

Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Mikroalga Laut *Chlorella vulgaris* terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* dan Diformulasikan Sebagai Emulgel

The Activity of Marine Microalgae Extract of Chlorella vulgaris Against Propionibacterium acnes and Formulated as Emulgel

Aris Suhardiman^{1*}, Sinta Purnamasari¹, Dewi Kurnia¹
Jurusan Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Bhakti Kencana
Jalan Soekarno Hatta No. 754 Kecamatan Panyileukan, Bandung, Indonesia 40164
*E-mail: aris.suhardiman@bku.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.26874/jkk.v3i1.49>

Received: 11 May 2020, Revised: 31 May 2020, Accepted: 31 May 2020, Online: 31 May 2020

Abstrak

Chlorella vulgaris merupakan salah satu jenis mikroalga yang mempunyai potensi untuk dimanfaatkan sebagai antibakteri. Aktivitas antibakteri tersebut diketahui karena adanya kandungan asam lemak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari mikroalga *C. vulgaris* terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. *C. vulgaris* ditumbuhkan dalam medium Walne dan dikultivasi dengan kondisi suhu ruang ($\pm 25-27^{\circ}\text{C}$), fotoperiod 12:12 (gelap:terang), intensitas cahaya 10.000 lux dan aerasi selama 24 jam. Ekstraksi *C. vulgaris* dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan etanol. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *Broth Microdilution* pada konsentrasi 65.536 $\mu\text{g/mL}$ hingga diperoleh konsentrasi terkecil 64 $\mu\text{g/mL}$ dengan pengenceran. Berdasarkan hasil diperoleh nilai KHM pada konsentrasi 8.192 $\mu\text{g/mL}$ dan KBM pada konsentrasi 16.384 $\mu\text{g/mL}$ pada ekstrak n-heksana. Kemudian dilanjutkan dengan uji bioautografi yang menunjukkan senyawa aktif antibakteri berasal dari asam lemak galaktolipid. Aktivitas antibakteri *C. vulgaris* terhadap bakteri *P. acnes* berpotensi untuk dikembangkan dalam bentuk sediaan emulgel. Hasil uji aktivitas sediaan emulgel pada konsentrasi 8% diperoleh diameter zona hambat 12,63 mm. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dapat disimpulkan bahwa ekstrak dan sediaan emulgel dari mikroalga *C. vulgaris* mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. acnes*.

Kata Kunci : Antijerawat, *Propionibacterium acnes*, *Chlorella vulgaris*, Emulgel

Abstract

Chlorella vulgaris is a microalgae which is potent to be produced as beneficial healthcare product. *C. vulgaris* has an antibacterial activity due to its fatty acid contents. The purpose of this research was to verify the antibacterial activity of *Chlorella vulgaris* against *Propionibacterium acnes*. *C. vulgaris* is grown in Walne medium and cultivated in room temperature ($\pm 25-27^{\circ}\text{C}$), with photoperiod of 12:12 (dark:bright), light intensity of 10.000 lux and 24 hours aeration. Multilevel maceration was performed as the extraction method using n-hexane, chloroform and ethanol. The activity test was performed using *Broth Microdilution* in concentration of 65.536 $\mu\text{g/mL}$ and 64 $\mu\text{g/mL}$ was found to be the smallest concentration by dilution. The result shows the minimum inhibition concentration (MIC) is 8.192 $\mu\text{g/mL}$ and minimum bactericidal concentration (MBC) is 16.384 $\mu\text{g/mL}$ in extract of n-hexane. Bioautography was performed to identify the antibacterial active compounds which is fatty acid of galactolipid. Antibacterial activity of *C. vulgaris* against *P. acnes* is potential to be developed in emulgel dosage form. The ability of *C. vulgaris* emulgel against *P. acnes* in concentration of 8% with inhibition zone of 12,63 mm. Based on the results, it is concluded that extract and emulgel of *Chlorella vulgaris* has antiacne activity against *P. acnes*.

Keywords : Antiacnes, *Propionibacterium acnes*, *Chlorella vulgaris*, Emulgel

1 Pendahuluan

Jerawat (*acne*) merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat terutama remaja. Pengobatan yang lazim digunakan untuk mengatasi jerawat adalah dengan menggunakan antibiotik [1].

Mikroorganisme yang berperan dalam patogenesis jerawat salah satunya adalah *Propionibacterium acnes* dengan cara memproduksi metabolit yang dapat bereaksi dengan sebum sehingga meningkatkan proses inflamasi [2].

P. acnes mengeluarkan enzim hidrolitik yang menyebabkan kerusakan folikel polisebasea dan menghasilkan enzim lipase, hialuronidase, protease, lesitinase, dan neuroamidase yang memegang peranan penting pada proses peradangan. *P. acnes* mengubah asam lemak tak jenuh menjadi asam lemak jenuh yang menyebabkan sebum menjadi padat [2].

Senyawa antibiotik dapat berupa senyawa kimia sintetik atau senyawa alamiah yang berasal dari tanaman obat atau bahan alam bahari yang diperoleh melalui proses pengekstrakan [3].

Mikroalga merupakan sumber antibiotik alamiah yang potensial untuk menghambat bakteri penyebab penyakit pada manusia. Aktivitas antibakteri dari spesies alga sebagai bahan alam bahari memiliki efek samping minimal tetapi memiliki efek terapi yang berpotensi tinggi daripada antibakteri sintesis [4].

Chlorella vulgaris merupakan salah satu jenis mikroalga dari golongan Chlorophyta (alga hijau) yang dapat dimanfaatkan sebagai antibiotik. Telah diketahui aktivitas antibiotik *C. vulgaris* efektif terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan bakteri Gram negatif *Klebsiella pneumonia* dan *Escherichia coli* [5].

Studi penelitian melaporkan bahwa aktivitas antibiotik alga hijau diperoleh dari biomassa, karena adanya kandungan asam lemak dalam organisme mikroalga [4].

Kelompok utama senyawa antibakteri yang ditemukan dalam mikroalga adalah asam lemak, lipid, pigmen, polifenol, karbohidrat, hidrokarbon sederhana dan beberapa turunan lainnya. Selain memiliki aktivitas sebagai antibakteri, mikroalga juga menghasilkan beberapa vitamin penting seperti vitamin A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, nikotinamida, biotin, asam folat, dan asam pantotenat [6].

Berdasarkan hasil penelitian di atas, maka dilakukan upaya untuk pengembangan pembuatan sediaan farmasi dari bahan alam bahari. Sediaan

emulgel merupakan salah satu bentuk sediaan farmasi yang cocok untuk digunakan secara topikal. Sediaan emulgel terdiri dari emulsi dan gel berupa sediaan emulsi yang dibuat dengan penambahan basis gel.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri berdasarkan data KHM, KBM ekstrak *Chlorella vulgaris* terhadap bakteri *Propionibacterium acnes* dan dilakukan uji Bioautografi serta dibuat sediaan emulgel untuk jerawat.

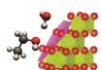
2 Metode Penelitian

Penelitian mengenai senyawa antibakteri *P. acnes* dari alga hijau *C. vulgaris* dan diformulasikan sebagai emulgel untuk jerawat dilakukan dengan metode eksperimental.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu aktivasi dan kultivasi mikroalga *C. vulgaris* dalam medium Walne, pemanenan mikroalga menggunakan alat sentrifuga Beckman Coulter Avanti dengan rotor besar JXN-26 pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dan biomassa basah dikumpulkan. Biomassa basah mikroalga dilakukan pengeringan dengan cara *Freeze Dry*. Selanjutnya mengekstraksi mikroalga *C. vulgaris* dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan etanol. Setelah didapatkan tiga ekstrak mikroalga *C. vulgaris* sesuai pelarut, dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode *Broth Microdilution* dan menentukan KHM (Konsentrasi Hambat Minimum), KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dan uji bioautografi. Kemudian memformulasikan ekstrak mikroalga *C. vulgaris* yang memiliki KHM paling baik dan dilakukan uji aktivitas antibakteri sediaan emulgel dengan metode perforasi serta evaluasi emulgel.

2.1 Alat dan bahan

Peralatan gelas yang digunakan meliputi gelas ukur (*pyrex*), gelas kimia (*pyrex*), botol kaca berkapasitas 1 L, botol gelap, pipa kaca berbentuk L panjang (untuk aerasi) dan pendek (untuk udara keluar botol dan pengambilan sampel), cawan petri, batang pengaduk, pipet tetes, cawan penguap, lampu neon (*phillips*), mortar, stamper, tabung reaksi, Erlenmeyer (*pyrex*), krus. Sedangkan untuk peralatan lainnya yang digunakan adalah sumbat karet, kapas berlemak, kassa, alumunium foil, aerator, selang plastik, mikropipet ukuran 0,5-10 µL, 10-100 µL dan 100-1000 µL, *Haemocytometer (Improved Neubauer)*, Mikroskop, *timer*, spatel, Autoklaf,



Inkubator, botol semprot, bunsen, korek api, tip mikro, Neraca Analitik Mettler Toledo, *Freeze Dryer*, *Orbital shaker*, Hot Plate, Sentrifuga (*Beckman Coulter Avanti JXN-26*), Moisture Balance, mikroplate, Salinity Hydrometer, jarum ose, vortex, membran filter berukuran 0,2 µm, pinset, corong buchner, perforator, jangka sorong.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biomassa mikroalga *C. vulgaris* yang merupakan kultur murni yang diperoleh dari laboratorium Fakultas Farmasi serta bakteri *P. acnes* (*Remel*) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Institut Teknologi Bandung. Bahan-bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain air laut, aquades (*Bratachem*), medium Walne, media *Mueller Hinton Broth (Oxoid)* dan *Muller Hinton Agar (Oxoid)*. Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk mengekstraksi *Chlorella vulgaris* adalah n-heksana (*Bratachem*), kloroform (*Bratachem*) dan etanol 70% (*Bratachem*), DMSO (*Bratachem*). Bahan-bahan untuk formulasi sediaan emulgel diantaranya HPMC (*Bratachem*), Parafin cair (*Bratachem*), Span 80 (*Bratachem*), Tween 80 (*Bratachem*), propilen glikol (*Bratachem*), metil paraben (*Merck*), propil paraben (*Merck*), Butil Hidroksi Toluen (*Merck*), aquadest (*Bratachem*).

2.2 Tahapan Penelitian

Tahap penelitian dilakukan dalam beberapa tahap yaitu.

Kultivasi Mikroalga *C. vulgaris*

Kultivasi mikroalga dilakukan setelah 4 hari kultur mikroalga tersebut diaktivasi. Kultivasi dilakukan dengan kondisi yang sama dengan aktivasi menggunakan medium Walne. Kultivasi pada medium Walne dilakukan selama ±8 hari dan dilakukan secara aseptik.

Pemanenan Mikroalga *C. vulgaris*

Pemanenan mikroalga *C. vulgaris* dilakukan pada hari ke 8 menggunakan alat sentrifuga *Beckman Coulter Avanti* dengan rotor besar JXN-26 pada kecepatan 5.000 rpm selama 10 menit. Supernatan kemudian dipisahkan dan biomassa basah dikumpulkan. Kemudian dilakukan penimbangan menggunakan neraca analitis. Selanjutnya sampel mikroalga dilakukan pengeringan dengan cara *Freeze Dry*, sehingga didapat biomassa kering dan dilakukan penimbangan kembali menggunakan neraca analitis.

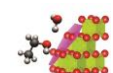
Ekstraksi Mikroalga *C. vulgaris*

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi bertingkat menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan etanol dengan perbandingan biomassa kering mikroalga *C. vulgaris* dan pelarut 1:5 (b/v). Sebanyak 20 g biomassa kering *C. vulgaris* dimasukan ke dalam erlenmeyer 250 mL tambahkan pelarut n-heksana sebanyak 100 mL kemudian disonikasi selama 1 jam. Sampel diaduk menggunakan *orbital shaker* selama 24 jam pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm. Selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas Whatman No.1 sehingga terpisah antara filtrat dengan residu. Bagian residu dimaserasi kembali hingga 3 kali. Tahap selanjutnya dilakukan dengan proses yang sama pada sampel yang sama (bagian residu) untuk pelarut yang kedua yaitu kloroform dan pelarut ketiga yaitu etanol. Filtrat yang diperoleh dari 3 kali proses maserasi dikumpulkan dan dipisahkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* sehingga diperoleh ekstrak pekat n-heksana, kloroform dan etanol. Ekstrak pekat yang diperoleh dihitung rendemennya.

Uji Aktivitas Antibakteri

KHM ditentukan dengan menggunakan metode *Broth Microdilution*. Sebanyak 100 µl *Mueller Hinton Broth (MHB)* steril dimasukkan ke dalam setiap kolom mikroplate. Kolom pertama sebagai kontrol negatif media. Pada kolom ke 12 ditambahkan 100 µL ekstrak *C. vulgaris* yang telah dilarutkan dalam DMSO 8% kemudian dihomogenkan. Dari kolom ke 12, diambil 100 µL kemudian dipindahkan ke kolom 11 kemudian dihomogenkan. Pengenceran terus dilakukan sampai kolom ke 3 yang akan memiliki konsentrasi terkecil, dari kolom ke 3 diambil 100 µL dan dibuang. Kemudian pada kolom ke 2 sampai kolom ke 12 ditambahkan 5 µl suspensi bakteri *P. acnes* 10⁸ CFU/mL yang memiliki absorbansi 0,08-0,10 pada panjang gelombang 625 nm. Kolom ke 2 merupakan kontrol positif yang berisi media dan bakteri. Mikroplate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator kemudian diamati bagian yang jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Konsentrasi terkecil dimana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum).

Pengujian dilanjutkan dengan menentukan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dengan memilih ekstrak yang memiliki bagian yang jernih dan ditetapkan sebagai KHM kemudian dikultur ulang dengan cara menggoreskan hasil KHM pada



media padat MHA diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator dengan posisi cawan petri dibalik. Jika tidak ada pertumbuhan maka disebut KBM.

Uji Bioautografi

Untuk mendeteksi senyawa aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri digunakan metode bioautografi. Pelat KLT yang telah dielusi di tempelkan pada media MHA steril yang telah diinokulasi dengan 100 µL suspensi bakteri *P. acnes* 10⁸ CFU/mL. Diamkan selama 60 menit, diberi tanda bagian bawahnya, lalu plat diangkat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator dengan posisi cawan petri dibalik. Diamati, bila bercak pada kromatogram tersebut yang memiliki aktivitas antibakteri maka dengan difusi akan terbentuk zona bening yang merupakan zona hambat yang memberikan aktivitas antibakteri.

Formulasi Sediaan Emulgel

Formulasi sediaan emulgel ekstrak mikroalga *C. vulgaris* dibuat dengan memformulasikan ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri berdasarkan data uji antibakteri dilihat dari KHM, KBM dan uji Bioautografi. *Gelling agent* yang digunakan yaitu HPMC.

Emulgel dibuat dengan cara mencampurkan emulsi yang telah dibuat ke dalam basis gel sedikit demi sedikit dengan menggunakan *homogenizer*

pengadukan 2000 rpm selama 30 menit atau hingga terbentuk massa emulgel yang homogen.

3 Hasil dan Diskusi

Kultivasi dilakukan untuk mengumpulkan biomassa sebanyak-banyaknya. Komposisi dari medium akan mempengaruhi biomassa dan kandungan senyawa yang akan dihasilkan oleh mikroalga. Kultivasi dilakukan harus aseptik untuk mencegah timbulnya kontaminan baik berupa virus, bakteri atau organisme lain yang dapat mengganggu pertumbuhan mikroalga. Gambar 1 memperlihatkan wujud biomassa kering hasil *freeze dry* mikroalga *C. vulgaris*.



Gambar 1. Biomassa kering hasil *freeze dry* mikroalga *Chlorella vulgaris*

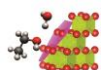
Pemanenan dilakukan pada hari ke-8 dengan perhitungan dimulai dari hari ke-0, saat pemanenan dilakukan pengukuran volume kultur dan perhitungan jumlah sel rata-rata. Hal ini dilakukan untuk mengetahui kepadatan biomassa yang diperoleh. Hasil kultivasi dan pemanenan diperlihatkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Kultivasi dan Pemanenan

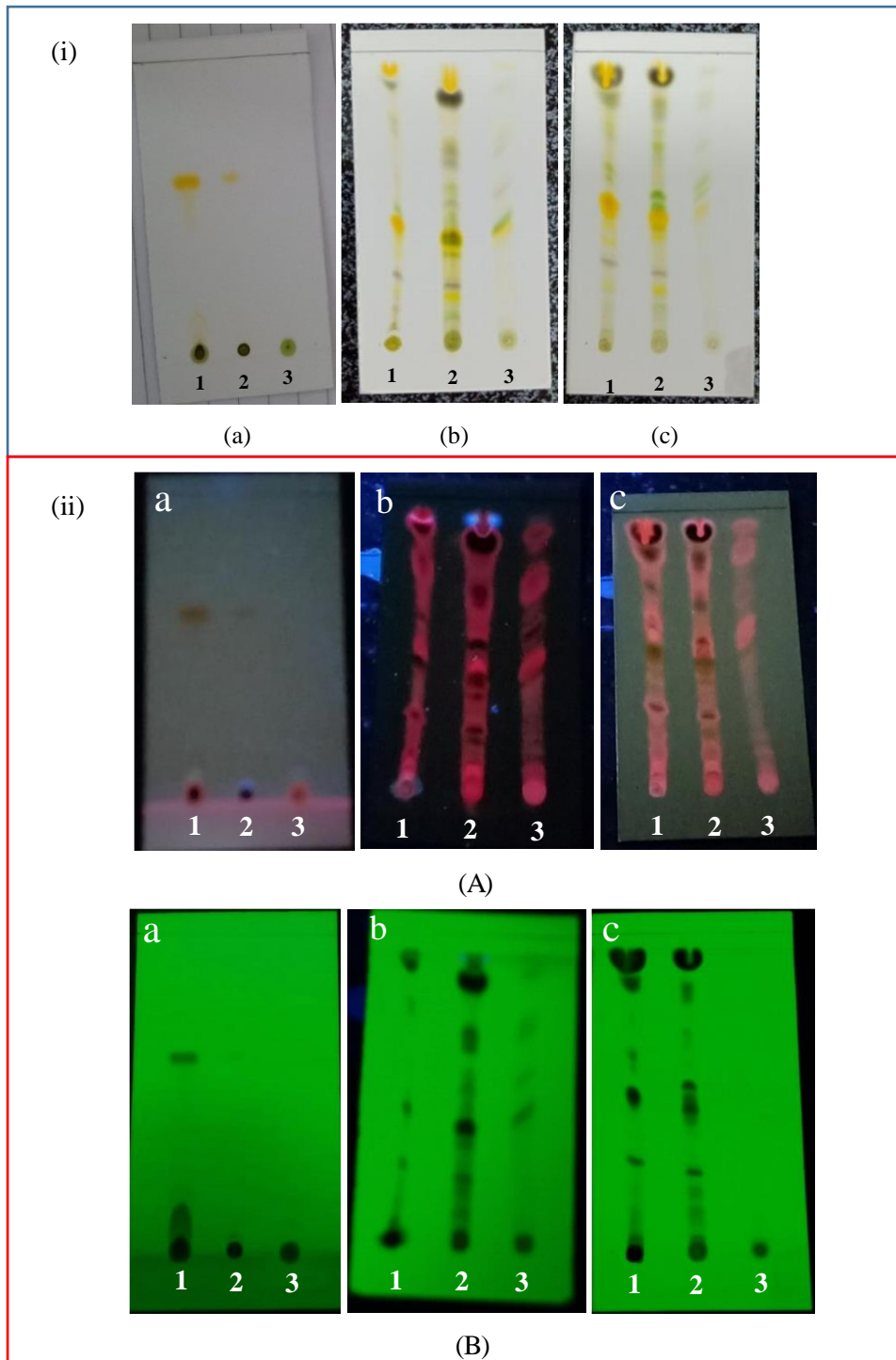
Jumlah Sel (10 ⁶)	Volume Kultur (mL)	Biomassa Basah (gram)	Biomassa Kering (gram)
21,175	5500	13,49	2,49
13,225	9500	20,13	4,28
14,7	13000	12,1	3,85
21,550	7000	18,7	3,78
20,175	8270	19,2	4,95
10,125	15300	18,9	3,39
20,138	18900	43,5	7,75
21,896	19360	48,3	9,68

Ekstrak pekat yang dihasilkan berwarna hijau kehitaman (hijau pekat). Hal ini diduga karena adanya kandungan klorofil yang dimiliki oleh *C. vulgaris*. Klorofil merupakan pigmen berwarna hijau yang diperlukan dalam proses fotosintesis.

Hasil rendemen ekstrak (Gambar 2 dan Tabel 2) menunjukkan bahwa ekstrak *C. vulgaris* lebih banyak mengandung senyawa polar. Hal ini karena dari hasil pemekatan ekstrak yang diperoleh lebih banyak senyawa yang terlarut



dalam ekstrak etanol yang merupakan pelarut polar. Tetapi selain mengandung senyawa polar terdapat pula senyawa semi polar dan non polar yang terlarut dalam ekstrak kloroform dan n-heksana.



Gambar 2. i) Hasil pemantauan ekstrak secara visual (a) Pengembang non polar; (b) Pengembang semi polar; (c) Pengembang Polar; (1) ekstrak n-heksana; (2) ekstrak kloroform; (3) ekstrak etanol; ii) Hasil pemantauan ekstrak pada (A) UV 365 nm; (B) UV 254 nm; (a) Pengembang non polar; (b) Pengembang semi polar; (c) Pengembang polar; (1) ekstrak n-heksana; (2) ekstrak kloroform; (3) ekstrak etanol

Tabel 2. Hasil Rendemen Ekstrak

Pelarut	Bobot (g)	Randemen (%)
n-heksana	0,886	4,43
Kloroform	1,8799	9,39
Etanol	4,4742	22,37

Tabel 3. Hasil Pengujian KHM dan KBM

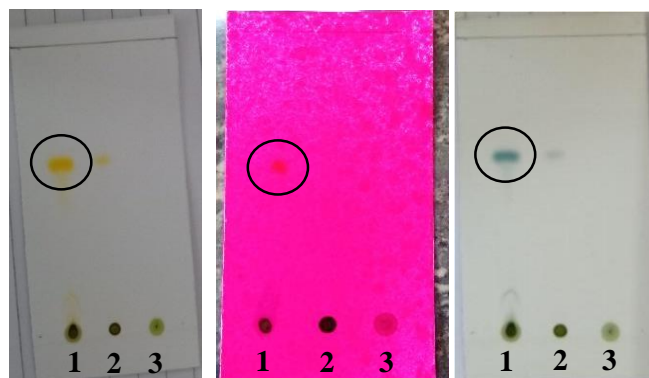
Sampel	KHM (µg/mL)	KBM (µg/mL)
Ekstrak n-heksana	8.192	16.384
Ekstrak kloroform	16.384	>32.768
Ekstrak etanol	32.768	>32.768
Klindamisin	128	256

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan melihat hasil KHM dan KBM ekstrak mikroalga *C. vulgaris* terhadap bakteri *P. acnes*.

Hasil (Tabel 3) menunjukkan bahwa pengujian menggunakan antibakteri pembanding (klindamisin) menghasilkan nilai KHM 128 µg/mL dengan nilai KBM 256 µg/mL. Pengujian selanjutnya dilakukan penentuan nilai KBM yang dilakukan pada semua sampel yang memiliki kejernihan (berdasarkan data absorbansi), kemudian ditanam pada media agar steril. Hasil yang diperoleh yaitu ekstrak n-heksana memiliki aktivitas paling baik dalam menghambat bakteri *P. acnes* pada konsentrasi 8.192 µg/mL dan dapat membunuh bakteri *P. acnes* pada konsentrasi 16.384 µg/mL. Sedangkan untuk ekstrak kloroform dan etanol nilai KBM >32.768 µg/mL.

Lipid adalah senyawa organik yang larut pada lemak atau pelarut organik non polar yang umum ditemukan di jaringan tumbuhan. Berdasarkan hasil uji bioautografi (Gambar 3) asam lemak yang terkandung dalam fase n-heksana dari mikroalga *C. vulgaris* berperan sebagai antibakteri. Di habitat alami mikroalga, asam lemak dilepaskan untuk melindungi diri atau sebagai mekanisme pertahanan *C. vulgaris*.

Mekanisme asam lemak dari mikroalga *C. vulgaris* belum sepenuhnya diketahui, tetapi ada beberapa bukti efek asam lemak adalah kerusakan pada membran sel bakteri. Aktivitas antibakteri dari asam lemak berdasarkan penghambatan sintesis asam lemak bakteri.



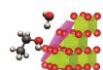
Gambar 3. Hasil uji bioautografi; (a) Sebelum dideteksi; (b) Penampak bercak 0,5% Rhodamin B dalam etanol; (c) Penampak bercak antron 0,2% dalam H₂SO₄ pekat diikuti pemanasan pelat; (1) ekstrak n-heksana; (2) ekstrak kloroform; (3) ekstrak etanol

4 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang dilakukan, ekstrak mikroalga *C. vulgaris* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. acnes*. Berdasarkan pengujian yang dilakukan diperoleh :

1. Nilai KHM dan KBM terbaik dari aktivitas antibakteri mikroalga *C. vulgaris* adalah pada ekstrak n-heksana terhadap bakteri *P. acnes* yaitu pada konsentrasi 8.192 µg/mL (KHM) dan 16.384 µg/mL (KBM).

2. Senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri diduga adalah asam lemak yang merupakan galaktolipid berdasarkan hasil uji bioautografi.
3. Ekstrak terbaik sebagai antibakteri diformulasikan dalam bentuk sediaan emulgel pada konsentrasi 8% dengan diameter zona hambat 12,63 mm.



Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih saya ucapkan kepada teman sejawat dosen ibu Dewi Kurnia, M.Si yang telah memberikan arahan dan masukan untuk peneliti dan juga Sinta Purnamasari salah satu mahasiswa yang telah banyak membantu dalam penelitian ini.

Daftar Pustaka

- [1] Daud NS, Suryanti E. Formulasi Emulgel Antijerawat Minyak Nilam (Patchouli oil) Menggunakan Tween 80 dan Span 80 sebagai Pengemulsi dan HPMC sebagai Basis Gel. *J Mandala Pharmacon Indones.* 2017. 3(02):90–5. <http://dx.doi.org/10.35311/jmpi.v3i02.3>
- [2] Hafsari AR, Cahyanto T, Sujarwo T, Lestari RI. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas (*Pluchea indica* (L.) Less.) Terhadap *Propionibacterium acnes* Penyebab Jerawat. In: ISTEK. 9 ed. Fakultas Sains dan Teknologi UIN Sunan Gunung Djati Bandung; 2015. hal. 141–61.
- [3] Utami KS. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat, Kloroform, Petroleum Eter, Dan Nheksana Hasil Hidrolisis Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Universitas Islam Negeri Malang; 2014.
- [4] Syed S, Arasu A, Ponnuswamy I. The Uses of *Chlorella Vulgaris* as Antimicrobial Agent and as a Diet: the Presence of Bio-active Compounds which Caters the Vitamins, Minerals in General. *Int J Bio-Science Bio-Technology.* 2015. 7(1):185–90. <http://dx.doi.org/10.14257/ijbsbt.2015.7.1.19>
- [5] Ahmed EA. Antimicrobial Activity of Microalgal Extracts Isolated from Baharia oasis. *Glob Adv Res J Microbiol.* 2016. 5(3):33–41.
- [6] Fasya AG, Khamidah U, Amaliyah S, B. SK, Romaidi R. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Mikroalga *Chlorella* sp. Hasil Kultivasi Dalam Medium Ekstrak Tauge (Met) Pada Tiap Fase Pertumbuhan. *Alchemy.* 2013. <http://dx.doi.org/10.18860/al.v0i0.2889>

