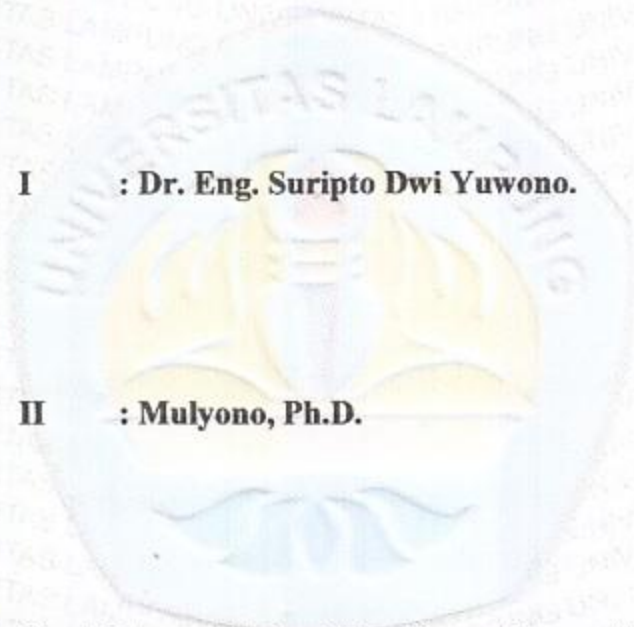


.....

Penguji II : Mulyono, Ph.D.

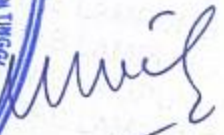


.....



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam




Prof. Dr. Warsito, DEA
NIP 19710212 199512 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 15 Desember 2016

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir dari pasangan M. Talip Azwar dan Nunila Sari pada 8 Maret 1995 di Kotabumi. Penulis merupakan anak ke-3 dari 4 bersaudara yakni Yultari Devensi, Yanital Kasfer, dan Aprital. Riwayat pendidikan penulis dimulai dari SDN Peraduan Waras, Kecamatan Abung Timur (2000-2006). Penulis selanjutnya meneruskan pendidikan di SMPN 4 Kotabumi (2006-2009) lalu di SMAN 3 Kotabumi (2009-2012) serta diterima sebagai mahasiswa di Jurusan Kimia FMIPA Unila pada tahun 2012 melalui SNMPTN jalur undangan.

Selama menjadi mahasiswa, penulis ikut dalam organisasi kemahasiswaan tingkat fakultas yakni sebagai Kader Muda Himaki (2012-2013), anggota Bidang Sosial dan Masyarakat Himaki (2013-2014), dan ketua Bidang Sosial dan Masyarakat Himaki (2014-2015). Penulis juga pernah menjadi asisten praktikum sains dasar untuk jurusan Biologi (FMIPA), praktikum Kimia Organik II untuk jurusan kimia (FMIPA), serta praktikum kimia dasar untuk jurusan Agroteknologi (Fakultas Pertanian) dan jurusan Kimia (FMIPA).

Pada bulan Agustus – September 2015 penulis pernah mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) Kebangsaan di Dusun II kampung Bunsur, Kecamatan Sei Apit, Kabupaten Siak, Provinsi Riau bersama dengan beberapa mahasiswa dari UR dan UIN SUSKA (Riau), USU dan UNIMED (Sumatera Utara), UNSRI (Sumatera selatan), UNIB (Bengkulu), UNTAN (Kalimantan Barat), dan UNAIR (Surabaya).

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

KUPERSEMBAHKAN KARYA KECIL INI KEPADA:

Kedua orang tuaku M. Talip Azwar dan Nunila sari Penulis mengucapkan banyak terimakasih atas segala hal yang telah diberikan hingga sampai saat ini, semoga Allah SWT selalu memberikan kesehatan dan perlindungan kepada bapak dan emak.

Suadara saudari penulis, Yultari Devensi (uni), Yanital Kasfer (aden), Aprital (adek) yang memberikan banyak pelajaran hidup kepada penulis, semoga kita semua diberikan jalan menuju kehidupan yang lebih baik.

Seluruh teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu per satu, semoga kita masih diberi kesempatan oleh Allah SWT untuk berjumpa dilain waktu.

Pihak-pihak terkait yang selama ini mendukung baik suka ataupun duka, Allah adalah sebaik-baiknya pembalas kebaikan

Seseorang yang akan melengkapi hidupku kelak, semoga kita selalu dilimpahi rahmat oleh Allah SWT.

MOTTO

"Hanya karena saya membutuhkan waktu lebih lama dibanding dengan yang lain, bukan berarti saya **GAGAL**. Tidak peduli harus tertunda berkali-kali, harus jatuh 100 kali, atau gagal 1000 kali pun, saya akan terus berusaha 1000000 kali lebih keras. Karena tugas saya bukanlah berhasil, namun **BERUSAHA** sampai berhasil!!!"

(Tri marital)

"The Only we need is cool head and hot heart."

(Anonim)

"Kerja keras dan kerja cerdas, pasangan setia yang akan melahirkan hasil luar biasa."

(Siti Aisah)

"Tidak pernah benar-benar yakin, apa mata yang semakin berkantung, tubuh yang semakin kehilangan ototnya, rambut yang tumbuh makin tak terkoordinir, ujung syaraf yang semakin akrab dengan rasa nyeri, ratusan penat yang jejal otak, dan ribuan kecewa sesakkan jiwa, semua akan terbayar? Kami tak pernah tahu, saya tak pernah benar-benar yakin. Yang saya yakini bahwa saya belum boleh menyerah berusaha. Meski satu per satu sahabat pergi dan takkan pernah kembali."

(Tri marital)

SANWANCANA

Assalamualaikum Wr. Wb.

Tabik puun...

Alhamdulillahirobbilalamiin, puji syukur kepada Allah SWT, karena berkat rahmat nikmat-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. *Shalawat* serta salam mari selalu kita sampaikan kepada nabi besar Muhammad SAW yang kita nantikan syafa'atnya kelak di *yaumul akhir*, aamiin.

Sebagai syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains maka penulis telah selesai membuat skripsi dengan judul “**Isolasi, Karakterisasi, dan Pengujian Senyawa Bioaktif dari *Oscillatoria* sp. Sebagai Antibiofilm Bakteri *Escherichia coli* Resisten Kloramfenikol**” di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam.

Penulis dengan sepenuh hati mengucapkan banyak terimakasih dan penghargaan kepada :

1. Kedua orang tua tercinta, M. Talip Azwar dan Nunila Sari yang telah merawat, membesarkan, dan mendidik penulis dengan, kasih sayang, kesabaran, dan penuh pengorbanan. Keduanya adalah alasan penulis hidup di dunia, karya kecil ini penulis persembahkan kepada bapak dan mamak sebagai bukti sepenggal cinta dari penulis.

2. Bapak Andi Setiawan, Ph.D selaku pembimbing penelitian yang dengan sabar membimbing, mendidik, dan menolong penulis hingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, MT. selaku penguji I dan sekaligus ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila yang telah banyak memberikan kritik dan masukan hingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini.
4. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku penguji II dan dosen penulis atas nasehat dan ilmu yang bermanfaat kepada penulis.
5. Bapak Prof. Dr. Yandri AS., M.S. sebagai pembimbing akademik penulis yang dengan penuh kesabaran dan kasih sayang memberikan nasehat, masukan, dan bantuan selama penulis menempuh pendidikan di bangku perkuliahan.
6. Bapak Prof. Dr. Warsito, DEA. Selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universtas Lampung.
7. Saudara dan saudari penulis, Yultari Devensi (Uni), Yanital Kasfer (Aden), dan Aprital (Adek) penulis mengucapkan jutaan terimakasih atas semangat, do'a, bantuan, dan seluruh pembelajaran hidup yang penulis terima selama ini.
8. Keponakan-keponakan penulis, Yoga Prasetyo dan Kayla Talita Putri yang ikut mewarnai kehidupan penulis selama menjalani perkuliahan.
9. M. Kizlar Agha, Bagus Kunta Adji, dan M. Deni Mareza sebagai sahabat karib penulis sejak duduk dibangku SMA. Terimakasih sebesar-besarnya telah menjadi sahabat terbaik penulis selama 7 tahun dan terus berlanjut.

10. Opung Edi, Bro Arif, Bro Rifki, dan Sofian Ncop yang selalu penulis repotkan namun tetap menemani dan membantu dalam susah maupun senang penulis selama perkuliahan sampai selesainya skripsi ini, semoga Allah SWT senantiasa membalas kebaikan kalian.
11. Ningrum, Feby, Imani Duta alis, Ana Duta shampo, Reno SSO, Sukamtil, Erlita Padang, Dela, Riandra, dan Fifi yang senantiasa memberi semangat dan dukungan pada penulis dalam menyelesaikan skripsi.
12. Partner penelitian penulis Intan Kpop dan Dewi AF atas segala bantuan selama penulis melakukan penelitian.
13. Keluarga Kimia 2012 : Adi DAN, Bang Adam, Bro Adit, Kim Arya, Anwar Ketum, Ferdinan Tak nampak, Kokom Radius Duta 3gp, Mami Rio Ben, Oppa Derry, Rizal Bunny, Handri, Debi Mojang, Umi Ais, Yungsi Atlet, Mak Ruway, Abang Debo, Febita, Dek Susi, Ukh Jeje, Nila Mak tiri, Wiwin, Teteh Ulfatun, Yepi Aerodinamis, Ajeng Kimo, Diani, Meta, Tiara, Indri Muley, Rulli, Welda, Fenti Kpop, Syatira Kpop, Dwi Ledom, Eka, Atma, Dona Khansa, Tazkiya, Ismi Sekum, Puput Kpop, Ma'ul, Murni Racun, Kanjeng Ratu Imah, dan Iin yang telah menjadi keluarga penulis sejak masuk kuliah pertama kali, semoga KITA SELAMANYA.
14. Pimpinan HIMAKI periode 2014/2015, Sosmas Himaki 2014/2015, terimakasih telah mengajarkan banyak hal tentang bagaimana belajar berfikir, bersikap, bertindak, serta kehangatan keluarga.
15. Seluruh personil UPT LT SIT, kak Miftah, kak Wagiran, kak Purna, mbak Yunia, dan Paman atas nasehat serta dukungan terhadap penulis selama melakukan penelitian di UPT LT SIT.

16. Adik-adik Andi's *research* : Bara, Gita, Celly, Riska, Citra, Dira, Fendi, Erin, Rahma, dan Berliana. Selamat berjuang, terus semangat, jangan pantang menyerah, *Sweat never betray*.
17. Keluarga KKN Kebangsaan 2015 Dusun II Kampung Bunsur, Kecamatan Sei Apit, Kabupaten Siak, Provinsi Riau. Anggota posko II, Muhammad Amin Lubis (UIN SUSKA), Muammar Prawira Siregar (UNIMED), Yandi Faldino (UNTAN), Winda Mega Mustika (UIN SUSKA), Ecky Nurul Fajriah (UNIB), Rita Shanty Alfian (UR), Ria Fiesca Lestari (UNSRI), Chyntia Septiani Sinaga (USU), dan Raissa Virgy Rianda (UNAIR). Terimakasih telah banyak memberikan pelajaran hidup kepada penulis, pengalaman tak terlupakan dapat bersama selama 30 hari dengan kalian.
18. Seluruh keluarga kimia angkatan 2010, 2011, 2013, dan 2014.

Penulis sadar bahwa skripsi ini masih jauh dari baik, namun penulis tetap berharap bahwa skripsi ini dapat membawa manfaat dikemudian hari.

Bandarlampung, Desember 2016
Penulis

Tri Marital

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
I. PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang	1
B. Tujuan Penelitian	3
C. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Infeksi Bakteri	4
B. <i>Eschericia coli</i>	4
C. Biofilm Bakteri	6
D. Kontrol Biofilm.....	9
E. Mikroalga	10
F. <i>Oscillatoria</i> sp.....	12
G. Metode Pemanenan Mikroalga	14
H. Senyawa Bioaktif Mikroalga.....	15
I. Isolasi Senyawa Bioaktif.....	17
1. Ekstraksi	17
a. Maserasi Dengan Sonikasi	17
b. Partisi (ekstraksi cair-cair)	18
2. Kromatografi	19
a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	20
b. Kromatografi Kolom.....	22
J. Spektroskopi Fourier Transform Infra Red.....	22
III. METODE PENELITIAN	27
A. Waktu dan Tempat	27
B. Alat dan Bahan	27
C. Prosedur Penelitian.....	28
1. Kultivasi dan Pemanenan <i>Oscillatoria</i> sp.....	28
2. Ekstraksi	29
3. Uji Antibiofilm.....	30
4. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Bioaktif.....	31
5. Karakterisasi Gugus Fungsi	32

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	33
A. Kultivasi dan Pemanenan <i>Oscillatoria</i> sp.	33
B. Ekstraksi	34
C. Pemurnian Senyawa Bioaktif	39
D. Karakterisasi Gugus Fungsi	49
E. Uji Antibiofilm	56
V. SIMPULAN DAN SARAN	59
A. Simpulan.....	59
B. Saran.....	60
DAFTAR PUSTAKA	61
LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Penggolongan kromatografi berdasarkan fasa diam dan fasa gerak	19
2. Frekuensi gugus hidroksi dan senyawa alkohol.....	25
3. Data hasil uji antibiofilm fase air dan fase organik.....	38
4. Hasil uji bioaktivitas fraksi T2M1, T2M2, T2M3, T2M4, T2M5, T2M6, dan T2M7.....	42
5. Data hasil uji fraksi T3M3, T3M4, dan T3M6.....	46
6. Perbandingan hasil FTIR senyawa T4M1 dengan literatur.....	55
7. Data hasil uji antibiofilm senyawa T4M1	56
8. Data zona hambat senyawa T4M1	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sel <i>Eschericia coli</i>	5
2. Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	7
3. Beberapa spesies mikroalga dari kelas yang berbeda. (a) <i>Amphiprora</i> , (b) <i>Tetraselmis chuui</i> , (c) <i>Nannochloropsis occulata</i> , (d) <i>Pinnularia</i> , (e) <i>Oscillatoria</i> sp.	12
4. Penampakan fisik <i>Oscillatoria</i> sp.	13
5. Contoh senyawa bioaktif mikroalga (1) Astaksantin (2) 13-hydroxy-9Z-11E-octadeca-dienoic (3) Klorofil a.	16
6. Morfologi <i>Oscillatoria</i> sp.	34
7. Hasil KLT ekstrak kasar dengan plat silika, eluen DCM 100%.	35
8. Hasil KLT fase organik dan fase air	37
9. Hasil uji antibiofilm fase air dan fase organik	39
10. Hasil KLT ekstrak T2 pada plat silika visualisasi serum sulfat.....	40
11. Hasil KLT fraksi T2M1, T2M2, T2M3, T2M4, T2M5, T2M6, dan T2M7	41
12. Uji antibiofilm fraksi T2M1, T2M2, T2M3, T2M4, T2M5, T2M6, dan T2M7.	42
13. Hasil KLT fraksi aktif T2M2 (2), T2M3 (3), T2M4 (4), T2M5 (5), dan T2M6 (6).....	43
14. Hasil KLT fraksi aktif hasil penggabungan	44
15. Hasil KLT fraksi T3M3 menggunakan eluen DCM : Heksana (1:1).....	45

16. Hasil KLT fraksi aktif	45
17. Hasil uji antibiofilm fraksi T3M3, T3M4, dan T3M6	46
18. Hasil KLT fraksi T3M3 dengan plat C ₁₈ eluen metanol 100%	47
19. Hasil KLT fraksi T3M3 hasil kolom, dengan plat C18, eluen MeOH 100% (visualisasi serium sulfat).....	47
20. Penampakan visual senyawa T4M1	48
21. Hasil KLT senyawa T4M1 pada plat silika dengan variasi pelarut dan visualisasi serium sulfat.....	49
22. Spektrum FT-IR T4M1	50
23. Struktur senyawa antibiofilm.	55
24. Hasil uji antibiofilm senyawa T4M1.....	56
25. Hasil uji antibakteri senyawa T4M1	57

I. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Badan kesehatan PBB melaporkan bahwa penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan penyebab utama kematian di seluruh dunia dan angka kematian yang disebabkan oleh bakteri mencapai 8,6 juta jiwa (WHO, 2014). Salah satu faktor yang menyebabkan sulitnya mengatasi masalah infeksi bakteri adalah akibat perilaku bakteri yang cenderung membentuk selubung pelindung yang disebut biofilm. Biofilm terbentuk ketika bakteri *planktonic* menempel pada suatu permukaan dan memulai pembentukan koloni mikro yang membentuk kumpulan bakteri yang terbungkus dalam sebuah matriks ekstraselular yang menyediakan perlindungan tingkat tinggi (Angst *et al.*, 1923). Biofilm berperan hingga 60% dalam proses infeksi pada manusia dan diketahui sangat sulit untuk diatasi dengan menggunakan agen antimikroba. Pengujian secara *in vitro* menunjukkan bahwa terjadi peningkatan resistensi yang sangat tinggi pada sel biofilm.

Diperkirakan bahwa biofilm memiliki keterkaitan terhadap 65% infeksi *nosocomial* yang terjadi di Amerika Serikat, selain itu industri kimia di seluruh dunia menghabiskan setidaknya sekitar \$7 milyar guna menanggulangi masalah biofilm ini (Licking, 1999).

Penelitian yang dilakukan guna mendapatkan senyawa antibiofilm, diantaranya madu Manuka diketahui mampu menghambat pertumbuhan biofilm campuran antara bakteri pereduksi sulfat (*Desulfobrio indonensis*) dan bakteri *E. coli* (Alkhalil *et al.*, 2014). Menurut Bazargani *et al.*, (2016) minyak esensial dan ekstrak metanol dari tanaman ketumbar, diketahui memiliki bioaktivitas penghambat pembentukan biofilm *E. coli* dan *S. aureus*.

Dewasa ini mikroalga mendapatkan perhatian lebih sebagai sumber produk bernilai tinggi. Pemanfaatan senyawa bioaktif dari mikroalga sudah cukup dikenal luas, seperti fikobiliprotein sebagai bahan pewarna, antiinflamasi, antioksidan, serta pelindung ujung syaraf (Romay *et al.*, 2003), karotenoid sebagai antioksidan (Tapiero *et al.*, 2004), karbohidrat dalam bentuk pati, glukosa, gula, dan bentuk polisakarida lain banyak dimanfaatkan sebagai sumber pangan manusia dan hewan (Becker, 2004), serta protein sebagai bahan makanan sehat di Jepang, Taiwan, dan Mexico (Sánchez *et al.*, 2003; Borowitzka, 2013).

Sejauh ini sudah banyak pemanfaatan senyawa bioaktif yang berasal dari mikroalga, namun untuk bidang antibiofilm belum pernah dilakukan penelitian lebih lanjut, berdasarkan uraian diatas maka dalam penelitian ini dilakukan upaya mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji senyawa bioaktif dari mikroalga *Oscillatoria sp.* terhadap biofilm dari bakteri *Escherichia coli*.

B. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi, mengkarakterisasi, dan menguji senyawa bioaktif dari mikroalga *Oscillatoria* sp. terhadap biofilm dari bakteri *Escherichia coli* resisten kloramfenikol.

C. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah mengetahui potensi senyawa bioaktif dari mikroalga *Oscillatoria* sp. yang dapat dikembangkan sebagai agen antibiofilm.

II. TINJAUAN PUSTAKA

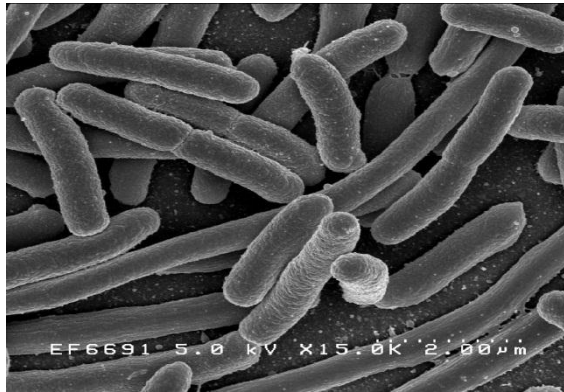
A. Infeksi Bakteri

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri menarik banyak perhatian, salah satunya adalah infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial adalah suatu infeksi yang diperoleh atau dialami oleh pasien selama dia dirawat di rumah sakit dan menunjukkan gejala infeksi baru setelah 72 jam pasien berada di rumah sakit serta infeksi itu tidak ditemukan atau diderita pada saat pasien masuk ke rumah sakit (Ducel, 2002). Infeksi nosokomial banyak terjadi di seluruh dunia dengan kejadian terbanyak di negara miskin dan negara berkembang karena penyakit-penyakit infeksi masih menjadi masalah utama. Suatu penelitian yang dilakukan oleh WHO menunjukkan bahwa sekitar 8,7 % dari 55 rumah sakit dari 14 negara yang berasal dari Eropa, Timur Tengah, Asia Tenggara dan Pasifik menunjukkan adanya kasus infeksi nosokomial, sedangkan di Asia Tenggara sebanyak 10,0% (Ducel, 2002) .

B. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,4-0,7 μm dan bersifat anaerob fakultatif. *E. coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan

tepi yang nyata (Smith-Keary, 1988). Penampakan Sel *Escherichia coli* ditunjukkan oleh Gambar 1.



Gambar 1. Sel *Escherichia coli* (Rocky Mountain Laboratories).

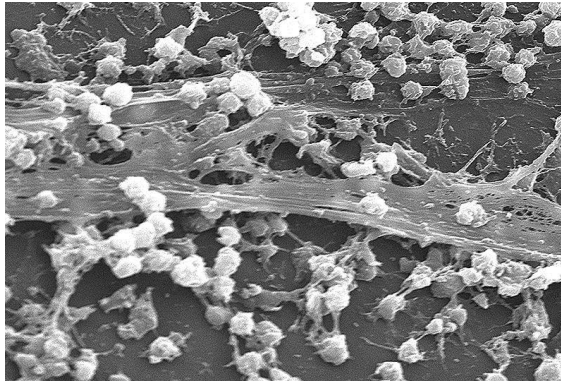
Escherichia coli merupakan golongan bakteri *mesofilik* yaitu bakteri yang suhu pertumbuhan optimumnya 15-45°C dan dapat hidup pada pH 5,5 – 8. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hawa *et al.* (2011), *E. coli* memiliki suhu maksimum pertumbuhan 40-45°C, di atas suhu tersebut bakteri akan mengalami *inaktivasi*.

Bakteri *Escherichia coli* secara normal berada di saluran pencernaan bagian bawah dan akan dapat berubah menjadi patogen jika perkembangan kuman di dalam tubuh yang melebihi batas normal, akibat perubahan makanan secara mendadak serta perubahan lingkungan dari panas ke hujan atau sebaliknya. Dampak yang muncul pada penderita ialah : menurunnya berat badan dan kondisi tubuh, pertumbuhan terhambat, dan jika tidak segera ditangani dapat menimbulkan kematian.

C. Biofilm Bakteri

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat di suatu permukaan dan diselubungi oleh pelekat karbohidrat yang dikeluarkan oleh bakteri tersebut. Pelekatan suatu sel pada suatu permukaan adalah hasil dari sinyal untuk mengekspresikan gen-gen pembentuk biofilm. Gen-gen ini mengkodekan protein-protein untuk melakukan sintesis sinyal komunikasi antarsel dan memulai pembentukan polisakarida. Pada bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa*, molekul sinyal yang utama adalah komponen yang disebut *homoserin lakton* yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel *P. aeruginosa* yang berdekatan (melalui mekanisme *quorum sensing*) dan membentuk biofilm (Madigan and Martinko, 2006).

Biofilm terbentuk karena mikroorganisme cenderung menciptakan lingkungan mikro dan relung (*niche*) mereka sendiri. Biofilm memerangkap nutrisi untuk pertumbuhan populasi mikroorganisme dan membantu mencegah lepasnya sel-sel dari permukaan pada sistem yang mengalir. Permukaan biofilm sendiri adalah habitat yang penting bagi mikroorganisme dalam biofilm karena nutrisi dapat terperap pada permukaan sehingga kandungan nutrisinya dapat lebih tinggi daripada di dalam larutan. Konsekuensinya, jumlah dan aktivitas mikroba pada permukaan biasanya lebih tinggi daripada di air (Madigan and Martinko, 2006).



Gambar 2. Biofilm *Staphylococcus aureus* (CDC Laboratories (2005)).

Pemicu pembentukan biofilm salah satunya adalah kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, contohnya adalah produksi EPS oleh *Escherichia coli* dan *P. aeruginosa* saat ketersediaan nutrisi menipis (Wrangstadh *et al.*, 1990). Hingga tahun 1980-an, pertumbuhan biofilm lebih dianggap sebagai sesuatu yang menarik saja dan bukan sebagai suatu studi ilmiah yang serius. Namun demikian, bukti-bukti yang terkumpul kemudian menunjukkan bahwa pembentukan biofilm lebih disukai oleh mikroorganisme, dan hampir semua permukaan yang terkena kontak dengan mikroba dapat mendukung pembentukan biofilm sehingga memengaruhi kehidupan manusia. Berdasarkan hal tersebut, studi mengenai biofilm menjadi lebih intensif. Selain bakteri, mikroorganisme lainnya seperti alga dan khamir (fungi bersel satu) juga dapat membentuk biofilm, namun biofilm bakteri adalah yang paling banyak dipelajari dan dirujuk sebagai contoh (Lerner and Lerner, 2003).

Aspek terpenting yang membuat pembentukan biofilm bakteri menjadi sangat diminati untuk diteliti adalah terjadinya peningkatan resistensi mikroba

terhadap antibiotik dan agen antimikroba lainnya. Sifat struktural dan karakteristik dari biofilm menyebabkan adanya resistensi yang erat kaitannya dengan mekanisme perlindungan dan pertahanan dari kondisi yang buruk.

Berikut ini adalah mekanisme pertahanan intrinsik sel biofilm yang menyebabkan resistensi menurut Paraje (2011) :

1. Matriks biofilm dapat bertindak sebagai penghalang difusi fisik
Biofilm sebagai penghalang difusi fisik untuk mencegah antibiotik mencapai target. Antibiotik mampu menembus struktur campuran *eksopolisakarida*, DNA, dan protein untuk mencapai target tetapi tidak mampu mencapai konsentrasi efektif di semua bagian.
2. Pembentukan lingkungan mikro dalam biofilm
Menipisnya jumlah nutrisi dan oksigen di dalam biofilm dapat menyebabkan aktivitas metabolisme diubah dan menyebabkan perlambatan pertumbuhan bakteri.
3. Diferensiasi menjadi sel *persister*
Persister sel dianggap tidak tumbuh atau tumbuh lambat, dan juga memiliki kerentanan yang sangat berkurang terhadap antibiotik. Dalam teori *persister*, rute dari sub populasi kecil bakteri dalam biofilm berubah menjadi sel aktif, mampu bertahan terhadap pengobatan antibiotik yang ekstrem karena perubahan genetik yang stabil.
4. Peningkatan produksi tekanan oksidatif
Tekanan oksidatif yang disebabkan oleh tidak seimbangnya antara jumlah oksidan, seperti radikal bebas, peroksida dan oksida nitrat, dengan antioksidannya. Gangguan keseimbangan pro oksidan - antioksidan

menyebabkan kelebihan produksi senyawa oksigen reaktif (SOR) yang dapat mengakibatkan kerusakan pada komponen seluler, termasuk DNA, protein dan lipid. Bakteri akan membentuk senyawa antioksidan sebagai respons fisiologis terhadap SOR, sehingga bakteri dapat beradaptasi terhadap tekanan oksidatif yang menyebabkan perubahan metabolik yang cepat. Enzim utama yang terlibat dalam sistem pertahanan antioksidan dan katalase (CAT).

5. Aksi antagonis antibiotik dan mekanisme degradasi aktif di beberapa bagian biofilm

Microenvironments dapat melawan aksi dari antibiotik dengan mekanisme degradasi aktif di beberapa bagian biofilm. Bakteri saling berkomunikasi dan mengaktifkan gen-gen tertentu sehingga menghasilkan enzim atau toksin yang dapat mendegradasi antibiotik.

D. Kontrol Biofilm

Ada beberapa cara yang dapat dilakukan dalam mengendalikan pembentukan dan pertumbuhan biofilm, yaitu :

- a) Fisik ; langkah yang dilakukan yakni mencegah agar bakteri tidak dapat menempel pada suatu permukaan. Salah satu cara untuk menghalangi penempelan bakteri pada suatu permukaan adalah dengan proses pelapisan (*Coating*) serta modifikasi permukaan (Titanium) dengan lapisan nano tembaga (Cu) dan Nikel (Ni) (Vishwakarma *et al.*, 2009).

- b) Kimia ; metode yang dilakukan dengan menggunakan suatu bahan kimia yang dapat membunuh atau menghilangkan mikroorganisme penyebab biofilm. Cheng *et al.*, (2008) melaporkan bahwa penggunaan senyawa turunan Polimetakrilat dengan rantai samping kationik efektif digunakan sebagai pelapis untuk mematikan bakteri yang menempel pada suatu permukaan hingga mencapai 99%.
- c) Biologi (*Bakteriophage*) ; strategi dengan memanfaatkan virus tertentu yang menginfeksi bakteri. Virus akan menghancurkan bakteri dengan cara masuk ke sel inang dan melekat pada reseptor spesifik pada permukaan bakteri, termasuk lipopolisakarida, protein, atau bahkan *flagella*. Sehingga bakteri akan mati dan terjadinya penurunan biofilm (Esperanza *et al.*, 2011).

E. Mikroalga

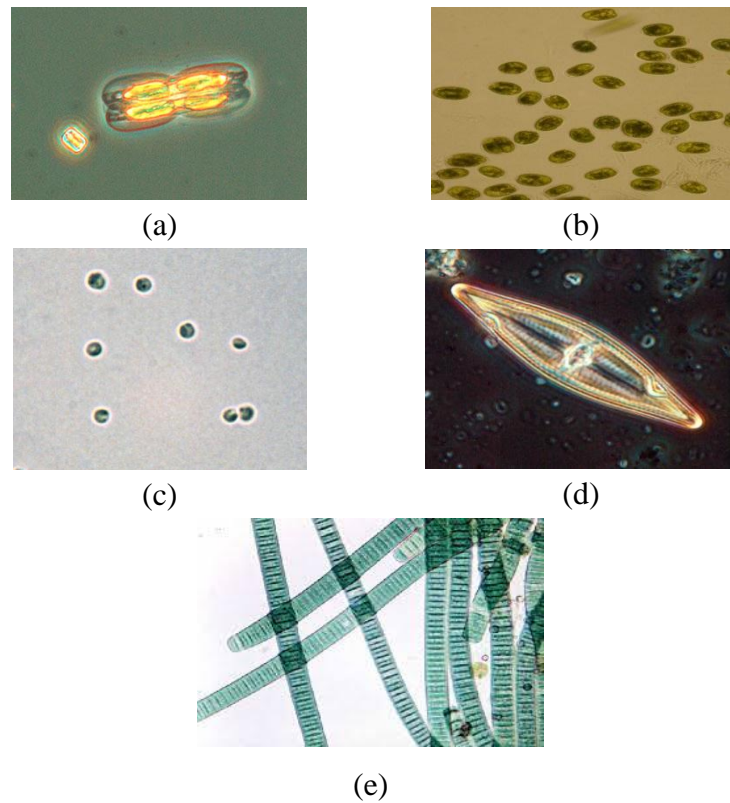
Mikroalga termasuk dalam spesies uniseluler yang hidup secara tersendiri maupun secara berkelompok membentuk rangkaian tertentu, ukurannya berkisar antara beberapa mikrometer (μm) hingga beberapa ratus mikrometer tergantung pada spesiesnya. Mikroalga sangat unik karena terbiasa dengan lingkungan yang mempunyai kepekatan cukup tinggi, mikroalga juga mampu melakukan fotosintesis sehingga mampu menopang kebutuhan makannya sendiri serta mampu menyediakan kira-kira setengah dari oksigen yang ada di atmosfer bumi saat ini dengan secara terus menerus mengurai karbon dioksida yang ada di udara bebas, selain itu mikroalga juga menyediakan sumber energi

yang dapat dimanfaatkan oleh manusia contohnya protein dan karbohidrat (Thrush *et al.*, 2006).

Menurut Lee (1997) alga digolongkan menjadi beberapa kelompok berdasarkan susunan membran kloroplasnya, sebagai berikut :

1. Golongan pertama adalah golongan yang termasuk sianobakteria prokariotik dimana secara filogenetik termasuk dalam eubakteria. Golongan kedua merupakan mikroalga yang kloroplasnya hanya tersusun dari dua lapisan membran pembungkus kloroplas.
2. Golongan kedua termasuk di dalamnya adalah *rhodophyta* (alga merah) dan *chlorophyta* (*green alga*).
3. Golongan ketiga termasuk di dalamnya *euglenophyta* (euglenoid) dan *dinophyta* (dinoflagellata) dimana kloroplas dari mikroalga ini tersusun oleh satu tambahan membran pembungkus kloroplas.
4. Golongan keempat antara lain *cryptophyta* (*chrytopytes*), *chlorara*, *chianophyta*, *heterokontophyta*, termasuk diatom dan *phaeophyceae* (alga coklat), dan *haptophyta*.

Semua jenis alga diatas memiliki persamaan yakni dua membran tambahan penyusun kloroplas retikulum endoplastik kloroplastik. Beberapa contoh spesies mikroalga disajikan dalam Gambar 3.



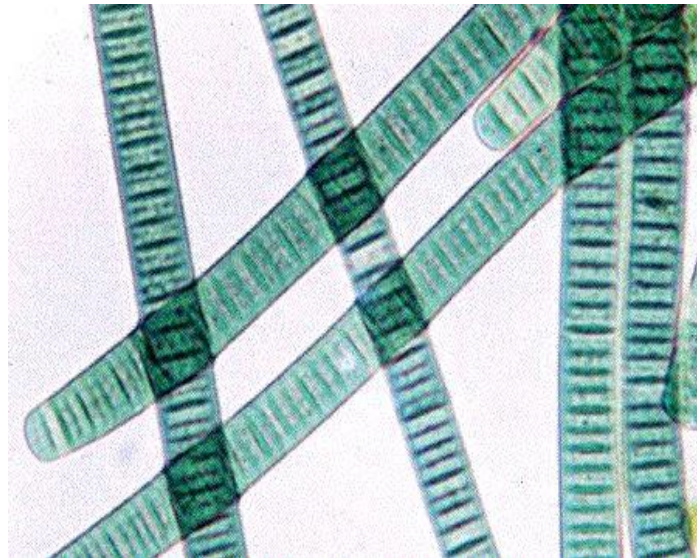
Gambar 3. Beberapa spesies mikroalga dari kelas yang berbeda. (a) *Amphiprora*, (b) *Tetrastelmis chuui*, (c) *Nannochloropsis occulata*, (d) *Pinnularia*, (e) *Oscillatoria* sp. (University of Winconsin Botanical image collection).

F. *Oscillatoria* sp.

Oscillatoria sp. merupakan mikroalga yang termasuk dalam golongan sianobakteria. Menurut Guiry (2014), klasifikasi dari *Oscillatoria* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Protista
Divisi	: Cyanophyta
Kelas	: Cyanophyceae
Ordo	: Oscillatoriales
Famili	: Oscillatoriaceae
Genus	: <i>Oscillatoria</i>
Spesies	: <i>Oscillatoria</i> sp.

Sel *Oscillatoria* sp. membentuk filamen panjang yang dapat pecah menjadi fragmen yang disebut *hormogonia*. *Hormogonia* ini dapat tumbuh menjadi filamen baru yang lebih panjang lagi. Pemecahan filamen biasanya terjadi ketika ada sel yang mati (*necridia*). *Oscillatoria* sp. menggunakan fotosintesis untuk hidup dan bereproduksi. Setiap filamen pada *Oscillatoria* sp. terdiri dari *trikoma* yang terbuat dari sel baris. Ujung dari *trikoma* dapat berofilasi seperti pendulum (Guiry, 2014). Penampakan *Oscillatoria* sp. ditunjukkan oleh Gambar 4.



Gambar 4. Penampakan fisik *Oscillatoria* sp. (University of Wisconsin Botanical Images Collection)

Oscillatoria sp. merupakan salah satu kelompok sianobakteria yang berpotensi menjadi sumber senyawa bioaktif. Sebagai contoh, *Oscillatoria* sp. merupakan penghasil dari *butylated hydroxytoluene* (BHT) atau hidroksitoluena terbutilasi yang sering digunakan sebagai antioksidan, zat aditif makanan, dan industri

kimia (Babu and Wu, 2008). *Oscillatoria* sp. juga diketahui menghasilkan senyawa asam lemak yang bersifat sebagai antibakteri (Singh *et al.*, 2011).

G. Metode Pemanenan Mikroalga

Pemanenan mikroalga untuk tujuan komersil sudah banyak dikembangkan oleh berbagai pihak. Beberapa metode yang sering digunakan yaitu diantaranya sentrifugasi, flokulasi, flotasi, sedimentasi serta teknik filtrasi yang dianggap merupakan teknik-teknik pemanenan generasi kedua serta memiliki keunggulan dalam bidang biaya dan efisiensi dalam penggunaan energi (Schenk *et al.*, 2008).

Salah satu metode pemanenan mikroalga yang cukup diminati yaitu teknik flokulasi atau penggumpalan. Selama proses flokulasi terjadi, sel mikroalga yang terpisah-pisah akan saling berkumpul dan membentuk partikel yang lebih besar dengan kecepatan mengendap semakin meningkat. Flokulasi dapat dilakukan dengan pelbagai cara, diantaranya dengan penambahan bahan kimia seperti menggunakan Zn^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} atau bahan kimia lain sebagai agen pengkhelet (Lee, 1997). Pemanenan dengan prinsip flokulasi dapat juga menggunakan bantuan energi listrik yaitu elektrolisis. Teknik flokulasi-koagulasi ini didasarkan fakta bahwa mikroalga mempunyai sifat sebagai partikel koloid, sehingga memungkinkan bergerak dalam pengaruh medan listrik. Penggunaan teknik elektrolisis akan meningkatkan hasil pemanenan biomassa *Oscillatoria* sp. karena hampir seluruh *Oscillatoria* sp. yang ada di dalam media mengalami penggumpalan atau flokulasi sehingga lebih mudah diambil dari medianya (Aragon *et al.*, 1992).

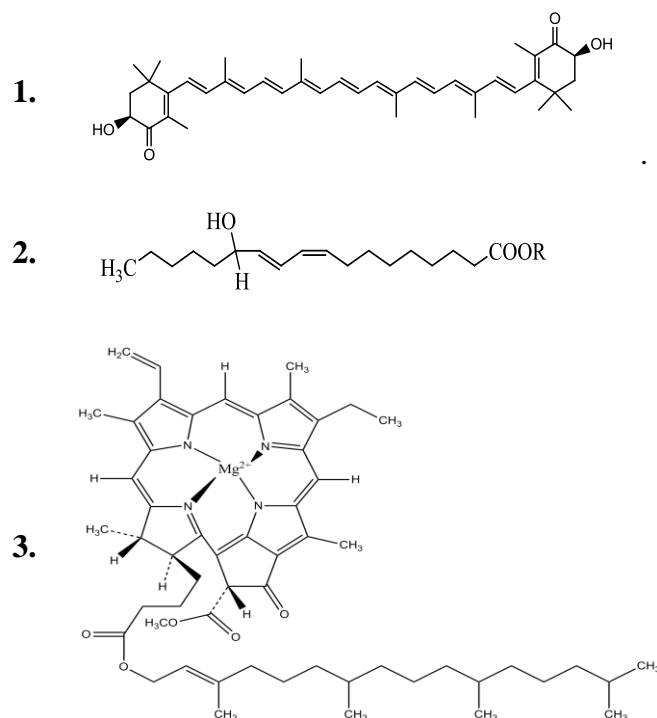
H. Senyawa Bioaktif Mikroalga

Seiring perkembangan bioteknologi mikroalga, sejumlah penelitian mulai dilakukan untuk memperoleh produk bermanfaat yang bernilai tinggi diantaranya sebagai sumber bahan kimia yang dapat menghasilkan produk seperti gliserol, vitamin, protein, pigmen, enzim, dan bahan-bahan bioaktif lain. Bahan-bahan bioaktif yang telah diketahui dapat dihasilkan dari mikroalga yaitu antioksidan, toksin, bahan obat-obatan, dan zat pengatur pertumbuhan (Kabinawa, 1994).

Mikroalga memiliki keuntungan tambahan dari plastisitas metaboliknya yang besar, tergantung pada keadaan fisiologisnya, selain itu metabolisme sekunder mereka dapat dengan mudah dipicu oleh kebanyakan bentuk tekanan eksternal yang terjadi (misalnya terbatasnya sumber nitrogen) (Guedes *et al.*, 2011).

Mikroalga telah lama digunakan dengan tujuan pengobatan; penapisan sistematis senyawa bioaktif mikroalga dimulai pada tahun 1950-an. Pada dekade terakhir mikroalga telah menjadi fokus penelitian yang luas, yang bertujuan untuk menemukan senyawa baru yang mungkin dapat menjadi agen obat yang berguna (Mayer *et al.*, 2005). Mikroalga sementara telah diketahui untuk menghasilkan antibiotik : sejumlah besar ekstrak mikroalga dan atau produk ekstraseluler telah terbukti berguna sebagai antibakteri, antijamur, antiprotozoa dan antiplasmodial (Ghasemi *et al.*, 2004). Aktivitas anti mikroba dari mikroalga dikaitkan dengan senyawa kimia beberapa kelas termasuk indoles, terpen, acetogenins, fenol, asam lemak dan hidrokarbon terhalogenasi stabil (Mayer *et al.*, 2005). Beberapa senyawa metabolit mikroalga tersebut

telah digunakan secara komersil dalam bidang industri dan kosmetik. Sebagai contoh, senyawa turunan karotenoid (1) dan astaksantin (2) dari mikroalga laut adalah bahan yang digunakan dalam kosmetik sebagai antioksidan (Thomas and Kim, 2013). Selain itu contoh senyawa antibakteri dari genus *Oscillatoria* sp. yang telah diketahui antara lain senyawa asam lemak yang bersifat sebagai antibakteri (Mundt *et al.*, 2003). Rodrigues *et al.*, (2015) menyatakan bahwa senyawa dari golongan karotenoid (*echinenone*, *myxoxanthophyll*, dan *canthaxanthin*) dan klorofil diketahui memiliki potensi menjadi agen anti radikal. Struktur senyawa bioaktif dari mikroalga disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Contoh senyawa bioaktif mikroalga (1) Astaksantin (2) 13-hydroxy-9Z-11E-octadeca-dienoic (3) Klorofil a

I. Isolasi Senyawa Bioaktif

1. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan komponen atau senyawa aktif pada suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu. Secara umum, hampir semua metode ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada interaksi dan pencampuran antara sampel dengan pelarut yang sesuai, serta dapat juga berdasarkan distribusi sampel dalam dua sistem pelarut yang berbeda. Campuran antara dua atau lebih pelarut tersebut harus dapat larut satu sama lain (Poole and Poole, 2010).

Metode ekstraksi tradisional seperti maserasi dianggap kurang efektif karena membutuhkan waktu cukup panjang hingga sekitar 2 sampai 10 hari (Cunha *et al.*, 2004). Hingga kini, metode ekstraksi modern telah dikembangkan untuk memperoleh senyawa organik lebih cepat dan efisien dari sampel, beberapa contoh metode ekstraksi yang banyak digunakan yakni Microwave Assisted Extraction (MAE) dan Ultrasonic Extraction (UE) merupakan metode yang menjanjikan dalam proses ekstraksi senyawa bahan alam (Kaufmann *et al.*, 2002).

a. Maserasi Dengan Ultrasonikasi

Salah satu metode ekstraksi yang paling umum yaitu maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Metode ekstraksi ini sangat

menguntungkan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena struktur senyawa dari suatu sampel tidak mudah rusak.

Keuntungan penggunaan ultrasonikasi dalam metode ekstraksi yaitu karena kemampuannya dalam memberikan efek mekanis pada proses kavitasi (pembentukan gelembung-gelembung kecil di dalam sel sampel). Metode maserasi dengan ultrasonikasi diketahui memiliki potensi untuk mengurangi waktu yang diperlukan dalam proses ekstraksi secara signifikan serta mampu meningkatkan perolehan hasil ekstraksi (Liu *et al.*, 2004).

b. Partisi (ekstraksi cair-cair)

Ekstraksi cair-cair (ECC), atau ekstraksi pelarut, merupakan salah satu metode tertua dan paling sering digunakan dalam preparasi sampel analisis kualitatif dan kuantitatif. Ekstraksi cair-cair melibatkan distribusi komponen sampel diantara dua fase larutan yang tidak saling bercampur.

Dalam prakteknya digunakan corong pisah dengan cara mengguncangkan corong berisi campuran pelarut dan sampel untuk memisahkan sampel berdasarkan kelarutan komponennya dalam masing-masing pelarut (Craig *et al.*, 1956). Senyawa polar akan terbawa dalam pelarut polar, senyawa semi polar akan terbawa dalam pelarut semi polar, dan senyawa non polar akan terbawa dalam pelarut non polar.

2. Kromatografi

Kemampuan pemisahan oleh teknik kromatografi dimanfaatkan dalam proses isolasi dan identifikasi campuran senyawa yang sulit untuk diketahui komponennya. Kromatografi dalam arti luas mengacu pada proses yang memungkinkan pemisahan suatu campuran senyawa kimia sebagai akibat dari perbedaan kemampuan komponen tersebut bergerak melalui fase diam dengan pengaruh fase gerak.

Kecepatan Bergeraknya komponen suatu campuran bervariasi berdasarkan pertimbangan perbedaan rasio distribusi, contohnya perbedaan dalam proporsi waktu yang dihabiskan dalam fase gerak. Perpindahan dari fase gerak ke fase diam disebut dengan istilah adsorpsi, dan memiliki empat mekanisme yang berbeda yakni : (a) Adsorpsi Permukaan (b) Partisi (c) Pertukaran Ion (d) Eksklusi ukuran (Straw, 1985).

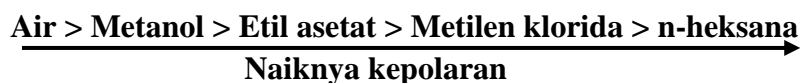
Berdasarkan jenis fase diam dan gerak yang dipartisi, kromatografi dapat digolongkan menjadi beberapa golongan seperti pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Penggolongan kromatografi berdasarkan fase diam dan fase gerak

Fase diam	Fase gerak	Sistem kromatografi
Padat	Cair	Cair-adsorpsi
Padat	Gas	Gas-adsorpsi
Cair	Cair	Cair-partisi
Cair	Gas	Gas-partisi

(Johnson dan Stevenson, 1991).

Pada sistem kromatografi, pemilihan eluen (fase gerak) merupakan faktor yang sangat penting dalam mengisolasi senyawa organik. Berikut ini adalah urutan eluen pada kromatografi berdasarkan kemampuan elusi menurut Gritter *et al.* (1991):



a. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) juga digunakan dalam pemisahan campuran senyawa yang tidak mudah menguap. KLT terdiri dari fase diam (fase stasioner) dan fase gerak. Fase diam yang sering digunakan yaitu silika gel, aluminium oksida (alumina), dan selulosa (Harry *et al.*, 1989). Pemisahan senyawa pada metode KLT terjadi karena masing-masing komponen senyawa memiliki kemampuan berbeda dalam berinteraksi dengan fase diam. Fase gerak yang digunakan umumnya memiliki perbedaan polaritas dengan fase diam (Fair and Kormos, 2008).

Distribusi senyawa-senyawa pada sampel, dihitung dengan membandingkan jarak elusi yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh eluen yang digunakan dan disebut sebagai R_f (*Retention factor*), yang secara sistematis dinyatakan sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}}$$

Terdapat dua faktor yang mempengaruhi nilai R_f pada kromatografi lapis tipis, yaitu penjerap dan pelarut yang digunakan. Pada kromatografi jerapan

dimana penjerapnya adalah silika gel, senyawa polar akan memiliki afinitas besar terhadap penjerap, dan bermigrasi lambat ke atas tidak seperti halnya pelarut.

Untuk pemisahan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi senyawa yang juga berarti menentukan nilai R_f . Silika gel dapat membentuk ikatan hidrogen di permukaannya karena pada permukaannya terikat gugus hidroksi. Oleh karena itu silika gel bersifat sangat polar sementara itu fase gerak yang digunakan sifatnya non polar, maka saat campuran dimasukkan senyawa-senyawa yang semakin polar akan semakin lama tertahan di fase stasioner dan senyawa-senyawa yang kurang polar/semakin tidak polar akan terbawa keluar lebih cepat (Sarker *et al.*, 2006).

Dalam kromatografi lapis tipis, untuk mengetahui jenis komponen senyawa yang terjerap di fase diam maka dilakukan visualisasi menggunakan reagen yang spesifik. Reagen spesifik yang sering digunakan yaitu serium sulfat. Serium sulfat merupakan suatu senyawa anorganik berbentuk padatan garam anhidrat berwarna kuning. Serium sulfat berperan sebagai oksidator terhadap komponen yang terjerap pada fase diam dan menghasilkan noda berwarna hitam. Noda hitam diakibatkan oleh oksidasi karbon-karbon senyawa target (Mariappan *et al.*, 2001).

b. Kromatografi Kolom

Pada prinsipnya kromatografi kolom digunakan untuk pemisahan campuran beberapa senyawa yang diperoleh dari hasil ekstraksi. Konsepnya sama seperti KLT, pemisahan komponen-komponen suatu zat dalam eluen yang bergerak melalui fase diam sebagai adsorben terjadi akibat adanya perbedaan daya absorpsi pada komponen-komponen tersebut. Ada beberapa jenis kromatografi yang sering digunakan seperti kromatografi kolom gravitasi dan kromatografi tekanan (HPLC).

Metode kromatografi kolom gravitasi lebih sering digunakan karena lebih simple dan mudah disiapkan. Selain itu ini cocok digunakan untuk pemisahan senyawa yang tidak mudah menguap serta tidak stabil pada suhu tinggi. Mekanisme utama pada kromatografi kolom dalam pemisahan senyawa yang berbeda yaitu berdasarkan perbedaan kemampuan migrasi (Church, W., 2005).

J. Spektroskopi Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Metode spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR) banyak digunakan dalam identifikasi mikroorganisme dalam beberapa tahun belakangan.

Spektroskopi FTIR dalam mikrobiologi masih berada pada tingkat awal, namun berdasarkan potensi manfaat penggunaannya menunjukkan bahwa metode ini sangat menjanjikan. Dalam bidang biofilm, metode ini mampu memberikan informasi penting melalui data spektrum yang terbentuk, seperti perkembangan pembentukan biofilm, perubahan permukaan biofilm, dan deteksi pengaruh agen

mikrobia pada permukaan biofilm (Schmitt *et al.*, 1988). Selain itu spektroskopi FTIR juga digunakan sebagai pendukung dalam proses isolasi makromolekul seperti asam nukleat, protein, lipid, polisakarida (Stuart, 1997).

Vibrasi ulur C-H yang terikat pada rantai tunggal alifatik umumnya muncul pada daerah bilangan gelombang antara $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$, serta mengalami vibrasi tekukan pada daerah bilangan gelombang antara $1500 - 1300 \text{ cm}^{-1}$. Pita serapan dari vibrasi ulur C-H dapat sedikit bergeser akibat perbedaan jenis rantai yang terikat, energi yang dibutuhkan oleh C-H untuk tereksitasi sedikit meningkat pada vibrasi rantai asimetris dibanding rantai simetris. Pita serapan uluran C-H pada rantai asimetris dari metil dan metilen memberikan puncak serapan pada 2960 dan 2930 cm^{-1} , sedangkan pada rantai simetris puncak yang muncul dari metil dan metilen yakni pada 2875 dan 2855 cm^{-1} . Selain jenis rantai yang terikat masih ada beberapa faktor yang memengaruhi bentuk dan letak puncak serapan, seperti induksi elektronik, induksi spasial atau efek entropi.

Secara umum vibrasi ulur C=O terlihat pada daerah bilangan gelombang antara $1840-1630 \text{ cm}^{-1}$. Posisi puncak serapan dari uluran C=O muncul berbeda-beda bergantung pada jenis senyawa dimana gugus fungsi tersebut terikat. Vibrasi ulur C=O pada ester memberikan puncak serapan pada $1750-1735 \text{ cm}^{-1}$, pada aldehid memberikan serapan pada $1740-1720 \text{ cm}^{-1}$, pada keton memberikan puncak serapan pada $1750-1705 \text{ cm}^{-1}$, sedangkan pada karboksilat memberikan serapan pada $1750-1700 \text{ cm}^{-1}$. Puncak serapan vibrasi ulur C=O dapat bergeser oleh pengaruh suatu cincin serta konjugasi ikatan pi, contoh puncak serapan C=O akan muncul pada $1700-1680 \text{ cm}^{-1}$ pada keton yang terikat pada cincin

benzene (Burke, 1997). Selain itu serapan dari C=O pada lakton (cincin ester) akan meningkat seiring naiknya tekanan pada cincin, contoh puncak serapan C=O pada *γ-methyl-butanolide* muncul pada 1790 cm^{-1} (Jones *et al.*, 1959). Contoh lain yaitu pita serapan pada daerah bilangan gelombang 1740 cm^{-1} dilaporkan merupakan puncak serapan C=O ester dari lipid yang ada dalam mikroalga (Meng *et al.*, 2014).

Secara umum, gugus O-H akan memberikan serapan pada daerah bilangan gelombang antara $3650 - 3200\text{ cm}^{-1}$ (Burke, 1997). Pada senyawa karboksilat puncak serapan dari gugus O-H akan membentuk serapan yang kuat dan melebar ke arah daerah bilangan gelombang yang lebih rendah, hal ini disebabkan karena terjadi ikatan hidrogen baik intramolekul, maupun intermolekul membentuk struktur dimer karboksilat yang stabil. Pada kondisi tertentu puncak serapan dari O-H dapat berbentuk tajam dan bergeser ke arah bilangan gelombang yang lebih besar apabila dipengaruhi oleh efek halangan sterik atau karena sampel dalam keadaan gas, selain itu dapat terjadi jika sampel dilarutkan dalam pelarut non polar. Ciri khusus dari serapan O-H ini dapat digunakan dalam mengidentifikasi jenis senyawa fenol.

Puncak serapan dari vibrasi ulur O-H pada alkohol dipengaruhi oleh derajat substitusi (primer, sekunder, dan tersier). Selain derajat substitusi, adanya serapan vibrasi ulur C-O juga mempengaruhi letak munculnya suatu vibrasi ulur O-H dari alkohol serta serapan dari vibrasi tekuk O-H pada daerah $1350 - 590\text{ cm}^{-1}$. Berikut daerah serapan gugus O-H disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Frekuensi gugus hidroksi dan senyawa alkohol

Gugus	Frekuensi (cm ⁻¹)	Keterangan
O-H	3570-3200 (melebar)	Gugus hidroksi, H terikat pada uluran O-H
	3400-3200	Uluran OH "Polimer" bentuk normal atau biasa
	3550-3450	Uluran OH (membentuk dimer)
	3570-3540	Uluran OH terikat secara internal
O-H	3645-3600 (Tajam)	Gugus hidroksi nonikatan, uluran OH
	3645-3630	Alkohol primer, uluran OH
	3635-3620	Alkohol sekunder, uluran OH
	3620-3540	Alkohol tersier, uluran OH
	3640-3530 ^a	Fenol, uluran OH
O-H	1350-1260	Alkohol primer atau sekunder, tekukan OH sebidang
	1410-1310	Fenol atau alkohol tersier, tekukan OH
	720-590	Alkohol, tekukan OH tak sebidang
C-O	~1050	Alkohol primer, uluran C-O
	~1100	Alkohol sekunder, uluran C-O
	~1050	Alkohol tersier, uluran C-O
	~1200	Fenol, uluran C-O

(Coates, 2000).

Gugus alkena dan alkuna terbagi menjadi dua jenis, yaitu gugus terminal dan internal. Alkena/alkuna terminal memiliki ikatan pi sebagai penghubung karbon 1 dan 2 pada ujung rantai, sedangkan alkena/alkuna internal memiliki ikatan pi yang menghubungkan antar karbon yang terikat dengan karbon lain. Uluran C-H pada suatu alkena (metilen) akan memberikan serapan pada daerah bilangan gelombang antara 3100-3000 cm⁻¹, sedangkan uluran C=C pada alkena memberikan serapan pada daerah bilangan gelombang antara 1680-1610 cm⁻¹. Frekuensi C=C akan menurun apabila dalam kondisi simetris, sterik, serta terkonjugasi. Vibrasi ulur C-H pada alkuna terminal memberikan serapan pada daerah bilangan gelombang antara 3320-3280 cm⁻¹ dan memiliki intensitas cukup kuat. Serapan pada daerah bilangan gelombang 2260-2100 cm⁻¹ menunjukkan vibrasi ulur dari C≡C. Puncak serapan pada 3320-3280 cm⁻¹ tidak akan muncul pada alkuna internal, hal ini dikarenakan tidak terdapatnya gugus

C-H *sp*. Berdasarkan hukum Hooke, frekuensi suatu gugus dipengaruhi oleh kekuatan ikatan dan massa atom sedangkan intensitas dari suatu serapan dipengaruhi oleh berbagai faktor, seperti jumlah ikatan sejenis, efek kepolaran, dan orde ikatan (Burke, 1997).

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan April - November 2016 di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung. Analisis FTIR dilakukan di laboratorium Kimia Analitik Institut Teknologi Bandung (ITB).

B. Alat dan Bahan

1. Alat-alat yang digunakan

Adapun alat-alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain neraca analitik, *autoclave kleinfeld-Germany/HV-L25*, *centrifuge*, *laminar air flow ESCO/AVC4A1*, mikroskop *Illuminating System Zeiss Axio A10*, *microplate reader Hospitex-Italy*, *mikroplate 96-well*, aerator, jarum ose, pinset, kaca preparat, *cover-slip*, lampu spiritus, mikropipet, oven, timbangan, ultrasonik, penguap putar vakum *Buchii/R205*, lampu UV *kohler/SN402006*, seperangkat alat KLT dan kromatografi kolom, Spektrofotometer *Jasco IR-300*, dan alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium meliputi gelas piala, labu erlenmeyer, gelas ukur, labu takar, dan corong pisah.

2. Bahan-bahan yang digunakan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain media F/2-Si yang terdiri dari makronutrien, mikronutrien, larutan vitamin dan antibiotik. Media bakteri *Tryptic Soy Broth* (TSB), diklorometana, etanol, metanol (MeOH), heksana, etil asetat, asam asetat 30%, serum sulfat, plat silika HPTLC Silica gel 60 RP-18 F₂₅₄S, plat silika TLC silica gel 60 W, silika gel 60 (70-230 mesh), Cosmosil 75C₁₈ OPN, asam sulfat, kristal violet 1%, asetonitril, akuades, dan bahan-bahan pendukung seperti tisu, alumunium foil, dan sebagainya. Biomaterial yang digunakan antara lain isolat mikroalga *Oscillatoria* sp., diperoleh dari UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, dan isolat bakteri *E. coli*, diperoleh dari Rumah Sakit Abdul Muluk Bandar Lampung.

C. Prosedur Penelitian

1. Kultivasi dan Pemanenan *Oscillatoria* sp.

Metode kultivasi mengacu pada metode yang dilakukan Guillard (2005) yang dimodifikasi. Sebanyak 200 mL media F₂+Si dimasukkan ke dalam labu kultur dan ditambahkan dengan 25 mL kultur *Oscillatoria* sp. Induk dan dikultivasi selama satu minggu, pada suhu ruang, dengan sistem aerasi ke dalam media dan sistem pencahayaan selama 24 jam menggunakan lampu TL 40 watt. Kultur tersebut kemudian diperbesar hingga skala 13L. Kultur selanjutnya dibiakkan pada sistem terbuka menggunakan wadah kaca (V 13 L), sistem aerasi, dan menggunakan cahaya matahari serta

waktu kultivasi selama 7 hari. Morfologi mikroalga *Oscillatoria* sp. diidentifikasi menggunakan mikroskop AXIO Imager.A1 dengan perbesaran 40X.

Pemanenan biomassa *Oscillatoria* sp. dilakukan menggunakan teknik elektrolisis (Jungmin *et al.*, 2013) dan teknik filtrasi atau penyaringan (Vonshak *et al.*, 2002). Isolat mikroalga *Oscillatoria* sp. dipanen setelah satu minggu. Teknik elektrolisis pada proses pemanenan *Oscillatoria* sp. dilakukan dengan menggunakan elektroda aluminium, tegangan 8-10 volt (Jungmin *et al.*, 2013) serta menggunakan kain saring (*planktonic net*) 50 mikron. Biomassa basah yang diperoleh dikumpulkan dan disimpan dalam lemari pendingin (suhu 4 °C) jika tidak langsung digunakan.

2. Ekstraksi

Ekstraksi biomassa *Oscillatoria* mengacu pada metode yang dilakukan Ryckebosch *et al.*, (2012) dengan beberapa modifikasi. Biomassa diekstraksi menggunakan pelarut diklorometana : metanol (1:1) dengan rasio biomassa : pelarut adalah 1 : 5, dalam wadah tertutup kemudian disonikasi dengan frekuensi 20 kHz selama 30 menit. Hasil ekstraksi tersebut disaring dengan kapas untuk menghilangkan ampasnya sehingga diperoleh ekstrak dengan pelarut. Untuk mendapatkan ekstrak pekat, dihilangkan pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* suhu 40 °C, kecepatan 60 rpm, dan tekanan 122 mBar sampai tidak ada lagi pelarut yang menetes (McCloud, 2010). Ekstrak selanjutnya dilarutkan dalam larutan partisi DCM-air (1:1) dalam corong pisah. Larutan dikocok

beberapa kali dan didiamkan hingga terbentuk dua fase. Hasil akhir tahapan partisi akan diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi DCM, dan fraksi air. Kedua fraksi tersebut dipisahkan menggunakan mesin *Rotary Vacuum Evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat, untuk selanjutnya dilakukan uji antibiofilm.

3. Uji Antibiofilm

Pengujian ini mengacu pada metode yang dilakukan Nikolic *et al.*, (2014) dengan sedikit modifikasi. *Mikroplate* diisi dengan 100 μL media TSB, 50 μL kultur *E.coli* (skala McFarland 1.0) serta 50 μL senyawa uji sebagai *well* uji. Untuk kontrol negatif, *well* diisi dengan 50 μL kultur bakteri dan 100 μL media TSB, sedangkan sebagai kontrol positif *well* hanya diisi dengan 150 μL asam asetat 30%. Seluruh serial uji dilakukan tiga kali pengulangan (triplet), setelah itu mikroplat diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. *Mikroplate* yang sudah diinkubasi dikeluarkan isinya lalu masing-masing *well* dicuci dengan akuades 200 μL sebanyak 3 kali, selanjutnya dimasukkan 150 μL kristal violet 1% dan didiamkan selama 10 menit dalam suhu ruang.

Pengujian menggunakan kristal violet 1% akan menghasilkan larutan berwarna biru-keunguan, semakin pekat warna larutan maka mengindikasikan semakin banyak biofilm yang terbentuk, hal ini disebabkan kristal violet akan menempel pada biofilm yang ada didalam *well* dan akan terlarut kembali (lepas dari biofilm) dengan penambahan etanol maupun asam asetat (O'toole, 1999). Larutan kristal violet

selanjutnya dikeluarkan dan masing-masing *well* dibilas dengan akuades 200 μL sebanyak 3 kali lalu yang terakhir masukkan 150 μL asam asetat 96% dan didiamkan selama 5 menit. Isi *mikroplate* selanjutnya dipindahkan ke *mikroplate flat bottom* dan diukur serapannya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm. Persentase penghambatan biofilm dihitung dengan menggunakan rumus berikut (Nikolic *et al.*, 2014) :

$$\% \text{ Penghambatan biofilm} = \frac{\text{DO kontrol negatif} - \text{DO kontrol uji}}{\text{DO kontrol negatif}} \times 100\%$$

4. Isolasi dan Pemurnian Senyawa Bioaktif

Ekstrak kasar dari *Oscillatoria* sp. yang memiliki aktivitas paling baik sebagai antibiofilm *E. coli* kemudian diuji secara KLT menggunakan variasi pelarut DCM, MeOH, etilasetat, heksana serta visualisasi menggunakan serum sulfat. Hasil uji KLT tersebut digunakan sebagai acuan dalam pemisahan selanjutnya dengan kolom silika dan C_{18} , eluen MeOH-air. Fraksi-fraksi yang dikumpulkan diuji aktivitas antibiofilmnya pada mikroplat dan diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 630 nm.

Pemurnian senyawa target dilakukan dengan metode kristalisasi teknik difusi cair-cair menggunakan dua pelarut yang memiliki perbedaan kemampuan dalam melarutkan senyawa target. Pelarut yang sering digunakan diantaranya diklorometana dan metanol.

5. Karakterisasi Gugus Fungsi

Karakterisasi pada penelitian ini menggunakan Spektroskopi FTIR (*Fourier Transform Infra Red*). Senyawa target yang berbentuk padat digerus dengan garam KBr (1 : 100) lalu dibuat pelet menggunakan diameter 7 mm. Pelet kemudian diletakkan pada *sample holder* dan diukur serapannya menggunakan spektrometer FTIR pada daerah $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Sampel yang akan dianalisis harus dipastikan dalam kondisi kering serta bebas dari kotoran sekitar wadah penampung. Data hasil analisis selanjutnya diolah dengan menggunakan Ms. EXCEL 2013 (Sigeo *et al.*, 2002).

V. SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan didapatkan isolat senyawa T4M1 yang memiliki kemampuan sebagai antibiofilm bakteri *Escherichia coli* resisten kloramfenikol pada dosis 100 μg sebesar 74%.
2. Hasil analisis menggunakan FTIR menunjukkan bahwa isolate senyawa T4M1 merupakan senyawa alifatik rantai panjang dengan substituen gugus Hidroksi, keton, alkena, dan amina yang ditunjukkan pita pada bilangan gelombang 3450 cm^{-1} (O-H), 2920 cm^{-1} (C-H), 1707 cm^{-1} (C=O), 1635 cm^{-1} (C=C), serta 1382 cm^{-1} (C-N).

B. Saran

Berdasarkan dari penelitian ini, maka disarankan untuk penelitian selanjutnya yaitu mencukupi penelitian sampai elucidasi struktur, mengetahui secara pasti kondisi bakteri setelah diuji antibiofilm, mengkaji lebih lanjut untuk mengetahui serta mempelajari mekanisme antibiofilm senyawa bioaktif dari ekstrak *Oscillatoria* sp.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkhalil, S. Chopra, M and Zinkevich, V. 2014. Antibacterial Activity Of Manuka Honey On The Growth Of Pure and Mixed Bacterial Biofilms Formed by Sulphate Reducing Bacteria and *Escherichia Coli*. *Proceedings of the N Society* .73 (OCE1) : E36.
- Angst EC. 1923. The Fouling of Ships Bottoms by Bacteria. *Rep., Bur. Constr. Repair*, US Navy Dep., Washington, DC.
- Aragon. Bustos, R. Borja Padillab,J.A. Fiestas Ros de Ursinosb. 1992. Experimental Study Of The Recovery Of Algae Cultured In Effluents From The Anaerobic Biological Treatment Of Urban Wastewaters. *Elsevier Science Publishers B.V.*. Spain.
- Azza M. Abd El-Aty, Amal A. Mohamed, Farag A. Samhan. 2014. In Vitro Antioxidant And Antibacterial Activities Of Two Fresh Water Cyanobacterial Species, *Oscillatoria Agardhii* And *Anabaena Sphaerica*. *J. of App. Pharmaceutical Science* Vol. 4 (07). Egypt. pp. 069-075.
- Babu, B. and J. T. Wu. 2008. Production of Natural Butylated Hydroxytoluene as an Antioxidant by Freshwater Phytoplankton. *J Phycology*. 44 (6): 1447–1454.
- Bastert J, Korting HC, Traenkle P, Schmalreck AF. 1999. Identification of Dermatophytes by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Mycoses* ISSN 09333. 42: 525-528.
- Bazargani, MM. and Rohloff, Jens. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control*. 61: 156-164.
- Becker EW. 2004. *Microalgae in Human and Animal Nutrition*. in: *Richmond A.(ed)*. Biotechnology and Applied Phycology. Oxford.
- Bligh,EG. and Dyer,WJ. 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* USA. 37:911-917.

- Borowitzka, MA. 2013. High-Value Products From Microalgae – Their Development and Commercialisation. *J Appl Phycol.***25**: 743–756.
- Burke, JT. 1997. IR Spectroscopy or “Hooke’s Law at the Molecular Level”. *J. of Chemical Education*. Vol. 74 No. 10.
- Cheng G, Xite H, Zhang Z, Chen S, Jiang S. 2008. A Switchable Biocompatible Polymer Surface With Self-Sterilizing And Nonfouling Capabilities. *Angewandte Chemie-International Edition.***47**:8831-4.
- Church, WH. 2005. Column Chromatography Analysis of Brain Tissue: An Advanced Laboratory Exercise for Neuroscience Majors. *J. of Undergraduate Neuroscience Education* (JUNE). **3** (2):A36-A41.
- Craig, LC and Craig, D. 1956. A. Weissberger (Ed.), *Techniques of organic Chemistry*, Vol. III, 2nd Edn. Interscience, New York.
- Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO. 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc*, **15** :964-970.
- Ducel, G. 2002. *Prevention of hospital-acquired infections, A practical guide. (2nd ed)*. World Health Organization. Department of Communicable disease, Surveillance and Response. Geneva.
- Eloff, JN. 1998. Which Extractant Should Be Used For The Screening and Isolation of Antimicrobial Components From Plants?. *J. of Ethnopharmacology* **60** : 1–8.
- Esperanza CM, Consuegra BJ, Ruben DS. 2011. *Biofilm formation, control and novel strategies for eradication*. In A. Mendez – Vilaz (Ed.), *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. Badajoz : Formatex Research Center.
- Ghasemi Y, Yazdi MT, Shafiee A, Amini M, Shokravi S, Zarrini G. 2004. Parsiguine, a Novel Antimicrobial Substance From *Fischerella Ambigua*. *Pharmaceutical Biology*. **42** :318-322.
- Gomes, NM., Bessa, Lj., Buttachon, S., Costa, PM., Buaruang, J., Dethoup, T., Silva, AMS., and Kijjoa, A.. 2014. Antibacterial And Antibiofilm Activities Of Tryptoquivalines And Meroditerpenes Isolated From The Marine-Derived Fungi *Neosartorya Paulistensis*, *N. Laciniosa*, *N. Tsunodae*, And The Soil Fungi *N. Fischeri* And *N. Siamensis*. *Mar. Drugs*. **12**, 822-839.
- Gritter RJ, Bobbitt JM, Schwarting AE. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Padmawinata K, penerjemah. Edisi ke-2. Bandung: ITB.

- Guedes, AC., Amaro, HM., and Malcata, FX. 2011. Microalgae as Sources of Carotenoids. *Mar Drugs*. **9** :625–644.
- Guillard, RRL.. 2005. *Algal Culturing Technique*. R. A. Andersen (ed). Elsevier Academic Press. London. Pp117-132.
- Guiry , MD. 2014. World-Wide Electronic Publication. *AlgaeBase*. National University of Ireland, Ireland.
- Hawa, LC. 2011. Studi Komparasi Inaktivasi *Escherechia coli* dan Perubahan Sifat Fisik Pada Pasteurisasi Susu Sapi Segar Menggunakan Metode Pemanasan dan Tanpa Pemanasan Dengan Kejut Medan Listrik. *J Teknologi Pertanian*, **12** (1):31-39.
- Johnson, EL. dan Stevenson, R. 1991. *Dasar Kromatografi Cair*. Diterjemahkan oleh K. Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung. 50-55.
- Jones, PG. 1981. *Crystal growing*, Chemistry in Britain. **17**, 222-225.
- Jones, Rn., Angell, Cl., Smit, Rjd. 1959. The Carbonyl Stretching Bands In The Infrared Spectra Of Unsaturated Lactones. *Can. J. Chem.* Vol. 37. 2007-2022.
- Jungmin, Kim ; Byung-Gon, Ryu ; You-Jin, Lee ; Jong-In, Han ; Woong, Kim ; Ji-Won, Yang. 2013. Continuous harvest of marine microalgae using electrolysis: effect of pulse waveform of polarity exchange. *Springer-Bioprocess Biosyst Eng*. Republic of Korea.
- Kabinawa INK. 1994. *Kultur Mikroalga: Aspek dan Prospek*. Prosiding Seminar Nasional Bioteknologi Mikroalga. Puslitbang-Biotek. LIPI, Bogor.
- Kaufmann B, Christen P. 2002. Recent Extraction Techniques For Natural Products: Microwave-Assisted Extraction And Pressurized Solvent Extraction. *Phytochem Analysis.*, 13:105-113.
- Khan, R., Zakir, M., Khanam, Z., Shakil, S., and Khan, AU. 2010. Novel Compound From *Trachyspermum Ammi* (Ajowan Caraway) Seeds With Antibiofilm And Antiadherence Activities Against *Streptococcus Mutans*: A Potential Chemotherapeutic Agent Against Dental Caries. *J. of Appl Microb*. ISSN 1364-5072.
- Komárek J., Kaštovský J., Mareš J. & Johansen J. R. 2014. Taxonomic Classification Of Cyanoprockaryotes (Cyanobacterial Genera), Using Apolyphasic Approach.–Preslia86. Republik Ceko. 295–335.
- Lee, YK. 1997. Commercial Production of Microalgae in The Asia-Pacificrim. *J. Appl. Phycol.* **9**:403–411.

- Lerner KL, Lerner BW. 2003. *World of Microbiology and Immunology*. Farmington Hills, MI: The Gale Group, Inc. Hal: 67-68.
- Licking, E. 1999. Getting A Grip On Bacterial Slime. *Bloomberg. Business Week* 13 September, pp. 98–100.
- Liu W, Wang X. 2004. Extraction Of Flavone Analogues From Propolis With Ultrasound. *Food Sci (China)*. **25** :35-39.
- Madigan, MT. and Martinko, JM. 2006. *Brock Biology of Microorganisms, 11th edition*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey. ISBN 0-13-144329-1.
- Mariappan, Periasamy, Ukkiramapandian Radhakrishnan. 2001. "*Cerium(IV) Ammonium Sulfate*" Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. John Wiley & Sons.
- Mayer AM, Hamann MT. 2005. Marine Pharmacology In 2001--2002: Marine Compounds With Anthelmintic, Antibacterial, Anticoagulant, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antimalarial, Antiplatelet, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting The Cardiovascular, Immune and Nervous Systems and Other Miscellaneous Mechanisms of Action. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.*; **140** (3-4):265-86.
- McCloud, TG. 2010. High Throughput Extraction of Plant, Marine and Fungal Specimens for Preservation of Biologically Active Molecules. *Molecules*. **15**:4526-4563.
- Meng, Y., Yao, C., Xue, S., Yang, H. 2014. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy in determination of microalgal compositions. *Bioresource Technology*. **151** . 347–354.
- Mohan N, Hanumantha Rao P, Ranjith Kumar R, and Sivasubramanian V. 2010. Mass Cultivation of *C. turgidus* and *Oscillatoria* sp. and Effective Harvesting of Biomass by Low-cost methods. *Nature precedings*. India.
- Mundt, S., Kreitlow, S and Jansen, R. 2003. Fatty Acids with Antibacterial Activity from the Cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB051. *J. of Applied Phyco*. **15** :263–267.
- Nikolic, Milos; Vasic, Sava; Durdevic, Jelena; Stefanovic, Olgica; Comic, Ljiljana. 2014. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Ginger Ethanolic Extract. *Kragujevac J. Sci*. **36**:129-136.

- O'toole, GA. ; Pratt, Leslie A ; Watnick, P ; Newman, Dianne K ; Weaver, V.B. ; Kolter, R. 1999. Genetic Approaches to Study of Biofilms. *Methods in Enzymology*. **310**:91-109.
- Paraje, MG. 2011. *Antimicrobial Resistance in biofilm*. In A. Mendez-Vilaz (Ed.), *Science againsts microbial pathogens : Communicating current research and technological advances : Vol.2*. Badajoz : Formatex Research Center. (pp. 736 – 744).
- Poole, CF. and Poole, SK. 2010. Extraction Of Organic Compounds With Room Temperature Ionic Liquids. *J. of Chromatography A*, **1217** .2268–2286.
- Ryckebosch, E ; Muylaert, K; Foubert, I. 2012. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *J Am Oil Chem Soc*. **89**:189–198.
- Rodrigues, DB., Cristiano RM., Adriana ZM., Eduardo JL., Leila QZ. 2015. Bioactive Pigments From Microalgae Phormidium Autumnale. *Food Research International*.
- Romay, CH., González, R., Ledón, N., Ramirez, D. and Rimbau V., 2003. C-Phycocyanin: a Biliprotein with Antioxidant, Anti-Inflammatory and Neuroprotective Effects. *C Protein & Peptide Science*. **4** (3):207.
- Sánchez, M., Bernal-Castillo, J., Rozo, C., and Rodríguez, I. 2003. Spirulina (Arthrospira): an Edible Microorganism: a review. *Univ Sci*. **8** :7–24.
- Schenk, PM., Thomas, SR., Stephen, E., Marx, UC., Mussgnug, JH., Posten, C., Kruse, O., Hankamer, B. 2008. Second Generation Biofuels: High-Efficiency Microalgae for Biodiesel Production. *Bioenerg. Res*. **1**:20–43.
- Schmitt, Jurgen and Flemming, Hans-Curt. 1998. FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*. **41** : 1-11.
- Sigee DC, Dean A, Levado E, Tobin MJ. 2002. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy Of *Pediastrum Duplex*: Characterization Of A Micro-Population Isolated From A Eutrophic Lake. *Eur. J. Phycol*. **37**: 19-26.
- Singh, RK., Tiwari SP., Rai AK., and T. M. Mohapatra. 2011. Cyanobacteria : an Emerging Source for Drug Discovery. *J Antibiotics*. **64**:401–412.
- Sarker, SD., Latif, Z. and Gray AI. 2006. *Method In biotechnologys Natural Product Isolation Second Edition*. Humana Press. New Jersey.
- Smith-keary, PF. 1988. *Genetic elements in Escherichia coli*. McMillan. London.

- Straw, WA. 1985. Principles of Chromatography and Separative Techniques- Adsorption and Partition Chromatography. *JSDC*. Volume 101.
- Stuart, B. 1997. *Biological Applications of Infrared Spectroscopy*. Wiley: Chichester. pp. 25-180.
- Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. 2004. The Role of Carotenoids in the Prevention of Human Pathologies. *B Pharmacother*. **58** :100–10.
- Thomas, NV. and Kim SK. 2013. Beneficial Effects of Marine Algal Compounds in Cosmeceuticals. *Mar. Drugs*. **11** : 146-164.
- Thrush, Simon; Hewitt, Judi; Gibbs, Max; Lundquist, caralyn; Norkko, Alf. 2006. *Functional Role of Large Organisms in Intertidal Communities: Community Effects and Ecosystem Function*. *Ecosystems* 9: 1029–1040.
- Vishwakarma V, Josephine J, George RP, Krishnan R, Dash S, Kamruddin M,. 2009. Antibacterial Copper-Nickel Bilayers And Multilayer Coatings By Pulsed Laser Deposition On Titanium. *Biofouling*. India. **25**: 705-710.
- Vonshak, S., A Bigogno, C., Khozin-Goldberg, I., Boussiba,. and Cohen, Z. 2002. Lipid and Fatty Acid Composition of the Green Alga *Parietochloris Incisa*. *J Phytochemistry*. **60**: 497-503.
- WHO, 2014. Global Health Observatory. Diakses melalui <http://www.who.int/> pada tanggal 23 November 2015.
- Williams, Elizabeth. 1967. The Gamete Pigments of *Hormosira banksii* (*Phaeophyta*). *J. of Experimental Botany* Vol. 18, No. **56**. New Zealand. pp. 416-421.
- Wrangstadh M, Szewzyk U, Ostling J, Kjellenberg S. 1990. Starvation Specific Formation of a Peripheral Exopolysaccharide by a Marine *Pseudomonas* Sp. *Appl Environ Microbiol*. **56** (20):65-72.
- Yamada, H and Person, WB. 1964. Absolute Infrared Intensities of the Fundamental Absorption Bands in Solid CO₂ and N₂O. *The J. of Chem Phys*. **41**, 2478.