

Profil Kimia dan Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif *Nannochloropsis* sp. sebagai Senyawa Penghambat Bakteri Penyebab Gangguan Kesehatan Mulut

Chemical Profile and Antibacterial Activity of the Active Fractions of Nannochloropsis sp. as Inhibiting Compounds of Bacteria that Cause Oral Health Disorders

Ni Wayan Sri Agustini^{1*}, Dody Priadi², dan Raja Vin Atika²

¹ Pusat Riset Mikrobiologi Terapan, Badan Riset dan Inovasi Nasional,
Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong, Jawa Barat, 16911, Indonesia

² Pusat Riset Hortikultura dan Perkebunan, Badan Riset dan Inovasi Nasional,
Jl. Raya Bogor Km.46 Cibinong, Jawa Barat, 16911, Indonesia

³ Sekolah Tinggi Teknologi Farmasi, Bogor,

Jl. Kumbang no. 23 Bogor, Jawa Barat, 16128, Indonesia

*Korespondensi penulis : wayan_sa2002@yahoo.com

Diterima: 5 Juni 2021; Direvisi: 31 Agustus 2021; Disetujui: 7 Desember 2021

ABSTRAK

Salah satu penyebab masalah kesehatan mulut adalah bakteri. Mikroalga jenis *Nannochloropsis* sp. diketahui memiliki senyawa kimia yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri seperti asam lemak dan fenol. Studi ini bertujuan untuk mengetahui potensi senyawa yang terkandung dalam *Nannochloropsis* sp. yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang menyebabkan gangguan kesehatan mulut, dalam hal ini bau mulut dan plak gigi. Bakteri yang digunakan pada uji ini adalah *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Porphyromonas gingivalis*. Selanjutnya profil kimia fraksi aktifnya dianalisis menggunakan kromatografi gas spektrometri massa (KG-SM). Biomassa *Nannochloropsis* sp. dimaserasi secara berturut-turut menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol. Aktivitas antibakteri ekstrak diuji dengan metode difusi menggunakan kertas cakram. Selanjutnya, ekstrak etanol yang paling aktif difraksinasi menggunakan kolom silika G60 dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol. Hasil fraksinasi (fraksi A dan B) kemudian diuji aktivitas antibakterinya. Fraksi A diketahui lebih aktif dibanding fraksi B, dengan diameter zona hambat fraksi A 15,5 mm (terhadap *S. mutans*); 16,8 mm (*S. sanguinis*) dan 16,1 mm (*P. gingivalis*) pada konsentrasi ekstrak 10 mg/mL dan dikategorikan mempunyai respon hambatan pertumbuhan bakteri yang kuat. Hasil identifikasi fraksi A menggunakan KG-SM dibandingkan dengan spektra fragmentasi database WILEY 10N.14 dan diperoleh sepuluh senyawa dengan tingkat kemiripan $\geq 90\%$. Senyawa-senyawa tersebut diduga berperan dalam aktivitas antibakteri. Oleh karena itu, fraksi A dari ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. berpotensi sebagai bahan untuk formulasi obat kumur pencegah bau mulut dan plak gigi.

Kata Kunci : antibakteri, bau mulut, plak gigi, *Nannochloropsis* sp., KG-SM

ABSTRACT

One of the causes of oral health problems is bacteria contamination. The microalgae of *Nannochloropsis* sp., contains chemical compounds that can inhibit bacterial growth, such as fatty acids and phenols. The objective of the study is to determine the potential compounds of *Nannochloropsis* sp., which can inhibit the growth of bacteria that cause bad breath (halitosis) and dental plaque. The bacteria used in this test were *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Porphyromonas gingivalis*. Furthermore, chemical profiles of the active fractions were determined using a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The biomass of *Nannochloropsis* sp. was macerated successively using n-hexane, ethyl acetate, and ethanol as solvents. The extract was tested for its antibacterial activity by diffusion method using disc paper. The most active ethanol extract was fractionated using a silica G60 column with n-hexane, ethyl acetate, and ethanol. The results of the fractionation (A and B fractions) were tested for their antibacterial activity. The A fraction was more active than the B fraction with the inhibition zone diameters of the A fraction were 15.5 mm (against *S. mutans*), 16.8 mm (*S. sanguinis*), and 16.1 mm (*P. gingivalis*) at extract concentration of 10 mg/mL and categorized as a strong bacterial growth inhibition response. The A fraction was identified using GC-MS and compared with the fragmentation spectra based on the WILEY 10N.14 database. The identification obtained ten compounds with $\geq 90\%$ similarity. These compounds were thought to play a role in the antibacterial activity. Therefore, the A fraction of ethanol extract from *Nannochloropsis* sp. can potentially be used in mouthwash formulation to prevent halitosis and dental plaque.

Keywords: antibacteria, dental plaque, halitosis, *Nannochloropsis* sp., GC-MS

PENDAHULUAN

Bau mulut (halitosis) dan plak gigi merupakan masalah kesehatan mulut yang banyak terjadi di masyarakat. Bau mulut pada umumnya terjadi karena pembusukan sisa-sisa makanan oleh bakteri di dalam rongga mulut. Penyakit seperti gingivitis, periodontitis, dan karies gigi dapat menyebabkan adanya bau mulut yang kurang sedap (Lukas, 2012). Berbagai cara dapat dilakukan untuk mencegahnya, salah satunya menggunakan antiseptik obat kumur yang mampu mengurangi jumlah koloni bakteri patogen di rongga mulut.

Upaya untuk mengurangi dan mencegah bakteri penyebab bau mulut dan plak gigi antara lain dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri. Mikroorganisme perairan yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif dan memiliki kemampuan sebagai antibakteri antara lain mikroalga (Nolla-ardèvol et al., 2015). Mikroalga merupakan mikroorganisme berfotosintesis dari kelompok fitoplankton yang secara ekologis menopang kehidupan sebagian besar organisme perairan. Dalam kondisi pertumbuhan yang ekstrim, mikroalga mampu menghasilkan senyawa metabolit untuk mempertahankan hidupnya, diantaranya asam lemak, lipopeptida, sulfolipid, peptida siklik, terpenoid, sakarida, alkaloid, flavonoid, pigmen, makrolida, dan aminoglikosida, serta agen terapeutik seperti bialaphos dan asam klavulanat (Wang et al., 2017). Selain berpotensi sebagai antibakteri, senyawa metabolit sekunder ini juga berpotensi sebagai antioksidan, antiinflamasi, antijamur, dan antivirus (López & Soto, 2020; Shannon & Ghannam, 2016).

Mikroorganisme seperti mikroalga memiliki manfaat untuk dikembangkan sebagai penghasil senyawa antibakteri, salah satunya *Nannochloropsis* sp., mikroalga uniseluler berbentuk bulat yang berukuran 2–5 µm dan termasuk dalam kelas Eustigmatophyceae. Mikroalga ini mempunyai peranan yang penting pada siklus rantai makanan dan biasanya digunakan sebagai pakan ikan dan udang (Freire et al., 2016). Hasil penelitian sebelumnya menyatakan bahwa ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. mengandung berbagai senyawa fitokimia yang diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Fithriani et al., 2015). Selain itu, senyawa asam lemak dari biomasa *Nannochloropsis* sp. yang diekstraksi dengan sokletasi memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Agustini et al., 2014).

Potensi senyawa bioaktif dari *Nannochloropsis* sp. sebagai antibakteri penyebab bau mulut dan plak gigi masih sedikit yang dilaporkan. Penelitian

ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan daya hambat senyawa aktif yang terlarut dalam n-heksana, etil asetat, dan etanol dari *Nannochloropsis* sp. terhadap mikroorganisme yang menyebabkan gangguan kesehatan mulut, khususnya bau mulut dan plak gigi, serta mengamati profil kimia fraksi aktifnya.

BAHAN DAN METODE

Bahan

Pada penelitian ini digunakan mikroalga *Nannochloropsis* sp. yang berasal dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau, Jepara. Bakteri uji *Streptococcus mutans*, *S. sanguinis* 10556, dan *Porphyromonas gingivalis* 33277 berasal dari Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. Kultivasi mikroalga menggunakan bahan-bahan kimia yang diproduksi oleh Merck, yaitu Na₂EDTA, NaNO₃, H₃BO₃, Na₂HPO₄, MnCl₂·4H₂O, FeCl₃·6H₂O, ZnCl₂, CoCl₂·6H₂O, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, dan CuSO₄·5H₂O; pelarut berupa n-heksana (Merck), etil asetat (Merck), dan etanol (Merck). Bahan untuk uji antibakteri yang digunakan berupa yeast extract (Oxoid), pepton (Oxoid), agar (Difco), serta bahan untuk fraksinasi berupa lempeng silika GF₂₅₄ (Merck) dan silika gel 60 GF₂₅₄ (Merck).

Metode

Kultivasi, penetapan kepadatan sel, dan pemanenan biomasa mikroalga *Nannochloropsis* sp. (Kusmiati & Agustini, 2015)

Nannochloropsis sp. ditumbuhkan pada medium Conway yang telah dimodifikasi dan terdiri atas Na₂EDTA (45 mg/L), NaNO₃ (100 mg/L), H₃BO₃ (33,6 mg/L), Na₂HPO₄ (20 mg/L), MnCl₂·4H₂O (0,36 mg/L), dan FeCl₃·6H₂O (1,3 mg/L). Sementara itu, larutan mikronutrisi (1 mL/L) yang digunakan meliputi ZnCl₂ (2,1 g/L), CoCl₂·6H₂O (2 g/L), (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O (0,9 g/L), dan CuSO₄·5H₂O (2 g/L) (de Sousa et al., 2014). Penumbuhan mikroalga dilakukan dalam botol ukuran 2000 mL, pada pH 7,0 (netral), intensitas cahaya 2000 lux, dan kepadatan awal sel 0,5 (*Optical Density* 680 nm).

Konsentrasi *Nannochloropsis* sp. diukur kerapatan selnya menggunakan metoda turbidimetri. Pengukuran dilakukan selama 12 hari masa kultivasi dengan 3 kali ulangan. Hasil pengukuran yang berupa nilai *optical density* menggambarkan tahap pertumbuhan *Nannochloropsis* sp. (Kusmiati &

Agustini, 2007). Pemanenan dilakukan saat fase stasioner dengan disentrifuse pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Pengerinan biomassa basah yang diperoleh dilakukan pada suhu 50°C. Biomassa kering kemudian ditumbuk menggunakan mortar dan alu hingga berbentuk serbuk.

Ekstraksi mikroalga *Nannochloropsis* sp. (Agustini & Kusmiati, 2013)

Biomassa kering *Nannochloropsis* sp. yang telah dihaluskan kemudian dimaserasi berturut-turut dengan pelarut non polar (n-heksana), semi polar (etil asetat), dan polar (etanol). Proses ekstraksi dilakukan pada 50 g biomassa dengan pelarut n-heksana (10 mL/g). Proses maserasi menggunakan *shaker* pada kecepatan 150 rpm. Biomassa dan supernatan dipisahkan dengan disentrifuse (Hitachi Himac CL GEL) selama 5 menit pada kecepatan 5000 rpm, supernatannya diambil, sedangkan biomassa diekstrak kembali dengan n-heksana sampai berwarna pucat. Biomassa kemudian dikeringkan dalam oven (Heraeus) pada suhu 50°C untuk menghilangkan sisa n-heksana. Selanjutnya dengan cara yang sama, biomassa diekstraksi menggunakan pelarut semi polar (etil asetat) dan polar (etanol 96%). Masing-masing supernatan dikumpulkan, kemudian dipekatkan dengan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* (Janke & Kunkel RV 05-ST).

Pengujian aktivitas antibakteri (Agustini & Kusmiati, 2013)

Kemampuan daya hambat ekstrak *Nannochloropsis* sp. terhadap bakteri diuji berdasarkan metode difusi menggunakan dua lapisan agar. Komposisi lapisan padat adalah 0,3% ekstrak ragi, 0,5% pepton, dan 1,5% bacto agar (bagian bawah), sedangkan komposisi lapisan lunak pada bagian atas yaitu 0,3% ekstrak ragi, 0,5% pepton, dan 0,75% bacto agar. Suspensi bakteri yang diinokulasikan kemudian diukur pada spektrofotometri UV-Vis (Hitachi V-3900 H) dengan nilai transmitansi 25% pada λ 580 nm dan nilai *optical density* 0,5. Masing-masing agar lunak yang sudah steril ditambahkan bakteri uji (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, dan *Porphyromonas gingivalis*). Setelah membeku, di atasnya diletakkan kertas cakram dan diteteskan sebanyak 15 μ L ekstrak uji.

Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 20 mg/L, sedangkan kontrol negatif menggunakan DMSO (*dimethyl sulfoxide*) dengan konsentrasi 5%. Semua sampel diinkubasi pada suhu 37°C dan diameter hambat diukur dengan

jangka sorong. Pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan dalam tiga ulangan.

Skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga *Nannochloropsis* sp. (Harbone, 1987)

Penentuan senyawa metabolit sekunder dilakukan secara kualitatif. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak etanol yang mempunyai aktivitas antibakteri paling tinggi. Senyawa yang dianalisis meliputi alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid, dan steroid. Metode analisis yang digunakan berdasarkan Harborne (1987).

Fraksinasi ekstrak etanol dengan kromatografi kolom (Agustini et al., 2017)

Fraksinasi ekstrak etanol dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan panjang kolom 15 cm dan diameter 1,5 cm. Sebanyak 330 ml campuran etanol: etil asetat: n-heksan (1:2:7) digunakan sebagai fase gerak. Fraksinasi dilakukan secara isokratik dengan fase diam silika gel G60. Sebanyak 100 mg ekstrak etanol dihomogenkan dengan *celite* 545 hingga tercampur sempurna, kemudian dimasukkan ke dalam kolom fraksinasi. Setiap fraksi ditampung masing-masing sebanyak 5 mL dalam botol. Fraksi dianalisis menggunakan kromatografi lapis tipis, bercak yang muncul diamati menggunakan lampu UV. Fraksi yang mempunyai nilai R_f yang sama kemudian digabungkan.

Identifikasi senyawa antibakteri dengan KG-SM (Agustini, et al. 2014)

Fraksi dari kolom kromatografi yang memiliki aktivitas antibakteri terbesar kemudian diidentifikasi profil senyawanya dengan KG-SM (*Agilent Technologies 5973 N Gas Chromatograph; 5873 Mass Selective Detector and Chemstation Data System*). Kondisi yang digunakan adalah kolom DB 5 dengan panjang kapilar 60 m x 0,25 μ m; volume injeksi 2 μ L, suhu AUX 290°C, suhu program 70°C (15 menit) - 290°C (25 menit), dan mode alir gas konstan dengan gas pembawa Helium. Identifikasi senyawa dilakukan dengan membandingkan spektra dengan database WILEY 10N.14 pada tingkat kemiripan \geq 90%.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.

Pada studi ini, *Nannochloropsis* sp. ditumbuhkan dalam medium Conway yang mengandung nutrisi makro dan mikro serta vitamin dan diamati

selama 12 hari masa kultivasi (Gambar 1). Fase eksponensial dimulai pada hari ke-1 sampai 8 yang ditandai dengan semakin meningkatnya nilai serapan (optical density) pada spektrofotometri dengan λ 680 nm, dari stok kultur *Nannochloropsis* sp 107 sel/ml. Nilai serapan awal sel sebesar 0,5 dan mencapai nilai serapan tertinggi setelah 9 hari kultivasi, yaitu 2,5. Peningkatan nilai serapan sel ini karena ketersediaan nutrisi dan faktor lingkungan terpenuhi sehingga mendukung pertumbuhan mikroalga (Krzeminska et al., 2014). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa fase eksponensial *Nannochloropsis* sp. dengan medium teknis komersial yang terdiri atas urea, amonium sulfat, trinitrium fosfat, FeCl_3 , Na_2EDTA , NaCl , dan pupuk Gandasil D terjadi pada hari ke-4 sampai 12 (Agustini et al., 2014).

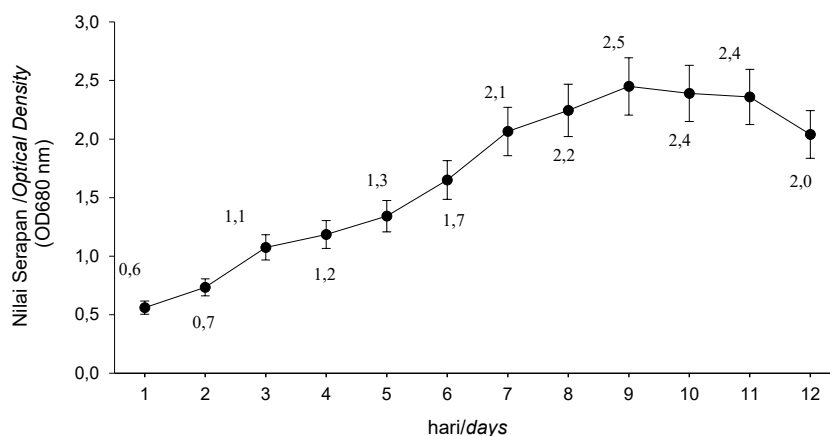
Fase stasioner berlangsung pada hari ke-10 dan 11, yang ditandai dengan tidak adanya penambahan pertumbuhan. Menurut Carlsson et al. (2007), fase stasioner terjadi karena berkurangnya ketersediaan nutrisi serta dipengaruhi faktor lingkungan seperti terjadinya *self shading* yang mengurangi penetrasi cahaya ke dalam sel. Keterbatasan cahaya merupakan faktor lingkungan yang mengakibatkan sel mengalami fotoinhibisi dan akhirnya stress (Maltsev et al., 2021). Dalam kondisi ekstrim, sel mengalami perubahan komposisi biokimia untuk mempertahankan hidupnya. Senyawa yang terbentuk pada kondisi ini antara lain asam lemak, glikolipid, fenolat, terpen, diketon, alkaloid indol, serta pigmen karotenoid (D'Alessandro & Antonio, 2016; Ordog et al., 2004). Senyawa metabolit sekunder diketahui berpotensi dalam pengembangan obat-obatan baru, seperti antibiotik, antiinflamasi, dan

antikanker (Little et al., 2021). Pada penelitian ini, proses pemanenan biomassa *Nannochloropsis* sp. dilakukan pada saat fase stasioner agar diperoleh senyawa metabolit sekunder yang optimal.

Ekstraksi Mikroalga *Nannochloropsis* sp.

Ekstraksi senyawa aktif mikroalga *Nannochloropsis* sp. dilakukan dengan metode maserasi. Metode ini dipilih karena dapat memisahkan senyawa aktifnya tanpa pemanasan, sehingga kerusakan senyawa target yang tidak tahan panas dapat dihindari (Heinrich et al., 2004). Proses perendaman mengakibatkan pelarut secara difusi masuk ke dalam sel yang menyebabkan materi bioaktif yang terkandung dalam biomassa akan terlarut. Penggunaan pelarut yang berbeda kepolaran bertujuan untuk dapat melarutkan semua senyawa bioaktif di dalam sel *Nannochloropsis* sp.

Berat ekstrak dan rendemen ekstrak *Nannochloropsis* sp. pada berbagai pelarut dijelaskan pada Tabel 1. Pada Tabel ini terlihat perbedaan jenis pelarut menghasilkan perbedaan rendemen ekstrak. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% (polar) menghasilkan rendemen paling tinggi dibanding ekstrak yang lain, yaitu sebesar 1,62 g dengan rendemen ekstrak sebesar 3,24%. Hal ini mengindikasikan bahwa komponen dari biomassa *Nannochloropsis* sp. lebih banyak senyawa yang bersifat lebih polar. Hasil penelitian yang sama terkait dengan pelarut etanol ditunjukkan pada jenis *P. cruentum* yang mendapatkan rendemen tertinggi dibandingkan dengan pelarut lain, n-heksana dan etil asetat (Juliana et al., 2020). Etanol memiliki dua tingkat kepolaran, sehingga mampu menarik senyawa-senyawa yang berbeda kepolarannya (Harborne, 1987).



Gambar 1. Kurva pertumbuhan *Nannochloropsis* sp.

Figure 1. The growth of *Nannochloropsis* sp.

Tabel 1. Bobot ekstrak, rendemen, dan warna ekstrak *Nannochloropsis* sp. yang diekstraksi dengan pelarut n-heksana, etil asetat, dan etanol

Table 1. The amount of extract, yield, and color of *Nannochloropsis* sp. extract using n-hexane, ethyl acetate, and ethanol

No	Pelarut/Solvent	Bobot Biomassa/ Weight of Biomass (g)	Bobot Ekstrak/ Weight of Extract (g)	Rendemen/ Yield (%)	Warna/ Color
1.	n-heksana/n-hexane		0.73	1.46	Hijau muda/ Light green
2.	Etil asetat/Ethyl acetate	50	1.02	2.04	Hijau kecoklatan/ Brownish green
3.	Etanol/Ethanol 96%		1.62	3.24	Hijau kecoklatan/ Brownish green

Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa kemampuan daya hambat ekstrak *Nannochloropsis* sp. beragam (Tabel 2). Hasil ini menandakan bahwa kekuatan daya hambat tergantung pada komponen senyawa aktif dan jumlah senyawa yang terekstrak. Ekstrak etanol dapat menghambat pertumbuhan semua bakteri uji (*S. mutans*, *P. gingivalis*, dan *S. sanguinis*). Ekstrak etil asetat hanya dapat membentuk zona hambat pada *S. mutans* dan *P. gingivalis*, namun tidak membentuk zona hambat pada *S. Sanguinis*. Sementara itu, ekstrak n-heksana tidak menghasilkan zona bening pada ketiga bakteri uji. Pelarut n-heksana bersifat non-polar, sehingga senyawa aktif yang terekstrak juga bersifat tidak larut air. Media pertumbuhan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah media agar yang memiliki sifat larut dalam air (Pranoto et.al., 2012). Hal ini yang dapat menyebabkan ekstrak dari n-heksana tidak dapat berdifusi, sehingga tidak membentuk zona hambat. Selain itu, tidak terbentuknya zona hambat pada ekstrak n-heksana juga diduga karena senyawa aktif yang berpotensi sebagai antibakteri yang terekstrak oleh pelarut ini terlalu rendah. Hal ini dapat dijelaskan dengan perlakuan saat uji konsentrasi yang digunakan pada semua ekstrak menunjukkan hasil yang sama.

Merujuk pada Tabel 2, hasil pengukuran zona hambat ekstrak etanol terhadap bakteri gram positif (*S. mutans* dan *S. sanguinis*) lebih besar daripada bakteri gram negatif (*P. gingivalis*). Pada pengujian konsentrasi 30 mg/mL, ekstrak etanol mempunyai zona hambat 24,3 mm (*S. mutans*) dan 21,9 mm (*S. sanguinis*), sedangkan pada *P. gingivalis* hanya 15,1 mm. Menurut Gupta (2011), bakteri gram positif adalah monoderm yang

dikelilingi oleh membran lipid sitoplasma dan tidak memiliki membran sel luar. Tidak adanya membran luar ini membuat bakteri rentan terhadap efek AMPs (*Antimicrobial Peptides*) dari ekstrak yang mengandung antibakteri. Membran sel luar yang terdapat pada bakteri gram negatif diperkirakan memainkan peran penting sebagai mekanisme perlindungan terhadap agen antimikroba dan tekanan seleksi antibiotik. Disamping itu, dinding sel gram negatif adalah *multilayer* dengan 1-2 lapis peptidoglikan, dinding selnya mengandung lipoprotein yang sulit dan lambat ditembus oleh antibiotik (Thodar, 2018).

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik kloramfenikol, yang bersifat bakteristatik dan memiliki spektrum luas. Pada konsentrasi 0,02 mg/mL, kloramfenikol membentuk zona hambat antara 10-16 mm. Kontrol negatif pada studi ini adalah *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 5% yang digunakan sebagai pelarut untuk ketiga jenis ekstrak. DMSO tidak menunjukkan zona hambat terhadap ketiga bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan dikarenakan pelarut yang dipakai, melainkan respon dari senyawa aktif dari *Nannochloropsis* sp. yang bersifat sebagai antibakteri

Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Mikroalga *Nannochloropsis* sp.

Berdasarkan uji aktivitas antibakteri, diketahui bahwa ekstrak etanol merupakan ekstrak teraktif yang ditunjukkan adanya zona bening pada pertumbuhan bakteri *S. mutans*, *S. sanguinis*, dan *P. gingivalis*. Skrining fitokimia secara kualitatif terhadap ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. menunjukkan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol adalah flavonoid, steroid,

Tabel 2. Aktivitas antibakteri ekstrak n-heksana, etil asetat, dan etanol *Nannochloropsis* sp. terhadap *S. mutans*, *P. gingivalis*, dan *S. sanguinis*Table 2. Antibacterial activity of n-hexane, ethyl acetate, and ethanol *Nannochloropsis* sp. extracts against *S. mutans*, *P. gingivalis*, and *S. sanguinis*

Senyawa/Compound	Konsentrasi/ Concentration (mg/mL)	Rata-rata Diameter Zona Hambat/ Diameter Average of Inhibition Zone (mm)		
		<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>P. gingivalis</i>
Ekstrak n-heksana/n-hexane extract	10.00	-	-	-
	20.00	-	-	-
	30.00	-	-	-
Kloramfenikol (kontrol positif)/ <i>Chloramphenicol</i> (positive control)	0.02	11.5 ± 0.15	16.1 ± 0.10	12.2 ± 0.10
DMSO (kontrol negatif)/ <i>DMSO</i> (negative control)	50.00	-	-	-
Ekstrak etil asetat/ <i>Ethyl acetate</i> extract	10.00	10.1 ± 1.13	-	9.2 ± 0.91
	20.00	13.1 ± 1.48	-	12.0 ± 1.41
	30.00	15.1 ± 0.07	-	13.1 ± 2.05
Kloramfenikol (kontrol positif)/ <i>Chloramphenicol</i> (positive control)	0.02	11.2 ± 0.10	20.1 ± 0.15	12.1 ± 0.10
DMSO (kontrol negatif)/ <i>DMSO</i> (negative control)	50.00	-	-	-
Ekstrak Etanol/ <i>Ethanol</i> 96% extract	10.00	18.1 ± 1.23	10.3 ± 0.93	8.2 ± 1.25
	20.00	21.5 ± 1.13	14.1 ± 1.34	12.1 ± 1.48
	30.00	24.3 ± 1.93	21.9 ± 2.26	15.1 ± 1.34
Kloramfenikol (kontrol positif)/ <i>Chloramphenicol</i> (positive control)	0.02	12.2 ± 0.15	13.2 ± 0.02	10.1 ± 0.03
DMSO (kontrol negatif)/ <i>DMSO</i> (negative control)	50.00	-	-	-

Keterangan/Note: Diameter kertas cakram : 6 mm, tanda (-) menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat/Diameter of paper disc 6 mm, the sign (-) indicates no inhibition zone is was formed

dan triterpenoid (Tabel 3). Berbeda dengan hasil uji yang dilakukan oleh Fithriani (2015), biomassa *Nannochloropsis* sp. memiliki senyawa alkaloid, namun tidak mengandung senyawa triterpenoid. Perbedaan ini dimungkinkan karena faktor nutrisi dan lingkungan saat mengkultivasi mikroalga.

Menurut Xie et al (2014), flavonoid dapat berperan sebagai penghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak membran sel, menghambat berbagai sintase yang melibatkan sintesis asam nukleat, rantai pernapasan bakteri, atau sintesis selubung sel serta merusak membran dan dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan kematian sel. Steroid dan triterpenoid juga memiliki kemampuan sebagai senyawa penghambat pertumbuhan bakteri berkaitan dengan komposisi kimianya. Terpenoid

termasuk senyawa penghambat pertumbuhan bakteri karena sifatnya yang mudah larut dalam lipid sehingga dapat menembus dinding sel yang akhirnya dapat menyebabkan kematian sel bakteri (Wardhani & Supartono, 2015).

Fraksinasi Ekstrak Etanol *Nannochloropsis* sp.

Hasil pemisahan ekstrak etanol yang dilakukan dengan kromatografi kolom menghasilkan 66 fraksi. Berdasarkan hasil analisis KLT terhadap fraksi-fraksi tersebut kemudian dilakukan penyederhanaan fraksi dan diperoleh 2 fraksi, yaitu fraksi A dan B. Fraksi A merupakan gabungan fraksi nomor 1 dan 2 yang memiliki pola kromatogram yang sama dengan nilai Rf 0.58, sedangkan fraksi B adalah gabungan fraksi

Tabel 3. Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp.
 Table 3. Phytochemical screening of *Nannochloropsis* sp. ethanol extract

No.	Uji/Test	Ekstrak Etanol/ Extract of Ethanol
1.	Alkaloid (pereaksi Mayer)/ <i>Alkaloid (Mayer reagent)</i>	-
	Alkaloid (pereaksi Dragendorff)/ <i>Alkaloid (Dragendorff reagent)</i>	-
	Alkaloid (pereaksi Wagner)/ <i>Alkaloid (Wagner reagent)</i>	-
2.	Flavonoid/ <i>Flavonoid</i>	+
3.	Saponin/ <i>Saponin</i>	-
4.	Tanin/ <i>Tannin</i>	-
5.	Steroid/ <i>Steroid</i>	+
6.	Triterpenoid/ <i>Triterpenoid</i>	+

nomor 3-66 yang memiliki nilai Rf 0.7 (Tabel 4 dan Gambar 2).

Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi

Fraksi A dan B diuji aktivitas antibakterinya pada konsentrasi 10 mg/mL. Hasil uji aktivitas antibakteri memperlihatkan bahwa kedua fraksi memiliki zona hambat terhadap ketiga bakteri uji (*S. mutans*, *S. sanguinis*, dan *P. gingivalis*). Zona hambat pada fraksi A lebih besar dibandingkan zona hambat pada fraksi B (Tabel 5 dan Gambar 3). Berdasarkan data tersebut, maka identifikasi senyawa menggunakan KG-SM hanya dilakukan terhadap fraksi A.

Merujuk data yang tertera pada Tabel 5, fraksi A pada pengujian konsentrasi 10 mg/mL mempunyai aktivitas antibakteri yang kuat. Menurut Oktarina et al. (2017), respon hambatan pertumbuhan bakteri yang memiliki zona bening lebih dari 10-20 mm adalah kuat. Namun demikian, apabila dibandingkan dengan kontrol positif kloramfenikol pada konsentrasi 0,02 mg/mL, fraksi A mempunyai kekuatan kurang lebih 500 kali lebih rendah.

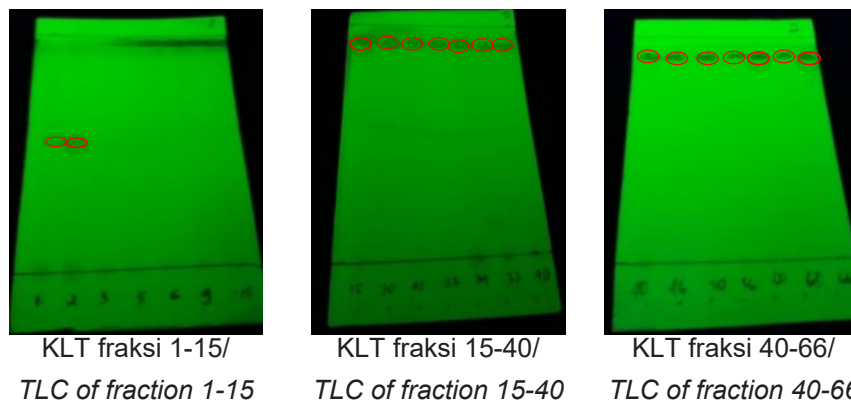
Profil Senyawa Antibakteri *Nannochloropsis* sp.

Identifikasi senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dilakukan terhadap fraksi A yang merupakan fraksi teraktif untuk menghambat pertumbuhan ketiga jenis bakteri tersebut. Analisis menggunakan KG-SM menunjukkan fraksi A dari ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. menghasilkan beberapa puncak kromatogram yang dominan (Gambar 4). Hal ini menunjukkan walaupun merupakan gabungan dari beberapa fraksi yang mempunyai Rf yang sama, fraksi A masih merupakan campuran dari beberapa senyawa.

Berdasarkan hasil spektra fragmentasi dari fraksi A terhadap *database* WILEY 10N.14, teridentifikasi 10 senyawa yang memiliki tingkat kemiripan sekurang-kurangnya 90%. Senyawa-senyawa tersebut adalah *6,10,14-trimethylpentadecan-2-one* (1,21%) yang termasuk golongan aseton, *7,10-hexadecadienoic acid methyl ester* (8,94%), *11-hexadecanoic acid methyl ester* (2,72 %), *hexadecenoic acid methyl ester* (22,65%), *9,12-octadecadienoic acid methyl ester*

Tabel 4. Fraksinasi ekstrak etanol dengan kromatografi kolom
 Table 4. Fractionation of ethanol extract by column chromatography

No.	Fraksi/Fraction	Nilai Rf/Rf Value	Keterangan/Note
1.	A	0.58	Fraksi 1-2/ <i>Fraction 1-2</i>
2.	B	0.70	Fraksi 3-66/ <i>Fraction 3-66</i>



Gambar 2. Kromatografi lapis tipis (KLT) fraksi ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp

Figure 2. The thin layer chromatography (TLC) of *Nannochloropsis* sp ethanol extract fraction

(21,74%), 9,12,15-octadecatrienoic acid methyl ester (7,53%), methyl 18-methyl nonadecanoate (2,82 %), bis (2- ethylhexyl) phthalate (11,33%) yang termasuk golongan asam lemak, serta neophytadiene (0,94%) dan phytol (14,48%) yang termasuk golongan diterpen (Tabel 6). Walaupun mampu mengidentifikasi 10 senyawa yang mirip dari fraksi A, analisis dengan KG-SM mempunyai beberapa kekurangan, diantaranya terbatas untuk senyawa-senyawa yang bersifat volatil, sedangkan senyawa-senyawa yang non-volatil akan sulit teridentifikasi.

Neophytadiene dan phytol termasuk diterpen yang diketahui memiliki potensi sebagai senyawa antimikroba (Makkawi et al., 2017). Selain sebagai antibakteri, neophytadiene juga berpotensi sebagai senyawa analgesik, antipiretik, anti-inflamasi, dan antioksidan yang baik (Raman et al., 2012). Demikian pula halnya dengan senyawa phytol, selain sebagai antibakteri juga berpotensi sebagai antioksidan dan antikanker (Wei et al., 2011;

Song & Cho, 2015). Mekanisme kerja senyawa phytol sebagai antibakteri dengan mendenaturasi protein dan merusak membran sel. Penghambatan perkembangan sel diakibatkan oleh perubahan permeabilitas membran sitoplasma yang mengganggu mekanisme pengangkutan ion-ion organik ke dalam sel dan dapat menyebabkan matinya sel (Islam et al., 2018).

Senyawa 6,10,14-trimethylpentadecan-2-one merupakan senyawa yang termasuk kelompok aseton. Menurut Syeda dan Riazunnisa (2020), senyawa diaseton yang teridentifikasi dalam ekstrak methanol daun *Catharanthus roseus* berpotensi sebagai antibakteri. Selain itu, dilaporkan oleh Tanih dan Roland (2013), ekstrak aseton kulit batang *Sclerocarya birrea* yang mengandung senyawa diaseton memiliki efek antiproliferatif.

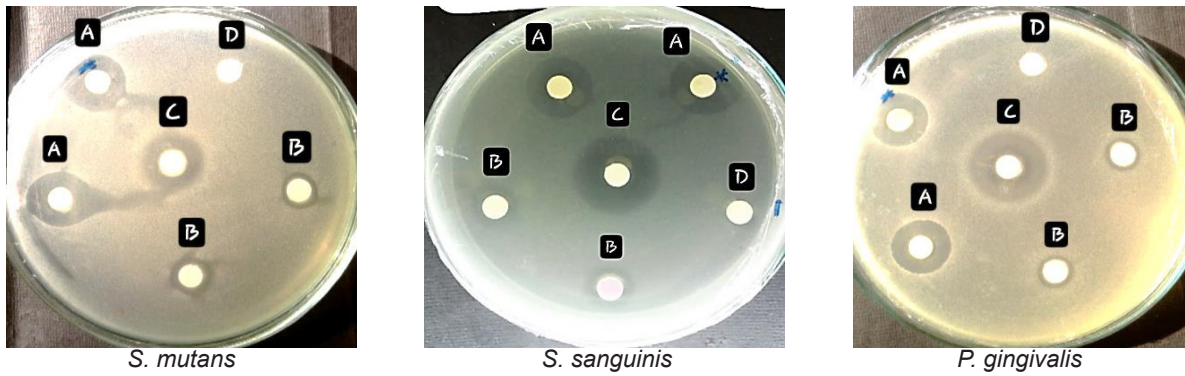
Senyawa 7,10-hexadecadienoic acid methyl ester; 11-hexadecanoic methyl ester, hexadecanoic acid methyl ester; 9,12,15-octadecatrienoic acid

Tabel 5. Diameter zona hambat fraksi A dan B terhadap *S. mutans*, *P. gingivalis* dan *S. sanguinis*

Table 5. Inhibition zones of A and B fractions against *S. mutans*, *P. gingivalis* and *S. sanguinis*

Senyawa/Compound	Zona Hambat/Inhibition Zone (mm)		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>P. gingivalis</i>
Fraksi A/Fraction A (10 mg/mL)	15.50 ± 1.41	16.80 ± 0.60	16.10 ± 0.49
Fraksi B/Fraction B (10 mg/mL)	9.40 ± 1.30	9.70 ± 0.40	8.40 ± 0.42
Kloramfenikol (kontrol positif)/Chloramphenicol (positive control) (20 mg/mL)	12.30	13.30	10.60
DMSO (kontrol negatif)/DMSO (negative control)	-	-	-

Keterangan/Note: Diameter kertas cakram 6 mm, tanda (-) menunjukkan tidak terbentuknya zona hambat/Diameter of paper disc 6 mm, the sign (-) indicates no inhibition zone was formed



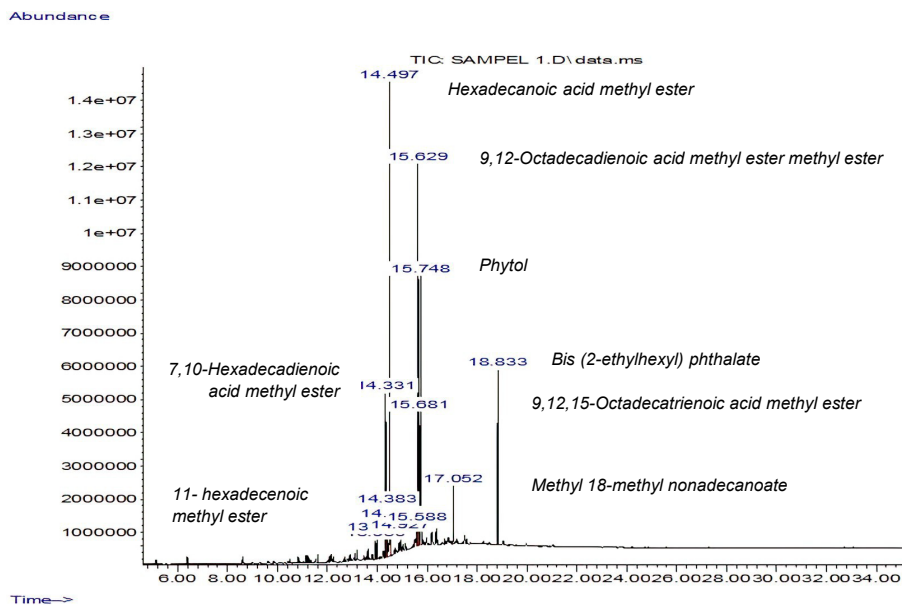
Keterangan/Note : A = fraksi A; B = fraksi B; C = Kontrol positif ; D = kontrol negatif/A = fraction A; B = fraction B; C = positive control ; D = negative control

Gambar 3. Aktivitas antibakteri fraksi A dan B terhadap bakteri *S. mutans*, *S. sanguinis*, dan *P. gingivalis*
 Figure 3. Antibacterial activity of A and B fractions against *S. mutans*, *S. sanguinis*, and *P. gingivalis*

methyl ester; 9,12-octadecatrienoic acid methyl ester; methyl 18-methyl nonadecanoate dan bis(2-ethylhexyl) phthalate termasuk golongan asam lemak yang berpotensi sebagai antibakteri. Lebih lanjut, target utama mekanisme kerja asam lemak sebagai antibakteri adalah meningkatkan permeabilitas membran dan lisis sel, mengganggu rantai transpor elektron dan pelepasan fosforilasi oksidatif, serta menghambat aktivitas enzimatis membran sel dan penurunan serapan hara (Yoon et al., 2018). Beberapa senyawa volatil yang diidentifikasi dalam ekstrak etanol dari mikroalga *Synechocystis* sp. dan makroalga *Himantalia elongata* terutama dari golongan asam lemak,

alkana, fenol, dan neophytadiene dan dinyatakan memiliki aktivitas antimikroba (Plaza, et al., 2010). Studi lainnya menyatakan bahwa mikroalga *Isochrysis galbana*, *Scenedesmus* sp., dan *Chlorella* mampu menghasilkan senyawa antimikroba, baik dalam skala laboratorium maupun industri. Senyawa-senyawa tersebut termasuk golongan asam lemak metil ester (Alsenani et al., 2020).

Berdasarkan hasil identifikasi dengan KG-SM, fraksi A ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. mengandung senyawa golongan aseton, diterpen, dan asam lemak yang diduga berperan sebagai penghambat pertumbuhan *S. mutans*, *S. sanguinis*,



Gambar 4. Kromatogram hasil kromatografi gas fraksi A ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp.
 Figure 4. GC Chromatogram of A fraction *Nannochloropsis* sp. ethanol extract

Tabel 6. Identifikasi senyawa dari fraksi A ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. menggunakan KG-SM
 Table 6. A fraction compounds identification of *Nannochloropsis* sp. ethanol extract using GC-MS

No	Waktu Retensi/ Retention Time	Senyawa/ Compounds	Indeks Kemiripan/ Similarity Index (%)	Rumus Molekul/ Molecular Formula	Area/Area (%)
1.	13.930	<i>Neophytadiene</i>	99	C ₂₀ H ₃₈	0.94
2.	13.980	<i>6,10,14-trimethylpentadecan-2-one</i>	97	C ₁₈ H ₃₆ O	1.21
3.	14.331	<i>7,10-Hexadecadienoic acid methyl ester</i>	99	C ₁₇ H ₃₀ O ₂	8.94
4.	14.383	<i>11-hexadecenoic acid methyl ester</i>	94	C ₁₇ H ₃₂ O ₂	2.72
5.	14.497	<i>Hexadecanoic acid methyl ester</i>	99	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	22.65
6.	15.629	<i>9,12-Octadecadienoic acid methyl ester</i>	99	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	21.74
7.	15.681	<i>9,12,15-Octadecatrienoic acid methyl ester</i>	99	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	7.53
8.	15.748	<i>Phytol</i>	99	C ₂₀ H ₄₀ O	14.48
9.	17.052	<i>Methyl 18-methyl nonadecanoate</i>	99	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	2.82
10.	18.833	<i>Bis (2-ethylhexyl) phthalate</i>	99	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	11.33

dan *P. gingivalis*. Ketiga bakteri tersebut diketahui sebagai mikroorganisme penyebab penyakit pada rongga mulut dan plak gigi. Oleh karena itu, fraksi A tersebut berpotensi sebagai sumber senyawa antibakteri alami untuk formulasi obat kumur alternatif, pencegah bau mulut dan plak gigi.

KESIMPULAN

Fraksi A dari ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. memiliki aktivitas antibakteri pada bakteri *S. mutans*, *S. sanguinis*, dan *P. gingivalis* penyebab bau mulut dan plak gigi. Hasil identifikasi fraksi A diketahui terdapat sepuluh senyawa dengan sifat antibakteri, yaitu 7,10-hexadecadienoic acid methyl ester (8,94%), 11-hexadecanoic acid methyl ester (2,72%), hexadecanoic acid methyl ester (22,65%), 9,12-octadecadienoic acid methyl ester (21,74 %), 9,12,15-octadecatrienoic acid methyl ester (7,53%), methyl 18-methyl nonadecanoate (2,82), bis(2-ethylhexyl)phthalate (11,33%), neophytadiene (0,94%), phytol (14,48%) dan 6,10,14-trimethyl pentadecan-2-one (1,21%). Dengan melihat potensi fraksi A dari ekstrak etanol *Nannochloropsis* sp. dalam menghambat bakteri penyebab bau mulut dan plak gigi, fraksi tersebut berpotensi dijadikan sebagai bahan formulasi obat kumur pencegah bau mulut dan plak gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustini, N. W. S., Afriastini, M., & Maulida, Y. (2014). Potensi asam lemak dari mikroalga *Nannochloropsis* sp. sebagai antioksidan dan antibakteri. *Proceeding Biology Education Conference*, 11(1), 149-155.
- Alsenani F., Tupally K. R., Chua E. t., Atanahy E., Alsufyani H., Parekh H. S. & Schenk P. M. (2020). Evaluation of microalgae and cyanobacteria as potential sources of antimicrobial compounds. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28, 1834-1841. doi: 10.1016/j.jsps.2020.11.010
- Carlsson, A. S., Van beilen, J. B., Moller, R., & Clayton, D. (2007). *Micro and Macro Algae: Utility for Industrial Applications*, Bowles, D. (ed.), Cpl Press, Newbury, UK.
- D'Alessandro, E. B., & Antoniosi Filho, N. R. (2016). Concepts and studies on lipid and pigments of microalgae: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 58, 832-841. doi: 10.1016/j.rser.2015.12.162
- de Sousa L. L. da Hora D. S., Sales E. A., & Perelo LW. (2014). Cultivation of *Nannochloropsis* sp. in brackish groundwater supplemented with municipal wastewater as a nutrient source. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 57(2), 171-177. doi : 10.1590/S1516-89132014000200003
- Fithriani, D., Amini, S., Melanie, S., & Susilowati, R. (2015). Uji fitokimia, kandungan total fenol dan aktivitas antioksidan mikroalga *Spirulina* sp., *Chlorella*

- sp., dan *Nannochloropsis* sp. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*, 10(2), 101-109. doi: 10.15578/jpbkp.v10i2.222
- Freire, I., Cortina-Burgueño, A., Grille, P., Arizcun Arizcun, M., Abellán, E., Segura, M., Federico W., & Otero, A. (2016). *Nannochloropsis limnetica*: A freshwater microalga for marine aquaculture. *Aquaculture*, 459, 124–130. doi: 10.1016/j.aquaculture.2016.03.015
- Fogg, G.E. and Thake, B. (1987) *Algae Cultures and Phytoplankton Ecology*. 3rd Edition, The University of Winsconsins Press, Ltd., London.
- Gupta, R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(2), 171-182. doi : 10.1007/s10482-011-9616-8
- Harborne, J. B. (1987). *Metode fitokimia*. Terjemahan dari Phytochemical Methods oleh Kosasih Padmawinata & Iwang Sudiro. Bandung: Penerbit ITB. Hlm: 27
- Heinrich, M., Barnes, J., Prieto-Garcia, J., Gibbons, S., & Williamson, E.. (2017). Fundamental of pharmacognosy and phytotherapy (3rd) . *Hungary: Elsevier*, 414-41
- Islam, M. T., Ali, E. S., Uddin, S. J., Shaw, S., Islam, M. A., Ahmed, M. I., & Atanasov, A. G. (2018). Phytol: A review of biomedical activities. *Food and chemical toxicology*, 121, 82-94. doi: 10.1016/j.fct.2018.08.032
- Juliana V., Budiana W., & Zannah, A. K. (2020) Uji aktivitas antioksidan ekstrak mikroalga *Porphyridium cruentum* menggunakan metode peredaman radikal bebas DPPH. *Journal of Pharmacopolium*. 3(3), 157-165.
- Jamilah, J. (2015). Evaluasi keberadaan gen *catp* terhadap resistensi kloramfenikol pada penderita demam tifoid. In Aziz, I. R. .(Ed.), *Prosiding Seminar Nasional Biologi*, 1(1).
- Kusmiyati., & Agustini, N. W. S., (2007). Uji aktivitas antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*, 8(1), 48-53
- Krzeminska, I., Pawlik-Skoronska B., Trzeinka M., Tys J. (2014). Influence of photoperiods on the growth rate and biomass productivity of green microalgae. *Bioprocess Biosyst. Eng*, 37, 735-741. doi: 10.1007/s00449-013-1044-x
- Little, S. M., Senhorinho, G. N. A., Saleh, M., Basiliko, N. & Scott, J. A., (2021). Antibacterial compounds in green microalgae from extreme environments : a review. *Algae*, 36(1), 61-72. doi: 10.4490/algae.2021.36.3.6
- Plaza, M., Santoyo, S., Jaime, L., García-Blairsy Reina, G., Herrero, M., Señoráns, F. J., & Ibáñez, E. (2010). Screening for bioactive compounds from algae. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 450–455. doi:10.1016/j.jpba.2009.03.016
- López, Y., & Soto, S. M. (2020). The preventing usefulness biofilm microalgae infections compounds for preventing biofilm infections. *Antibiotics*, 9, 9. doi: 10.3390/antibiotics9010009
- Lukas, A. (2012). Formulasi obat kumur gambir dengan tambahan peppermint dan minyak cengkeh. *Jurnal Dinamika Penelitian Industri*, 23(2), 67-76.
- Lumempouw, L. I., Jessy ,P., Lidya I. M., & Edi S. (2019). Potensi antioksidan dari ekstrak etanol tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Chemistry Progress*, 5(1), 49-56. doi: 10.35799/cp.5.1.2012.654
- Makkawi, H., Hoch, S., Burns, E., Hosur, K., Hajishengallis, G., Kirschning, C. J., & Nussbaum, G. (2017). *Porphyromonas gingivalis* stimulates TLR2-PI3K signaling to escape immune clearance and induce bone resorption independently of MyD88. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 359. doi: 10.3389/fcimb.2017.00359
- Maltsev, Y., Maltseva K., Kulikovskiy M., & Maltseva S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, 10,1060. doi: 10.3390/biology10101060
- Nolla-Ardèvol, V., Strous, M., & Tegetmeyer, H. E. (2015). Anaerobic digestion of the microalga *Spirulina* at extreme alkaline conditions: biogas production, metagenome, and metatranscriptome. *Frontiers in microbiology*, 6, 597. doi: 10.3389/fmicb.2015.00597
- Oktarina D., Sumpono & Elvia R. (2017). Uji efektivitas asap cair cangkang buah *Hevea brasiliica* terhadap aktivitas antibakteri *Escherichia coli*. *Aotrop Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia*, 1(1),1-5. doi: 10.33369/atp.v1i1.2704
- Ordog V., W. A. Stirk, R. Lenobel, M. Bancrova, M. Strnad, J. van Staden, J. Szigeti & L. N'emeth. (2004). Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. *Journal of Applied Phycology*, 16, 309–314. doi: 10.1023/B:JAPH.0000047789.34883.aa
- Pranoto, E. N., Ma'ruf, W. F., & Pringgenies, D. (2012). Kajian aktivitas bioaktif ekstrak teripang pasir (*Holothuria scabra*) terhadap jamur *Candida albicans*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 1(2), 1-8.
- Raman, B. V., Samuel, L. A., Saradhi, M. P., Rao, B. N., Krishna, N. V., Sudhakar, M., & Radhakrishnan, T. M. (2012). Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(2), 99-106.
- Shannon, E., & Abu-Ghannam, N. (2016). Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine drugs*, 14(4), 81. doi: 10.3390%2Fmd14040081
- Song, Y., & Cho, S. K. (2015). Phytol induces apoptosis and ROS-mediated protective autophagy in human gastric adenocarcinoma AGS cells. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 4(4), 1.
- Syeda, A. M., & Riazunnisa, K. (2020). Data on GC-MS analysis, in vitro anti-oxidant and anti-microbial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. *Data in brief*, 29, 105258. doi: 10.1016/j.dib.2020.105258
- Tanih, N. F., & Ndip, R. N. (2013). The acetone extract of *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) possesses antiproliferative and apoptotic potential against human breast cancer cell lines (MCF-7). *The scientific world journal*, 2013. doi: 10.1155/2013/956206

- Thodar, K. (2018, 15 April). *The cell envelope: capsules, cell walls and cell membranes*. http://textbookofbacteriology.net/structure_4.html
- Wang, M., Zhang, J., He, S., & Yan, X. (2017). A review study on macrolides isolated from cyanobacteria. *Marine drugs*, 15(5), 126. doi: 10.3390/md15050126
- Wardhani, R. A. P., & Supartono, S. (2015). Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) pada bakteri. *Indonesian Journal of Chemical Science*, 4(1). doi: 10.15294/ijcs.v4i1.4766
- Wei, L. S., Wee, W., Siong, J. Y. F., & Syamsumir, D. F. (2011). Characterization of anticancer, antimicrobial, antioxidant properties and chemical compositions of *Peperomia pellucida* leaf extract. *Acta Medica Iranica*, 670-674.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2014). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132-149. doi: 10.2174/0929867321666140916113443
- Yoon, B. K., Jackman, J. A., Valle-González, E. R., & Cho, N. J. (2018). Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. *International journal of molecular sciences*, 19(4), 1114. doi: 10.3390/ijms19041114