

PENGARUH MEDIA KULTIVASI *Chaetoceros gracilis* TERHADAP KANDUNGAN KIMIAWI DAN POTENSI INHIBITOR PROTEASE

[Effect of *Chaetoceros gracilis* Cultivation Media to the Chemical Content and Protease Inhibitor Potential]

Iriani Setyaningsih*, Tati Nurhayati dan Uzainah Aremhas

Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor

Diterima 28 Januari 2013 / Disetujui 09 Januari 2014

ABSTRACT

Microalgae produce secondary metabolites with different characteristics for each genus, species or strain. A single species of microalgae can produce several bioactive compounds, including protease inhibitors which can prevent deterioration of fish. In this study, we observed the growth of *Chaetoceros gracilis* in the media NPSi and NPSi + NaHCO₃ and determined the chemical content and the potency of protease inhibitor from *Chaetoceros gracilis* in both media. The culture was harvested at 8 and 15 days. Screening of protease inhibitor activity was performed by agar diffusion method. Protease inhibitor activity was tested on three pathogenic protease-producing bacteria, namely *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. The pathogenic bacteria often contaminate foodstuffs. The results showed that media NPSi and NPSi + NaHCO₃ affected protein and lipid content of *C. gracilis*, but the culture age did not affect them. The protein content of *C. gracilis* cultivated in NPSi media (34.75 and 32.94%) was higher than in NPSi + NaHCO₃ media (28.13 and 27.13%), while the lipid content was 16.36 and 18.06, 23.86 and 25.40% respectively. Extracts of *C. gracilis* grown in NPSi and NPSi+NaHCO₃ media had inhibitory activity against the test bacteria. Inhibitory activity against *E. coli* was greater than *S. aureus* and *B. cereus*.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Chaetoceros gracilis*, chemical content, *Escherichia coli*, protease inhibitor, *Staphylococcus aureus*

ABSTRAK

Mikroalga menghasilkan metabolit sekunder dengan karakteristik yang berbeda untuk setiap genus, spesies atau strain. Satu spesies mikroalga dapat memiliki beberapa potensi dari senyawa bioaktifnya, termasuk inhibitor protease. Inhibitor protease dapat menghambat kemunduran mutu ikan. Pada penelitian ini diketahui pertumbuhan *Chaetoceros gracilis* dalam media NPSi (Nitrogen, Phosphor, Silika) dan NPSi ditambah NaHCO₃, serta ditentukan kandungan kimiawi dan potensi inhibitor protease *Chaetoceros gracilis* dalam kedua media tersebut. Kultur dipanen pada umur kultur 8 dan 15 hari. Penapisan aktivitas inhibitor protease dilakukan dengan metode difusi agar. Aktivitas inhibitor protease diujikan pada tiga bakteri patogen penghasil protease, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. Bakteri patogen tersebut sering mengontaminasi bahan pangan. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa media NPSi dan NPSi ditambah NaHCO₃ mempengaruhi perbedaan kandungan protein dan lipid *C. gracilis*, namun umur kultur tidak mempengaruhinya. Kadar protein *C. gracilis* dalam media NPSi (34.75 dan 32.94%) lebih tinggi dibanding dalam media NPSi ditambah NaHCO₃ (28.13 dan 27.13%), sedangkan kadar lipidnya berturut-turut 16.36 dan 18.06, serta 23.86 dan 25.40%. Ekstrak dari *C. gracilis* yang dikultivasi dalam kedua media tersebut memiliki aktivitas inhibitor protease yang sama terhadap *E. coli*. Aktivitas hambatan terhadap *E. coli* lebih besar dibandingkan terhadap *S. aureus* dan *B. cereus*.

Kata kunci: *Bacillus cereus*, *Chaetoceros gracilis*, *Escherichia coli*, inhibitor protease, kandungan kimiawi, *Staphylococcus aureus*

PENDAHULUAN

Mikroalga memiliki banyak keunggulan, antara lain mengandung protein dan asam lemak tidak jenuh tinggi. Pemanfaatan mikroalga masih terbatas sebagai pakan dan pangan. Selain itu mikroalga juga dapat dimanfaatkan sebagai bahan dasar obat-obatan atau farmasi. Jenis mikroalga yang banyak ditemui di perairan pantai Indonesia antara lain *Chaetoceros gracilis* yang berwarna kuning kecoklatan sehingga sering disebut dengan *golden-brown algae*.

Pemanfaatan *C. gracilis* saat ini masih terbatas sebagai pakan dalam budidaya udang. *Chaetoceros gracilis* memiliki kandungan lipid yang cukup tinggi ±28% (Elias *et al.* 2005).

Selama pertumbuhan *Chaetoceros gracilis*, kandungan asam lemak golongan SAFA menurun (29.53%) dari fase akhir eksponensial sampai stasioner dan meningkat lagi pada fase kematian (47.38%). Namun asam lemak golongan PUFA meningkat dari fase akhir eksponensial sampai stasioner. Asam oleat ditemukan pada semua tahap pertumbuhan dengan konsentrasi 17-21% dari total asam lemak (Pratiwi *et al.* 2009). Kandungan lipid ini membuat *Chaetoceros* potensial sebagai penghasil biofuel. Selain komponen kimia, *Chaetoceros* juga mempunyai komponen aktif. Hasil penelitian Setyaningsih *et al.* (2008) menunjukkan bahwa *C. gracilis* memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Vibrio harveyi*, dan *Escherichia coli*.

Mikroalga menghasilkan metabolit sekunder yang penyebarannya terbatas dan memiliki karakteristik yang berbeda

*Penulis Korespondensi:
E-mail: iriani25@gmail.com

untuk setiap genus, spesies atau strain tertentu, sehingga tidak mengherankan jika satu spesies mikroalga memiliki beberapa potensi dari senyawa bioaktifnya. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian mengenai potensi lain dari *C. gracilis*, yaitu sebagai inhibitor protease.

Inhibitor protease adalah senyawa yang dapat mengganggu aktifitas enzim protease dengan mengganggu kerja sel penghasil protease (Lehninger, 2005). Enzim protease atau proteolitik adalah enzim yang bekerja sebagai katalis dalam reaksi hidrolisis protein. Beberapa bakteri patogen memiliki enzim protease ekstraseluler (pemecah protein) untuk merusak jaringan sel inangnya seperti *Bacillus* dan *E. coli*. Penyakit seperti HIV dan kanker sangat erat hubungannya dengan enzim protease (Hui, 2003). Keterlibatan enzim protease dalam mekanisme patogenesis meningkatkan perhatian penelitian untuk mendapatkan senyawa obat yang dapat menghambat enzim protease. Inhibitor protease juga berperan dalam pengolahan pangan, salah satunya dapat menghambat kemunduran mutu hasil perikanan. Hasil penelitian Nurhayati *et al.* (2011) menunjukkan bahwa perendaman dengan inhibitor katepsin dapat memperpanjang fase *postrigor* ikan bandeng sebanyak 72 jam atau 3 hari lebih lama dibanding ikan bandeng kontrol. Beberapa inhibitor protease alami dapat dihasilkan dari hasil perikanan seperti sponge, ikan, telur ikan, telur, kentang. Masing-masing senyawa yang dihasilkan berbeda jenis dan potensi aktivitasnya. Pada penelitian ini dianalisis potensi mikroalga *C. gracilis* sebagai inhibitor protease.

Mikroalga dalam pertumbuhannya dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain nutrien, suhu, intensitas cahaya, umur dan sebagainya. Nutrien dapat mempengaruhi komposisi kimia seperti protein, lemak, karbohidrat mikroalga selama pertumbuhan. Saavedra dan Voltolina (2006) menyatakan bahwa kandungan protein selama pertumbuhan mikroalga menurun hingga akhir fase pertumbuhan.

Keberadaan sumber karbon dalam media juga dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Sumber karbon dalam media kultur dapat diperoleh dari udara yang diberikan melalui aerasi. Tersedianya CO₂ di dalam media kultur merupakan faktor penting karena secara langsung dipakai sebagai bahan untuk membentuk molekul-molekul organik melalui proses fotosintesis. Karbondioksida adalah sumber karbon yang lebih disukai oleh tumbuhan akuatik seperti alga dibandingkan karbonat atau bikarbonat. Pada penelitian ini digunakan NaHCO₃ untuk memperbanyak ketersediaan sumber karbon. Pada penelitian ini mikroalga *Chaetoceros gracilis* dikultivasi dalam media NPSi dan media NPSi yang ditambahkan NaHCO₃ sebagai sumber karbon. Kultivasi dilakukan di luar ruangan dengan memanfaatkan sinar matahari sebagai sumber cahaya. Menurut Voltolina *et al.* (2007) cahaya, temperatur, dan komposisi media akan memodifikasi fisiologis, pertumbuhan, dan aktivitas metabolisme mikroalga.

Penelitian ini bertujuan melihat pertumbuhan *C. gracilis* dalam media NPSi dan NPSi + NaHCO₃, menentukan komposisi kimia khususnya protein dan lipid dari *C. gracilis* pada umur berbeda. Selain itu juga mengetahui potensi *C. gracilis* sebagai inhibitor protease, yang selama ini belum ada.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Mikroalga *Chaetoceros gracilis* diperoleh dari Pusat Penelitian dan Pengembangan Oseanografi LIPI Jakarta. Bakteri uji yang digunakan meliputi *Staphylococcus aureus*, air laut untuk media dibeli dari toko akuarium di Bogor, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan, IPB.

Kultivasi *Chaetoceros gracilis*

Proses kultivasi untuk memperoleh kurva pertumbuhan *C. gracilis* dilakukan menggunakan tabung kultur transparan dengan volume kultur 2 L. Perbandingan bibit *C. gracilis* dengan air laut yang digunakan adalah 1:10 (v/v). Media yang digunakan adalah media NPSi dan NPSi+NaHCO₃ (0.5 g/L). Media NPSi terdiri atas urea (Petrokimia) sebagai sumber nitrogen, Super Phosphat (Petrokimia) sebagai sumber fosfat dan natrium silikat (dibeli di toko kimia Bogor) sebagai sumber silika. Selanjutnya aerator dipasang dan dinyalakan *non stop*. Sumber cahaya berasal dari sinar matahari. Penghitungan jumlah sel menggunakan mikroskop dan *haemocytometer* (Marienfeld) dilakukan setiap hari untuk memperoleh kurva pertumbuhan *C. gracilis*.

Setelah diperoleh kurva pertumbuhan, selanjutnya dilakukan kultivasi *C. gracilis* dalam skala besar (14 L) untuk memperoleh biomassa sel *C. gracilis* lebih banyak. Kultur dipanen pada akhir fase log dan pertengahan fase stasioner. Biomassa *C. gracilis* dipisahkan dari media (cairan) dengan sistem filtrasi menggunakan filter keramik. Biomassa *C. gracilis* yang didapat kemudian dikeringkan menggunakan *freeze dryer* (Yamato), selanjutnya ditimbang untuk diketahui berat keringnya yang akan digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya.

Ekstraksi senyawa aktif dari *C. gracilis*

Proses ekstraksi didahului dengan pemecahan sel terhadap biomassa sel *C. gracilis* kering menggunakan *glass bead* dengan prinsip *bead milling*. Biomassa yang sudah diperoleh dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambah etanol (Merck) sebanyak 5 mL lalu dilakukan pemecahan sel dengan *glass bead* selama 10 menit. Selanjutnya dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etanol (1:25) dengan metode maserasi (3 x 24 jam). Pemisahan filtrat dilakukan menggunakan metode penyaringan, selanjutnya dievaporasi, sehingga diperoleh ekstrak kasar yang digunakan untuk uji inhibitor protease.

Analisis kandungan kimiawi

Analisis kandungan kimiawi dilakukan terhadap kandungan protein dan lemak biomassa sel *C. gracilis*. Untuk analisis protein mengacu metode Lowry, sedangkan analisis lipid menggunakan metode Bligh dan Dyer (Iverson *et al.* 2001).

Analisis protein

Analisis protein dilakukan dengan menimbang 4 mg biomassa kering *Chaetoceros* kemudian disuspensikan dalam 20 mL akuades dan dihomogenkan. Kemudian sampel dan bovine serum albumin (BSA) dipipet masing-masing 2 mL ke tabung sentrifuse. Setelah itu ditambahkan 5 mL pereaksi Lowry ke dalam sampel dan BSA lalu dihomogenkan. Sampel dan

BSA didiamkan selama satu jam. Kemudian masing-masing ditambahkan dua kali 0.3 mL folin ciocalteau phenol (Merck) tetes demi tetes dan dihomogenkan kembali serta didiamkan 15 menit. Setelah itu sampel dan BSA disentrifugasi menggunakan sentrifus (Hettich universal) dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya supernatan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer (Spektronic UV-VIS A 5000) panjang gelombang 660 nm dan didapat kurva standar. Kandungan persen protein dalam *C. gracilis* dapat dihitung dengan menggunakan kurva standar.

Analisis lipid

Biomasa *C. gracilis* diekstrak dengan menambahkan 5 mL kloroform (Merck), metanol (Merck), dan air non ion (FKH) dengan perbandingan 5:10:4 selanjutnya sampel disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Supernatan yang terbentuk dipindahkan ke dalam tabung sentrifuse lain dan ditambahkan kloroform, metanol, dan air dengan perbandingan 5:10:4 hingga volume menjadi 5.7 mL. Kemudian sampel ditambahkan 1.5 mL kloroform dan 1.5 mL air non ion dan disentrifuse kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 10 menit. Hasil sentrifuse akan terbentuk lapisan lipid dan pelarut. Lapisan lipid yang berwarna hijau dipipet dan dipindahkan ke dalam botol vial yang telah ditimbang beratnya terlebih dahulu. Kemudian dilakukan peniupan dengan gas N₂ sampai larutan kloroform menguap, lalu botol tersebut ditimbang sebagai berat akhir botol untuk mengetahui berat total lipid. Rumus perhitungan lipid total adalah sebagai berikut:

$$\text{Total lipid} = \text{berat akhir botol} - \text{berat awal botol}$$

Pengujian ekstrak *C. gracilis* sebagai inhibitor protease (Nurhayati et al. 2004)

Proses pengujian ini bertujuan untuk mengetahui potensi ekstrak *C. gracilis* sebagai inhibitor protease. Media yang digunakan adalah media Luria Agar, Sigma-Aldrich (LA) skim 2%. Keempat ekstrak yang diperoleh dari kultur *C. gracilis* (*C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi dipanen pada kultur umur 8 dan 15 hari serta *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi+NaHCO₃ dipanen pada kultur umur 8 dan 15 hari) selanjutnya disuspensikan dalam etanol sehingga konsentrasinya 10% (b/v). Sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam cawan Petri, kemudian sebanyak 10 mL LA skim 2% ditambahkan ke dalam cawan petri steril tersebut dan diputar atau digoyang hingga homogen dan dibiarkan hingga membeku. Untuk kontrol digunakan 200 µL etanol dan media LA skim 2% cair. Bakteri uji (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*) diambil satu ose kemudian ditusukkan ke dalam media yang telah beku. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan dihitung indeks proteolitik masing-masing bakteri baik dalam medium kontrol maupun medium yang mengandung ekstrak dengan menggunakan rumus:

$$\text{Indeks Proteolitik (IP)} = \frac{a}{b}$$

Keterangan:
a = diameter zona bening (mm)
b = diameter koloni (mm)

Daya hambat ekstrak *C. gracilis* terhadap enzim protease bakteri dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{Potensi Daya Hambat} = \left[1 - \frac{[IPe]}{[IPk]} \right] \times 100\%$$

Keterangan:

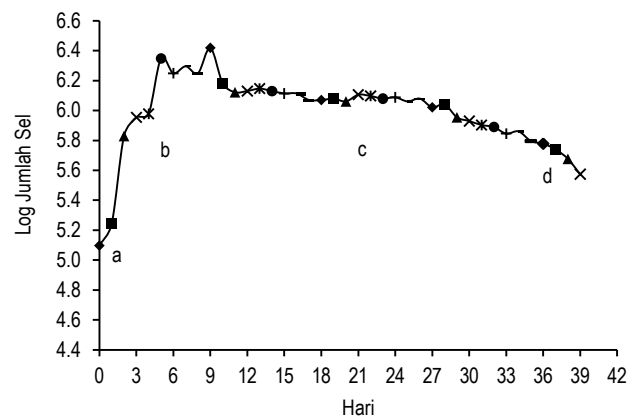
IPe = Indeks proteolitik bakteri uji pada media mengandung ekstrak

IPk = Indeks proteolitik bakteri uji pada media kontrol

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kurva pertumbuhan *Chaetoceros gracilis*

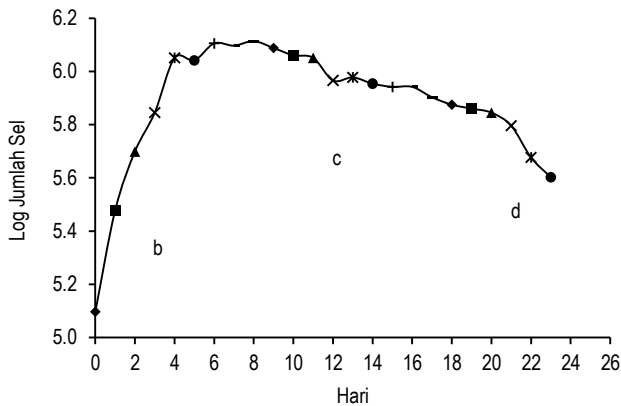
Kurva pertumbuhan *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi mengalami fase lag pada H-0 sampai dengan H-1 (Gambar 1), sedangkan yang dikultivasi dalam medium NPSi+NaHCO₃ tidak mengalami fase lag (Gambar 2). Hal ini dapat terjadi karena fase lag berjalan cepat, sesaat sebelum fase log, sehingga yang nampak pada kurva hanyalah fase log (Richmond, 2004). Fase log terjadi pada H-1 sampai H-6 untuk *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi dan H-0 sampai H-4 untuk *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi+NaHCO₃. Fase pertumbuhan *C. gracilis* yang selanjutnya adalah fase stasioner yang terjadi pada H-6 sampai H-30 untuk kultivasi dalam medium NPSi dan terjadi pada H-4 sampai dengan H-20 untuk kultivasi dalam medium NPSi+NaHCO₃. Fase pertumbuhan berikutnya adalah fase kematian mulai terjadi pada hari ke-31 untuk kultivasi dengan media NPSi dan terjadi pada hari ke-21 untuk kultivasi dengan media NPSi+NaHCO₃.



Gambar 1. Kurva kehidupan *Chaetoceros gracilis* dalam media NPSi (a = fase lag, b = fase log, c = fase stasioner dan d = fase kematian)

Chaetoceros gracilis yang dikultivasi dalam medium NPSi memiliki kurva pertumbuhan yang lebih panjang serta kepadatan sel yang lebih tinggi dibandingkan *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi+NaHCO₃. Komposisi kimia yang berbeda dan perubahan kondisi lingkungan memberikan pengaruh terhadap metabolisme sel mikroalga (Voltoлина et al. 2007). Penambahan NaHCO₃ pada awalnya meningkatkan kepadatan sel, namun seiring berjalannya waktu kultivasi terjadi perubahan kondisi lingkungan kultur, perubahan kondisi lingkungan memberikan pengaruh terhadap metabolisme sel mikroalga,

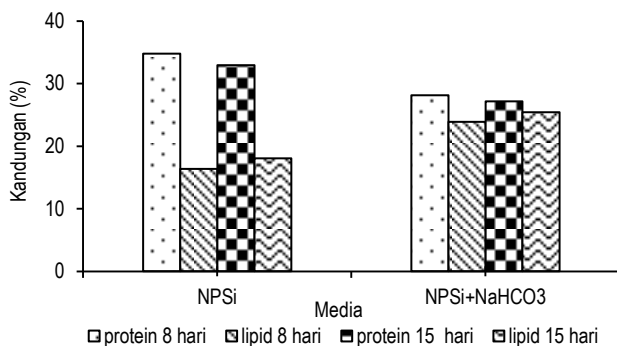
sehingga jumlah karbon yang berlebihan dari penambahan NaHCO_3 menyebabkan *autoinhibition*.



Gambar 2. Kurva kehidupan *Chaetoceros gracilis* dalam media NPSi+ NaHCO_3 (b =fase log, c =fase stasioner dan d =fase kematian)

Komposisi kimia biomasa *C. gracilis*

Kandungan protein *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi dipanen pada umur 8 dan 15 hari sebesar 34.75 dan 32.94%, sedangkan yang dikultivasi dalam medium NPSi+ NaHCO_3 dipanen pada umur 8 dan 15 hari sebesar 28.13 dan 27.13%. Kandungan lipid *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi umur panen 8 dan 15 hari adalah 16.36 dan 18.06%, sedangkan yang dikultivasi dalam medium NPSi + NaHCO_3 umur panen 8 dan 15 hari adalah 23.86 dan 25.40% (Gambar 3).



Gambar 3. Kandungan lipid dan protein *Chaetoceros gracilis* pada umur panen 8 dan 15 hari

Media NPSi dan NPSi + NaHCO_3 mempengaruhi perbedaan kandungan protein dan lipid *C. gracilis*, sedangkan umur kultur tidak mempengaruhi. Kadar protein *C. gracilis* dalam media NPSi lebih tinggi dibanding dalam media NPSi + NaHCO_3 . Hal ini sesuai dengan laju pertumbuhan *C. gracilis* dalam media tersebut. Laju pertumbuhan *C. gracilis* yang dikultivasi dalam media NPSi pada hari ke-8 adalah 0.332 pembelahan sel/hari, sedangkan yang dikultivasi dalam media NPSi+ NaHCO_3 adalah 0.293 pembelahan sel/hari. Laju pertumbuhan *C. gracilis* yang dikultivasi dalam media NPSi lebih tinggi dibandingkan *C. gracilis* yang dikultivasi dalam medium NPSi+ NaHCO_3 . Hal ini dapat terjadi karena penambahan NaHCO_3 yang berlebihan menjadi *autoinhibition* atau penghambat pertumbuhan.

Richmond (2004) menyatakan bahwa karbon selama fase log diutamakan untuk sintesis protein. Hal ini disebabkan mikroalga cenderung mensintesis struktur fungsional terlebih dahulu untuk bereplikasi dan tumbuh.

Selain faktor nutrisi, meningkatnya kandungan lipid juga dipengaruhi oleh fisiologis *C. gracilis*. Sel *C. gracilis* cenderung mensintesis lipid pada fase stasioner sebagai cadangan energi untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya karena laju pertumbuhan sel telah menurun.

Potensi inhibitor protease dari *C. gracilis*

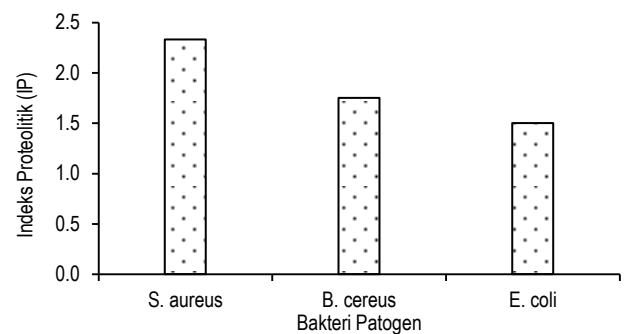
Pengujian inhibitor protease ini bertujuan untuk mengetahui potensi inhibitor protease dari *C. gracilis* dengan mengukur daya hambat ekstrak *C. gracilis* terhadap enzim protease bakteri uji yang ditandai dengan mengecilnya atau tidak terbentuknya zona bening di sekeliling koloni bakteri. Zona bening yang terbentuk pada media kontrol menunjukkan indeks proteolitik bakteri uji. Indeks proteolitik disajikan pada Gambar 4, sedangkan daya hambat ekstrak *C. gracilis* terhadap enzim protease disajikan pada Tabel 1.

Ekstrak *C. gracilis* yang memiliki aktivitas terbaik dalam menghambat enzim protease *S. aureus*, yaitu ekstrak *C. gracilis* yang ditumbuhkan dalam media NPSi umur panen 15 hari, yaitu sebesar 40.17%.

Tabel 1. Daya hambat ekstrak *Chaetoceros gracilis* terhadap enzim protease bakteri patogen

Ekstrak <i>Chaetoceros gracilis</i>	Daya Hambat terhadap Bakteri Uji (%)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>
A	39.8	37.78	100
B	40.17	34.92	64.67
C	15.18	40.08	100
D	32.14	17.14	66

Keterangan: *C. gracilis* yang dikultivasi pada (A) media NPSi panen 8 hari, (B) media NPSi panen 15 hari, (C) media NPSi+ NaHCO_3 panen 8 hari, (D) media NPSi+ NaHCO_3 panen 15 hari



Gambar 4. Indeks proteolitik bakteri patogen yang didasarkan pada diameter zona bening terhadap diameter koloni bakteri

Indeks proteolitik (IP) merupakan nilai yang menunjukkan kemampuan bakteri patogen memproduksi enzim protease secara ekstra seluler. Hasil penelitian memperoleh nilai IP dari *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Bacillus cereus* (*B. cereus*) dan *Escherichia coli* (*E. coli*) masing-masing adalah 2.33; 1.75 dan 1.5. Kemampuan memecah protein ini dapat terlihat dari terbentuknya zona bening di sekitar koloni.

Hasil uji aktivitas inhibitor protease menunjukkan bahwa ekstrak *C. gracilis* yang dikultivasi dalam media NPSi dan NPSi+NaHCO₃ memiliki aktivitas inhibitor protease terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* dan *Escherichia coli*. Daya hambat ekstrak terhadap bakteri uji tidak sama, karena setiap bakteri mempunyai sensitivitas terhadap komponen aktif yang berbeda. Secara umum ekstrak dari *C. gracilis* yang ditumbuhkan dalam media NPSi dan NPSi+NaHCO₃ tidak menunjukkan perbedaan aktivitas inhibitor protease yang terlalu besar. Hal ini sesuai dengan pola pertumbuhan *C. gracilis* dalam kedua media yang digunakan juga tidak menunjukkan perbedaan. Penambahan NaHCO₃ tidak terlalu mempengaruhi komponen aktif yang diduga berperan sebagai inhibitor protease.

Daya hambat ekstrak terhadap *S. Aureus* lebih kecil dibandingkan *E. coli*. Hal ini diduga *S. Aureus* menghasilkan aureocin yang merupakan protease yang stabil. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri Gram positif dan memiliki struktur kristal protein yang melindungi serin proteasenya. Antara substrat dengan sisi aktif protease membentuk ikatan hidrofobik yang lengkap membentuk rantai polar pada sisi aktifnya (Popowicz *et al.* 2006). Kestabilan, kristal pelindung protease dan ikatan enzim-substrat yang kuat diduga membuat ekstrak *C. gracilis* sulit untuk menghambat enzim proteasenya. Pengujian terhadap *B. cereus* menunjukkan bahwa ekstrak *C. gracilis* memiliki aktivitas inhibitor protease lebih kecil dibanding terhadap *E. coli*. Nasaimento dan Martins (2004) melaporkan bahwa enzim protease *Bacillus* bersifat stabil pada suhu tinggi 30-60°C dan aktivitas proteolitiknya dapat bekerja pada kisaran pH yang panjang yaitu 6 sampai 8.5. Kestabilan enzim protease *B. cereus* membuat aktivitasnya sulit dihambat oleh ekstrak.

Ekstrak *C. gracilis* dapat menghambat enzim protease *E. coli* dengan baik. Media pertumbuhan *C. gracilis* yang digunakan tidak mempengaruhi aktivitas inhibitor protease terhadap *E. coli*. Ekstrak *C. gracilis* yang ditumbuhkan dalam media NPSi dan media NPSi+NaHCO₃ dipanen pada umur 8 hari mampu menghambat enzim protease *E. coli* secara sempurna (100%). Hal ini diduga ekstrak *C. gracilis* mampu berikatan dengan substrat sehingga menghambat produksi enzim protease dan proses proteolisis. Aktivitas hambatan terhadap *E. coli* lebih besar dibandingkan *S. aureus* dan *B. cereus*. Aktifitas inhibitor protease dari setiap biota tidak sama. Hal ini berkaitan dengan komponen aktif yang dihasilkan. Nurhayati *et al.* (2004) melaporkan bahwa hasil penapisan ekstrak dari 10 jenis sponge memiliki daya hambat terhadap bakteri *P. aeruginosa* berkisar 2.03-27.74%.

Sensitifitas bakteri terhadap ekstrak dapat pula dipengaruhi oleh dinding selnya seperti adanya reseptor, pori dan kandungan lipid. Bakteri Gram positif lebih sensitif terhadap ekstrak non polar karena dinding selnya tersusun dari peptidoglikan, salah satunya adalah asam amino D-alanin yang bersifat hidrofobik. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan tambahan pada dinding selnya yang tersusun dari lipopolisakarida, porin matriks dan lipoprotein. Adanya selaput khusus berupa molekul protein memudahkan difusi senyawa hidrofilik. *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif diduga sensitifitas terhadap ekstrak etanol dari *C. gracilis* menyebabkan enzim proteasenya dapat dihambat dengan mudah.

Perbedaan sisi aktif, berat molekul dan kestabilan enzim protease bakteri menyebabkan masing-masing ekstrak *C. gracilis* memiliki daya hambat yang berbeda-beda terhadap enzim protease bakteri patogen.

Hasil pengujian ekstrak *C. gracilis* sebagai inhibitor protease menunjukkan bahwa ekstrak dari *C. gracilis* yang dipanen pada umur 8 hari memiliki aktivitas penghambatan yang cukup baik terhadap protease bakteri uji. *Chaetoceros gracilis* yang dipanen pada umur 8 hari berada pada akhir fase log, kandungan protein pada biomassa selnya cukup tinggi sehingga diduga pada fase ini protein yang disekresikan memiliki efek inhibitor protease. Penelitian Nurhayati *et al.* (2006) mengenai inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons menunjukkan bahwa selama waktu inkubasi inhibitor protease mencapai nilai maksimum, terjadi peningkatan konsentrasi protein sehingga diduga bahwa inhibitor protease adalah suatu protein.

Proses pembentukan senyawa aktif dalam tubuh mikroalga dipengaruhi oleh kondisi lingkungannya. Pada kultivasi *C. gracilis* di luar ruangan, baik intensitas cahaya maupun suhu kultivasi berubah-ubah. Meskipun intensitas cahaya dan suhu yang sampai masih dalam batas intensitas cahaya dan suhu pertumbuhan *C. gracilis*, namun perubahan intensitas cahaya dan suhu dari waktu ke waktu dapat menyebabkan kondisi yang kurang nyaman bagi *C. gracilis*. Berkaitan dengan hal ini Richmond (2004) menyatakan bahwa pada saat kondisi tidak nyaman atau mendekati stress, mikroalga melakukan respon fisiologis antara lain dengan memodifikasi genetik atau dengan mensintesis metabolit sekunder. *Chaetoceros gracilis* diduga merespon perubahan intensitas cahaya dan suhu dengan mensintesis senyawa metabolit diantaranya asam amino, alkaloid dan peptida yang diduga memiliki efek inhibitor protease. Kemampuan suatu inhibitor protease terhadap enzim protease dapat dipengaruhi oleh kesesuaian sisi aktif, protein penyusun, berat molekul enzim protease, dan mekanisme penghambatan yang terjadi (Yandri, 2008).

Aktivitas inhibitor protease dari *C. gracilis* berbeda dengan sponge. Nurhayati *et al.* (2004) melaporkan bahwa ekstrak sponge dengan pelarut akuades mempunyai potensi daya hambat terhadap *E. coli* dan *S. Aureus* berkisar antara 0.00-100.00%.

KESIMPULAN

Pertumbuhan mikroalga *Chaetoceros gracilis* yang dikultivasi dalam media NPSi tidak jauh berbeda dengan yang dikultivasi dalam media NPSi+NaHCO₃. Media NPSi dan NPSi+NaHCO₃ mempengaruhi kandungan protein dan lipid *C. gracilis*. Kandungan protein *C. gracilis* yang dikultivasi dalam media NPSi lebih besar dibanding dalam media NPSi+NaHCO₃, namun kadar lipidnya lebih rendah.

Eksktrak dari biomasa *C. gracilis* memiliki aktivitas penghambatan terhadap enzim protease bakteri patogen. Secara umum *C. gracilis* yang ditumbuhkan dalam media NPSi dan media NPSi+NaHCO₃ tidak menunjukkan perbedaan aktivitas inhibitor protease yang terlalu besar. Perbedaan media pertumbuhan *C. gracilis* yang digunakan tidak mempengaruhi

aktivitas inhibitor proteaseterhadap *E. coli*. Aktivitas inhibitor protease terhadap bakteri *E. coli* lebih besar dibanding terhadap bakteri *B. cereus* dan *S. aureus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini dibantu dari penelitian Hibah Bersaing yang didanai DIKTI 2009/2010 dengan Nomor 28/I3.24.4/SPK/BG-PD/2009.

DAFTAR PUSTAKA

- Elias JAL, Voltolina D, Ocana FE, Simental GG. 2005. Indoor and outdoor mass production of the diatom *Chaetoceros muelleri* in a Mexican commercial hatchery. *J Aqua Eng* 33: 181-191. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2005.01.001.
- Hui DY. 2003. HIV protease inhibitors and atherosclerosis. *J Clin Invest* 111:3 17-318. DOI: 10.1172/JCI17746.
- Iverson SJ, Lang SL, Cooper MH. 2001. Comparison of the bligh and dyer and folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipid* 36: 1283-1287. DOI: 10.1007/s11745-001-0843-0.
- Lehninger AL. 2005. Dasar-dasar Biokimia Jilid I. Suhartono MT, penerjemah. Penerbit Erlangga. Jakarta. Terjemahan dari Principles of Biochemistry, p. 382.
- Nasaimento WCA, Martins MLL. 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. *Brazilian J Microbiol* 35: 91-96. DOI: 10.1590/S1517-83822004000100015.
- Nurhayati T, Suptijah P, Suhartono MT, Febrian I. 2004. Penapisan inhibitor protease yang dihasilkan oleh sponge asal Kepulauan Seribu. *Bul Teknol Hasil Perikanan* 8: 45-58.
- Nurhayati Y, Suhartono MT, Nuraida L, Poerwanto SB. 2006. Karakterisasi awal inhibitor protease dari bakteri yang berasosiasi dengan spons asal Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Hayati* 13: 58-64.
- Nurhayati T, Salamah E, Tampubolon K, Aprilan A. 2011. Peranan inhibitor katepsin dari ikan patin (*Pangasius hypophthalmus*) untuk menghambat kemunduran mutu ikan bandeng (*Chanos chanos* Forskal). *J Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 17: 495-553.
- Popowicz GM, Dubin G, Niemczyk JS, Czarny A, Dubin A, Potempa J, Holak TA. 2006. Functional and structural characterization of Spl protease from *Staphylococcus aureus*. *J Mol Biol* 358: 270-279. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.01.098.
- Pratiwi AR, Syah D, Hardjito L, Panggabean LMG, Suhartono MT. 2009. Fatty acid synthesis by Indonesian marine diatom, *Chaetoceros gracilis*. *Hayati* 16: 151-156. DOI: 10.4308/hjb.16.4.151.
- Richmond A. 2004. Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycologi. Iowa State Press. Blackwell Publishing, p. 566.
- Saavedra MPS, Voltolina D. 2006. The growth rate biomass production and composition of *Chaetoceros* sp. grown with different light souch. *J Aqua Eng* 35: 161-165. DOI: 10.1016/j.aquaeng.2005.12.001.
- Setyaningsih I, Hardjito L, Monintja DR, Sondita MFA, Bintang M, Lailati N, Panggabean L. 2008. Ekstraksi senyawa antibakteri dari diatom *Chaetoceros gracilis* dengan berbagai metode. *J Biol Indo* 5: 23-33.
- Voltolina D, Saavedra MPS, Rodriguez LMT 2007. Outdoor mass microalgae production in bahia kino, Sonora, New Mexico. *J Aqua Eng* 38: 96-96.
- Yandri, Tati S, Dian H, Sutopo H. 2008. The chemical modification of protease enzyme isolated from locale bacteria isolate, *Bacillus subtilis* ITBCCB148 with cyanuric chloride-polyethylenglycol. *J Sci Res* 23: 177-186.