

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI  
ACTINOMYCETES SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*Staphylococcus aureus* RESISTEN**

**(Tesis)**

**Oleh**

**TYA GITA PUTRI UTAMI  
NPM 1927011005**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI *ACTINOMYCETES* SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM *Staphylococcus aureus* RESISTEN

Oleh

TYA GITA PUTRI UTAMI

Fenomena pembentukan biofilm oleh bakteri merupakan salah satu faktor penyebab meningkatnya resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui sifat antibiofilm dari *Actinomycetes* asosiasi biota laut. Dalam penelitian ini, isolat *Actinomycetes* diperoleh dari deposit UPT-LTSIT, Universitas Lampung yang diisolasi dari biota laut di perairan Bali dan Gorontalo. Bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, diperoleh dari deposit RSUD Abdoel Moelek, Bandar Lampung. Uji pembentukan biofilm *S. aureus* dilakukan dengan metode kristal violet. Pertumbuhan bakteri patogen diukur menggunakan indikator resazurin. Isolasi senyawa bioaktif dilakukan dengan beberapa tahap kromatografi. Fraksi aktif dianalisis dengan metode spektroskopi massa. Uji ketahanan yang telah dilakukan menunjukkan bahwa *S. aureus* memiliki kategori *resistance* terhadap beberapa jenis antibiotik komersial. Hasil skrining antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak 33A1T2; 33A2T7; 21A1T11; dan 38A1T12 memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 500 µg/mL. Hasil skrining antibiofilm menunjukkan bahwa ekstrak 32A2T1, 50A2T9; 07A1T10; 21A1T11; dan 38A1T12 memiliki potensi sebagai antibiofilm terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 250 µg/mL. Ekstrak 07A1T10 memiliki potensi paling kuat yaitu 61% daya hambat terhadap biofilm *S. aureus* pada konsentrasi 250 µg/mL. Pengamatan menggunakan mikroskop dan SEM menunjukkan isolat 19A07A1 memiliki ciri khas *Saccharomonospora* sp. Hasil fraksinasi ekstrak 07A1T10 dengan teknik kromatografi menunjukkan adanya senyawa alkaloid pada fraksi aktif T10FbK1K2. Hasil analisis spektroskopi massa mengindikasikan fraksi aktif T10FbK1K2 mengandung senyawa indol yang memiliki (M+H)<sup>+</sup> pada m/z 195,0875 dengan rumus molekul C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>. Informasi ini sangat penting sebagai dasar untuk pengembangan senyawa antibiofilm yang berasal dari *Actinomycetes*.

**Kata Kunci:** *Actinomycetes*, antibakteri, antibiofilm, *S. aureus*, indol.

## ABSTRACT

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ACTINOMYCETES AS ANTIBACTERIALS AND ANTIBIOFILM OF RESISTANT *Staphylococcus aureus*

By

TYA GITA PUTRI UTAMI

The phenomenon of biofilm formation by bacteria is one of the factors causing increased resistance of pathogenic bacteria to various types of antibiotics. This study aims to determine the antibiofilm properties of marine organisms-derived actinomycetes. In this study, actinomycetes isolates were obtained from the UPT-LTSIT deposit, Lampung University, which isolated from marine organisms in Bali and Gorontalo. The pathogenic bacterium, *Staphylococcus aureus*, was obtained from deposit of the Abdul Muluk General Hospital, Bandar Lampung. The biofilm formation test was carried out using the crystal violet method. The viability of pathogenic bacteria was measured using the indicator resazurin. The isolation of bioactive compound was done which several steps of chromatography. The active fraction was analyzed by mass spectroscopy method. *S. aureus* had resistance levels to several types of commercial antibiotics. The results of antibacterial screening showed that extract 33A1T2; 33A2T7; 21A1T11; and 38A1T12 had activity to inhibit the growth of *S. aureus* at a concentration of 500 µg/mL. The results of the antibiofilm screening showed that extracts 32A2T1, 50A2T9; 07A1T10; 21A1T11; and 38A1T12 had potential as an antibiofilm against *S. aureus* at a concentration of 250 µg/mL. Extract 07A1T10 has the strongest potential, 61% inhibition against *S. aureus* biofilms (250 µg/mL). Observations using a microscope and SEM showed isolate 19A07A1 had the characteristics of *Saccharomonospora* sp. The results of fractionation of extract 07A1T10 using chromatographic technique showed the presence of alkaloid compounds in the active fraction T10FbK1K2. The results of mass spectroscopic analysis indicated that the active fraction T10FbK1K2 contained an indole compound having (M+H)<sup>+</sup> at m/z 195.0875 with the molecular formula C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>. This information is very important as the basis for the development of antibiofilm compounds derived from actinomycetes.

**Key words:** *Actinomycetes*, antibacterial, antibiofilm, *S. aureus*, indole.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI  
ACTINOMYCETES SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*Staphylococcus aureus* RESISTEN**

**Oleh**

**TYA GITA PUTRI UTAMI**

**Tesis**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
MAGISTER SAINS**

**pada**

**Program Studi Magister Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**



Judul Tesis : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF DARI *ACTINOMYCETES* SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM *Staphylococcus aureus* RESISTEN**

Nama Mahasiswa : **Tya Gita Putri Utami**

No. Pokok Mahasiswa : 1927011005

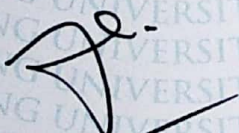
Program Studi : Magister Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

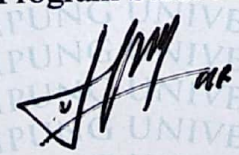


1. Komisi Pembimbing

  
**Andi Setiawan, Ph.D.**  
NIP 19580922 198811 1 001

  
**Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**  
NIP 19770713 200912 2 002

2. Ketua Program Studi Magister Kimia

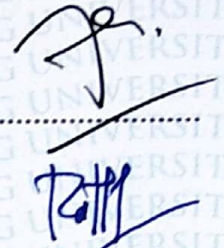
  
**Dr. Nurhasanah, M.Si.**  
NIP 19741211 199802 2 001



## MENGESAHKAN

### 1. Tim Penguji

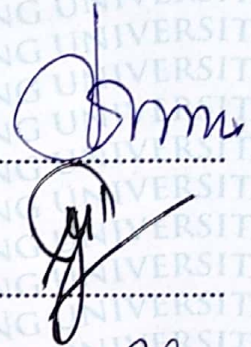
Ketua : **Andi Setiawan, Ph.D.**



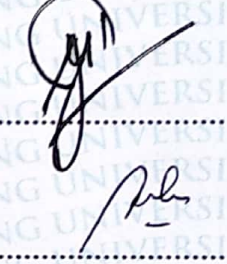
Sekretaris : **Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**

Penguji Bukan Pembimbing

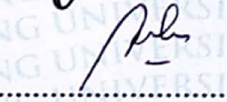
Anggota : **Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.**



Anggota : **Prof. Dr. John Hendri, M.S.**



Anggota : **Dr. Yuli Ambarwati, M.Si.**



Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Dr. Eng. Supto Dwi Yuwono, S.Si., M.T.**

NIP. 19740705 200003 1 001

### 3. Direktur Program Pascasarjana

**Prof. Dr. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T.**

NIP. 19710415 199803 1 005

Tanggal Lulus Ujian Tesis: **23 Februari 2022**



**SURAT PERNYATAAN  
KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tya Gita Putri Utami  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1927011005  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa tesis saya yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif dari *Actinomycetes* sebagai Antibakteri dan Antibiofilm *Staphylococcus aureus* Resisten” adalah benar karya saya sendiri dan tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam tesis tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar Lampung, April 2022  
Yang membuat pernyataan,



Tya Gita Putri Utami  
NPM. 1927011005

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Tya Gita Putri Utami, lahir di Bengkulu pada tanggal 3 Oktober 1994, merupakan anak pertama dari pasangan suami istri Bapak Ahmad Raji Muda dan Ibu Maysaroh.

Penulis telah menyelesaikan pendidikan mulai dari Taman Kanak-Kanak di Dharma Wanita Bengkulu pada tahun 2001, Sekolah Dasar di SD Negeri 7 Podorejo Pringsewu pada tahun 2007, Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Pringsewu pada tahun 2010, dan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Pringsewu pada tahun 2013. Tahun 2013, penulis melanjutkan pendidikan di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung hingga mendapatkan gelar Sarjana Sains pada tahun 2018. Mulai tahun 2019, penulis melanjutkan pendidikan di Program Studi Magister Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada bidang ilmu Kimia Organik. Selama menjadi mahasiswa, penulis pernah menjadi asisten praktikum Kimia Organik 1 untuk mahasiswa Kimia angkatan 2019 (Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam), Universitas Lampung.



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*Dengan rasa syukur pada Allah SWT., Kupersembahkan karya sederhanaku ini teruntuk:*

*Kedua orang tuaku tercinta,  
Bapak Ahmad Raji Muda dan Ibu Maysaroh yang telah memberikan cinta kasih, semangat, pengorbanan, dukungan, dan doa untukku.*

*Suamiku Yudha Ari Satria*

*Adikku Onti Sinditiya*

*Pembimbing Penelitian ku  
Bapak Andi Setiawan, Ph.D. dan  
Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M. Si.*

*Orang terkasih, Sahabat, Kerabat, dan Teman.*

*Almamater Tercinta*

## *MOTTO*

“Ridho Allah berada pada ridho kedua orang tuanya dan murka Allah (akibat) murka kedua orang tuanya”  
**(HR. At-Tarmizi)**

“Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras (untuk urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap”  
**(QS. Al-Insyirah: 6-8)**

“Boleh jadi kamu membenci sesuatu, padahal ia amat baik bagi kamu. Dan boleh jadi kamu mencintai sesuatu, padahal ia amat buruk bagi kamu. Allah Maha mengetahui sedangkan kamu tidak mengetahui”  
**(QS. Al-Baqarah: 216)**

“Seberat apapun Allah tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya”  
**(QS. Al-Baqarah: 286)**



## SANWACANA

*Alhamdulillahirrobbil'alamiin.* Puji syukur kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat, karunia, dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif dari *Actinomyces* sebagai Antibakteri dan Antibiofilm *Staphylococcus aureus* Resisten”**. *Sholawat* serta salam kepada Nabi Muhammad SAW, beserta para keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya yang selalu taat mengamalkan ajaran dan sunnah-Nya. Teriring doa yang tulus, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua dan adikku tercinta, atas seluruh cinta kasih, do'a, nasehat, motivasi, pengorbanan, dan dukungan.
2. Bapak Andi Setiawan, Ph.D. selaku pembimbing pertama, atas segala nasihat, bimbingan, motivasi, bantuan, dan saran hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna J., M.Si. selaku pembimbing kedua yang telah membimbing, membantu, memberikan nasihat dan saran hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri, A. S., M. S. selaku pembahas, atas segala saran dan kritik yang sangat membangun dalam menyelesaikan tesis ini.
5. Bapak Prof. Dr. John Hendri, M. S. selaku pembahas, atas segala saran dan kritik yang sangat membangun dalam menyelesaikan tesis ini.
6. Ibu Dr. Yuli Ambarwati, M. Si. selaku pembahas, atas segala saran dan kritik yang sangat membangun dalam menyelesaikan tesis ini.
7. Ibu Dr. Nurhasanah, M. Si. selaku Ketua Program Studi Magister Kimia, yang telah memberikan informasi, bimbingan, bantuan, dan nasihat kepada penulis.
8. Bapak Mulyono, Ph. D. selaku Ketua Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

9. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S. Si., M. T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
10. Bapak dan Ibu dosen jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu dan bimbingan yang diberikan selama penulis menjalani perkuliahan.
11. Bapak dan Ibu staff Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung.
12. Bapak Wawan A. Setiawan dan Ibu Laila, atas segala bantuan, bimbingan, nasehat, motivasi yang sangat membangun dalam menyelesaikan tesis ini.
13. Suamiku tercinta, Yudha Ari Satria, atas seluruh cinta, do'a, dukungan, motivasi, kritik, saran, nasihat, dan bantuannya dengan penuh kesabaran.
14. Nafila, Violita Panca, Mega Muryani dan Kak Arif Nurhidayat yang selalu setia, terima kasih atas segala do'a, dukungan, motivasi, saran, kritik, nasihat, dan bantuannya dengan penuh kesabaran hingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
15. Rekan-rekan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi; Mbak Widya, Kak Ridho, Kak Arik, Fendi, Rosyi, Nafila, Caca, Nurhuda, Vio, Dea, Rizky, Nia, Merriezka, Ikrom, Saras, Rana, Mega, Lanang, Indra, Reyzka, Ikhsan, Wulan, Dian, Dinda, Lisa atas semangat, doa, dukungan, dan bantuan yang diberikan.
16. Keluarga program studi magister kimia Universitas Lampung 2019, Kak Arik, Kak Arif, Elin, Mahliani, Tika, Desria, dan Pina, terimakasih atas kebersamaan dan keceriaan dalam melalui hari demi hari di kehidupan kampus.
17. Nita Yuliyani, Dona Mailani P., Siti Mudmainah, dan Dewi Citra sebagai tempat curhat berbagai masalah, terima kasih atas segala do'a, dukungan, saran, dan nasihat kepada penulis.
18. Seluruh keluarga besar Jurusan kimia.
19. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu, yang telah membantu dan mendukung penulis dalam penyusunan tesis ini.
20. Almamater tercinta, Universitas Lampung.



Atas segala kebaikan yang telah diberikan, semoga Allah SWT. membalas dengan pahala yang berlipat ganda. *Aamiin*. Penulis menyadari bahwa tesis ini masih terdapat kekurangan, namun penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat dan berguna bagi rekan-rekan khususnya mahasiswa kimia dan pembaca pada umumnya.

Bandar Lampung, April 2022

**Tya Gita Putri Utami**

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>iii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>iv</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang dan Masalah .....	1
1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	3
1.3 Kerangka Pemikiran .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>5</b>
2.1 <i>Actinomycetes</i> .....	5
2.2 Kultivasi <i>Actinomycetes</i> .....	8
2.3 Senyawa Metabolit Sekunder <i>Actinomycetes</i> Asosiasi Biota Laut .....	11
2.4 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder .....	12
2.4.1 Ekstraksi.....	12
2.4.1.1 Ekstraksi Cair-Cair (Partisi).....	13
2.4.2 Kromatografi.....	14
2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	14
2.4.2.2 Kromatografi Kolom (KK).....	16
2.5 Karakterisasi .....	17
2.5.1 <i>Bioassay</i> .....	17
2.5.1.1 Bakteri.....	17
2.5.1.2 Antibakteri .....	19
2.5.1.3 Biofilm .....	20
2.5.1.4 Antibiofilm.....	22
2.5.2 <i>Mass Spectroscopy</i> .....	23
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>25</b>
3.1 Waktu dan Tempat.....	25
3.2 Alat dan Bahan .....	25
3.3 Metode.....	26
3.3.1 Biomaterial.....	26
3.3.2 Persiapan Limbah Kulit Udang dan Koloid Kitin.....	26
3.3.3 Analisis Makroskopis <i>Actinomycetes</i> .....	27
3.3.4 Analisis Mikroskopis <i>Actinomycetes</i> .....	27
3.3.5 Skrining Senyawa Bioaktif <i>Actinomycetes</i> .....	27
3.3.6 <i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) .....	30
3.3.7 Isolasi Senyawa Bioaktif Antibiofilm.....	31
3.3.8 <i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i> (MBIC) .....	32



3.3.9	Karakterisasi Fraksi Aktif dengan LCMS.....	32
<b>IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>33</b>
4.1	Analisis Makroskopis <i>Actinomyces</i> .....	33
4.2	Analisis Mikroskopis (Morfologi <i>Actinomyces</i> ) .....	34
4.3	Skrining Senyawa Bioaktif <i>Actinomyces</i> .....	36
4.3.1	Uji Ketahanan <i>Staphylococcus aureus</i> .....	36
4.3.2	Skrining Antibakteri.....	37
4.3.3	Uji Pertumbuhan Biofilm.....	39
4.3.4	Skrining Antibiofilm .....	40
4.4	<i>Scanning Electron Microscopy</i> (SEM) .....	42
4.5	Isolasi Senyawa Antibiofilm .....	43
4.5.1	Partisi Ekstrak 07A1T10 .....	44
4.5.2	Fraksinasi menggunakan KK .....	45
4.5.3	<i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i> (MBIC).....	49
4.6	Karakterisasi <i>Mass Spectroscopy</i> (MS) .....	50
	<b>SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>52</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>53</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>61</b>
	Lampiran 1 Skema penelitian.....	62
	Lampiran 2 Pembuatan Pereaksi .....	63
	Lampiran 3 Analisis Makroskopis <i>Actinomyces</i> .....	64
	Lampiran 4 Analisis Mikroskopis <i>Actinomyces</i> .....	65
	Lampiran 5 Uji ketahanan <i>S. aureus</i> .....	66
	Lampiran 6 Skrining Antibakteri Ekstrak Metanol terhadap <i>S. aureus</i> ..	66
	Lampiran 7 Nilai absorbansi pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i> .....	67
	Lampiran 8 Skrining Antibiofilm Ekstrak Metanol terhadap <i>S. aureus</i> .	67
	Lampiran 9 Uji antibiofilm T10FbK1K2 dan T10FbK1K3 terhadap <i>S. aureus</i> .....	68

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Isolat <i>Actinomycetes</i> .....	34
2. Hasil identifikasi dua belas isolat <i>Actinomycetes</i> .....	35
3. Data hasil kombinasi antibakteri dan antibiofilm .....	41



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Karakteristik morfologi <i>Actinomycetes</i> berdasarkan bentuk, posisis, dan jumlah spora (Barka <i>et al.</i> , 2016).....	6
2. <i>Monospora</i> : (A) <i>Micromonospora</i> , (B) <i>Thermomonospora</i> , (C) <i>Saccharomonospora</i> ; (D) <i>Thermoactinomyces</i> . <i>Disporous</i> : (E) <i>Microbispora</i> . <i>Oligosporous</i> : (F) <i>Nocardia brevicatena</i> , (G) <i>Catellatospora</i> (Li <i>et al.</i> , 2016).....	7
3. <i>Streptomyces</i> : (A) <i>Rectiflexibiles type</i> , (B) <i>Retinaculiaperti type</i> , (C) <i>Spira type</i> , (D) <i>Verticillati type</i> . <i>Nocardiosis</i> : (E) memecah hifa udara bercabang (Li <i>et al.</i> , 2016).....	8
4. Struktur <i>streptorubin B</i> dari <i>Streptomyces</i> sp. (Suzuki <i>et al.</i> , 2015). ....	11
5. Senyawa <i>collismycin C</i> dari <i>Streptomyces</i> sp. (Lee <i>et al.</i> , 2017).....	12
6. Senyawa antibiofilm dari <i>Streptomyces</i> sp. (Driche <i>et al.</i> , 2017).....	12
7. Spektrum ESI TOF MSMS fraksi C38BK2FA (Setiawan <i>et al.</i> , 2022) .....	24
8. Grafik daya hambat <i>S. aureus</i> terhadap beberapa antibiotik .....	37
9. Hasil uji antibakteri ekstrak metanol <i>Actinomycetes</i> terhadap <i>S. aureus</i> .....	38
10. Kurva pertumbuhan biofilm <i>S. aureus</i> .....	39
11. Skrining antibiofilm ekstrak metanol <i>Actinomycetes</i> terhadap biofilm <i>S. aureus</i> .....	41
12. a) Morfologi 19A07A1 menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 400 M (b) Morfologi 19A07A1 menggunakan SEM dengan perbesaran 5.00K x (c) Spora <i>Saccharomonospora</i> sp. (Barka <i>et al.</i> , 2016).....	42
13. Hasil uji KLT 07A1T10 menggunakan fase diam silika F <sub>254</sub> dan fase gerak heksana-isopropil alkohol (1:1), (a) pereaksi serium sulfat, (b) pereaksi ninhidrin .....	43
14. Partisi 07A1T10, (a) butanol, (b) air .....	44
15. Uji KLT hasil partisi 07A1T10 menggunakan fase diam silika dan fase gerak heksana-isopropil alkohol (1:1), (1) pereaksi serium sulfat, (2) pereaksi ninhidrin, (3) pereaksi Dragendorff; (a) 07A1T10Fb; (b) 07A1T10Fa.....	45
16. Uji KLT hasil partisi 07A1T10Fb menggunakan fase diam silika F <sub>254</sub>	

dan fase gerak heksana-etil asetat (1:1), (a) pereaksi serium sulfat, (b) Dragendorff .....	46
17. Fraksinasi 07A1T10Fb menggunakan fase diam C <sub>18</sub> dan fase gerak MeOH-air (7:3) dan MeOH 100% .....	46
18. KLT hasil fraksinasi 07A1T10Fb menggunakan fase diam silika dan fase gerak heksana-etil asetat (1:1) .....	47
19. KLT hasil fraksi T10FbK1 menggunakan fase diam silika dan fase gerak DCM 100% serta pereaksi Dragendorff .....	47
20. KLT fraksi T10FbK1K1-T10FbK1K4 menggunakan fase diam silika dan fase gerak DCM 100%, (1) pereaksi Dragendorff, (2) pereaksi serium sulfat .....	48
21. Grafik uji antibiofilm fraksi T10FbK1K2 dan T10FbK1K3 terhadap biofilm <i>S. aureus</i> .....	49
22. Spektrum LCMS-MS fraksi aktif T10FbK1K2 .....	50
23. Struktur fraksi aktif T10FbK1K2.....	51

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang dan Masalah

Peningkatan kasus resistensi bakteri patogen, *Staphylococcus aureus*, terhadap berbagai jenis antibiotik merupakan masalah kesehatan global yang serius (WHO, 2020). Berdasarkan data *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) Amerika Serikat, menunjukkan bahwa terjadi 2,8 juta infeksi akibat resistensi bakteri setiap tahun, dan lebih dari 35.000 orang meninggal (CDC, 2019). Salah satu penyebab terjadinya resistensi yaitu adanya pembentukan biofilm pada bakteri patogen. Mengingat dampak dari resistensi tersebut, maka pentingnya studi untuk mendapatkan senyawa antibiofilm untuk mengatasi infeksi bakteri akibat adanya biofilm.

Fenomena pembentukan biofilm oleh bakteri patogen merupakan salah satu faktor penyebab peningkatan resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik (Penesyant *et al.*, 2020). Biofilm mampu melindungi bakteri dari serangan luar termasuk serangan antibiotik. Telah dibuktikan bahwa bakteri patogen dalam biofilm mampu menyebabkan tingkat resistensi lebih tinggi dibandingkan apabila tidak di dalam biofilm (Bowler, 2018). Biofilm yang terbentuk, menyebabkan suatu bakteri cenderung menjadi resisten terhadap antibiotik. Saat ini masih sangat terbatas informasi mengenai agen antibiofilm yang secara khusus menargetkan biofilm bakteri. Salah satu upaya untuk mengatasi resistensi tersebut yaitu mendapatkan senyawa antibiofilm. Sumber baru untuk mendapatkan senyawa antibiofilm salah satunya yaitu berasal dari *Actinomycetes* (Balasubramanian *et al.*, 2017).

*Actinomycetes* merupakan bakteri gram positif (Li *et al.*, 2016) sebagai salah satu sumber potensial penghasil senyawa metabolit sekunder (Subramani *and* Sipkema, 2019). *Actinomycetes* mampu memproduksi metabolit sekunder seperti terpenoid, sterol, peptida, alkaloid, dan asam lemak (Abdelmohsen *et al.*, 2014). Sebagian besar metabolit sekunder *Actinomycetes* memiliki aktivitas berbeda-beda seperti antibakteri, antijamur, antikanker, atau antimalaria (Subramani *and* Sipkema, 2019), dan antibiofilm (Balasubramanian *et al.*, 2017). *Actinomycetes* pada umumnya dapat ditemukan di lingkungan tanah, air tawar, dan laut. *Actinomycetes* juga dapat hidup di dalam jaringan ataupun organ pada tanaman (Janardhan *et al.*, 2014), serta biota laut seperti *sponge* (El-Hawary *et al.*, 2018) dan *tunicate* (Shaala *et al.*, 2016).

Subramani *and* Sipkema (2019) melaporkan terdapat 97 spesies *Actinomycetes* yang telah berhasil diisolasi dari lingkungan laut pada tahun 2013-2017. Senyawa bioaktif baru sebanyak 167 ditemukan dari 58 spesies *Actinomycetes*. Hal tersebut membuktikan bahwa *Actinomycetes* dapat diperoleh dari lingkungan laut. Saat ini, kajian mengenai potensi *Actinomycetes* asosiasi biota laut masih sangat terbatas. Kondisi ekosistem laut yang ekstrim sering dikaitkan dengan keragaman struktural metabolit yang dihasilkan oleh *Actinomycetes*. Namun jika dibandingkan dengan keanekaragaman *Actinomycetes* di alam, masih belum banyak bioaktivitas *Actinomycetes* yang telah diuji, hal ini memberikan peluang untuk mendapatkan *Actinomycetes* yang dapat memproduksi senyawa metabolit sekunder berbeda (Subramani *and* Aalbersberg, 2013; dan Dhakal *et al.*, 2017).

Berdasarkan uraian di atas, menunjukkan bahwa kajian mengenai senyawa bioaktif dari *Actinomycetes* asosiasi biota laut memiliki aktivitas yang berbeda, namun informasi mengenai metabolit sekunder yang berpotensi sebagai senyawa antibiofilm masih kurang. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan isolasi senyawa antibiofilm dari *Actinomycetes* asosiasi biota laut terhadap *S. aureus* resisten.



## 1.2 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini yaitu:

1. Melakukan skrining antibakteri dan antibiofilm pada ekstrak *Actinomycetes* asosiasi biota laut
2. Mendapatkan senyawa bioaktif sebagai antibiofilm dari *Actinomycetes* asosiasi biota laut

Manfaat dari penelitian ini adalah membuka peluang pengembangan kajian tentang senyawa antibiofilm yang berasal dari *Actinomycetes*.

## 1.3 Kerangka Pemikiran

Peningkatan kasus resistensi bakteri patogen, terhadap berbagai jenis antibiotik merupakan masalah kesehatan global yang serius (WHO, 2020). Fenomena pembentukan biofilm dilaporkan menjadi salah satu penyebab terjadinya peningkatan resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik (Penesyant *et al.*, 2020). Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi peningkatan resistensi yaitu pencarian senyawa antibiofilm dengan pemanfaatan potensi bahan alam seperti *Actinomycetes* (Balasubramanian *et al.*, 2017). *Actinomycetes* dapat ditemui diberbagai tempat salah satunya yaitu dari lingkungan laut. Lautan di Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang berpotensi untuk dimanfaatkan seperti Perairan Bali dan Gorontalo. Saat ini, kajian mengenai potensi *Actinomycetes* asosiasi biota laut masih sangat terbatas, hal ini memberikan peluang untuk mendapatkan senyawa bioaktif baru sebagai antibiofilm.

Upaya yang dilakukan untuk mendapatkan senyawa antibiofilm yaitu dengan skrining antibiofilm dan antibakteri terhadap *S. aureus* resisten dengan metode *Microtiter assay 96 well plate* (Al-Hatmi *et al.*, 2017). Tahap selanjutnya yaitu kultivasi skala besar dan isolasi senyawa antibiofilm dengan teknik kromatografi. Untuk mengetahui potensi fraksi sebagai antibiofilm, maka perlu dilakukan uji antibiofilm lebih lanjut terhadap *S. aureus* resisten. Tahap berikutnya, isolat unggul

*Actinomycetes* penghasil senyawa antibiofilm, perlu dilakukan identifikasi morfologi menggunakan SEM. Analisis menggunakan spektroskopi massa dilakukan untuk mengetahui berat molekul dan rumus molekul dari fraksi aktif antibiofilm.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Actinomycetes*

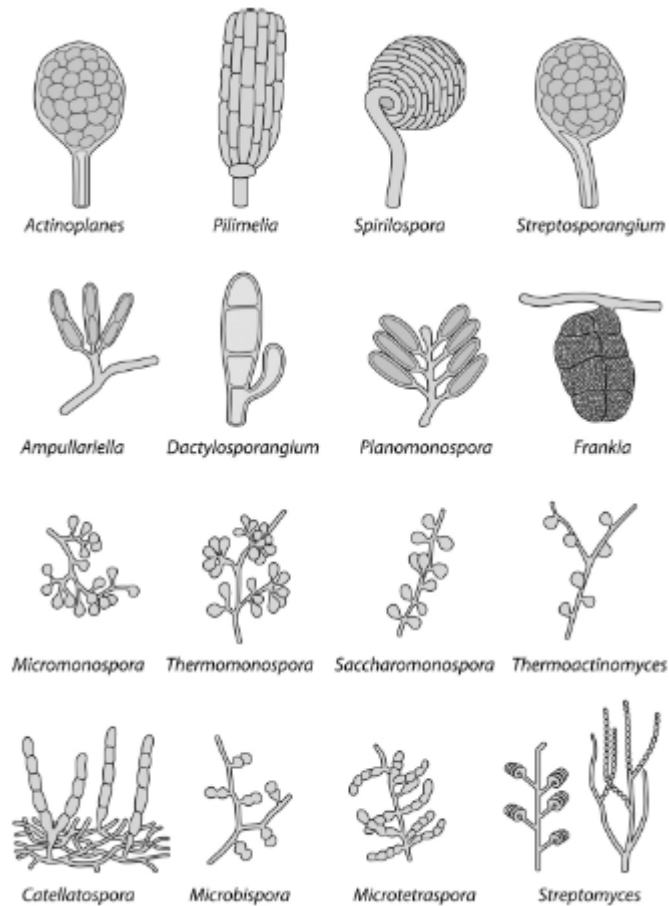
*Actinomycetes* merupakan bakteri gram positif yang memiliki kandungan *Guanine-Cytosine* yang tinggi (Li *et al.*, 2016). *Actinomycetes* termasuk dalam bakteri gram positif karena memiliki kemampuan mempertahankan zat warna kristal violet pada proses pewarnaan (warna biru atau ungu). Pewarnaan tersebut terjadi akibat bakteri gram positif memiliki dinding sel yang tebal dengan susunan peptidoglikan yang berada pada membran terluar sel (Beveridge, 2001).

Klasifikasi dari *Actinomycetes* sp.

*Kingdom* : *Bacteria*  
*Filum* : *Actinobacteria*  
*Class* : *Actinobacteria*  
*Ordo* : *Actinomycetales*  
*Family* : *Actinomycetaceae*  
*Genus* : *Actinomyces*  
*Spesies* : *Actinomyces* sp.

Ciri khas dari *Actinomycetes* yaitu memiliki radial *mycelium* yang dapat berkembang biak menjadi *substrate mycelium* dan *aerial mycelium*. *Substrate mycelium* merupakan *mycelium* primer yang tumbuh dipermukaan media kultur yang berfungsi penyerapan nutrisi untuk pertumbuhan *Actinomycetes*. Pengamatan pada mikroskop, *substrate mycelium* terlihat tipis, transparan, fase-gelap. Secara umum warna *substrate mycelium* dari *Actinomycetes* bervariasi yaitu putih, kuning, orange, abu-abu, merah, hijau, biru, dan ungu. *Aerial mycelium* merupakan hifa yang berkembangbiak dari *substrate mycelium* ke tahap tertentu dan tumbuh ke udara (Li *et al.*, 2016). Secara umum warna *aerial mycelium* dari *Actinomycetes* bervariasi yaitu putih, abu-abu, merah, hijau, biru, dan ungu (Sharma *et al.*, 2014).

Secara morfologi, karakteristik *Actinomycetes* yaitu adanya rantai spora yang dapat diamati dari pertumbuhan miselium substrat dan miselium udara berdasarkan posisi dan jumlah spora, struktur permukaan spora, bentuk sporangia, hal ini sebagai ciri untuk menentukan klasifikasinya, terlihat pada Gambar 1.

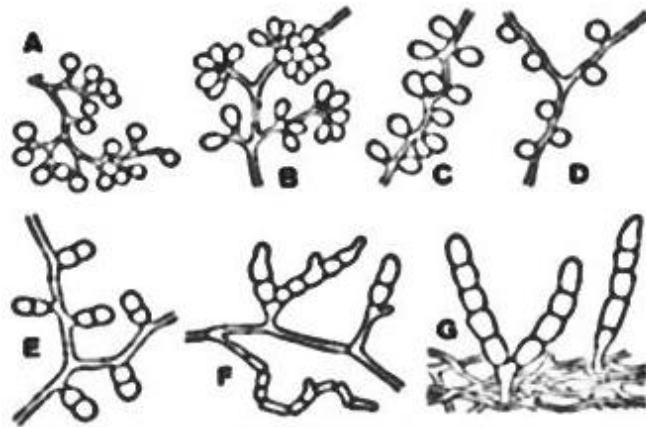


**Gambar 1.** Karakteristik morfologi *Actinomycetes* berdasarkan bentuk, posisi, dan jumlah spora (Barka *et al.*, 2016).

Jenis pembentukan spora pada *Actinomycetes* beragam seperti monospora, *di-* atau *bisporous* (dua spora), *oligosporous* (sedikit spora), dan *polysporous* (banyak spora) (Li *et al.*, 2016). Monospora merupakan *Actinomycetes* yang memiliki spora tunggal seperti *Micromonospora*, *Thermomonospora*, *Saccharomonospora*, dan *Thermoactinomyces* (Gambar 2). *Bisporous* merupakan *Actinomycetes* yang memiliki rantai tidak berpori dan mengandung sepasang spora yang membujur seperti spesies dari genus *Microbispora* (Gambar 2). Pembentukan spora tersusun

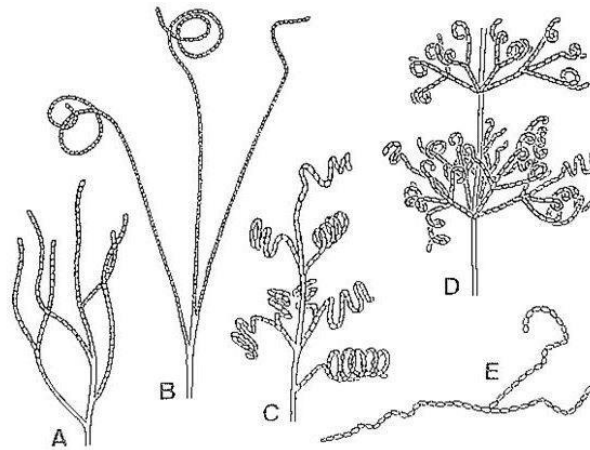


dengan baik dimulai dengan tunas sepanjang *aerial hypae* yang menghasilkan cabang samping yang pendek. *Actinomycetes oligospora* mayoritas memiliki spora 7-10 spora pada setiap rantai, setidaknya ada 3 spora. Oligospora dapat berupa rantai lurus, dikaitkan dengan *loop* terbuka, atau spiral tidak beraturan yang memiliki hingga empat putaran. *Actinomycetes* yang termasuk dalam oligospora yaitu *Nocardia brevicatena* yang membentuk rantai pendek 2-7 spora dan rantai spora dapat bercabang (Li *et al.*, 2016).



**Gambar 2.** Monospora: (A) *Micromonospora*, (B) *Thermomonospora*, (C) *Saccharomonospora*; (D) *Thermoactinomyces*. Disporous: (E) *Microbispora*. Oligosporous: (F) *Nocardia brevicatena*, (G) *Catellatospora* (Li *et al.*, 2016).

Genus *Streptomyces* merupakan *Actinomycetes polysporous* yang membentuk rantai panjang yang memiliki lebih dari 50 spora (Cross, 1970). *Aerial hypae* yang terdapat pada *Streptomyces* berbeda-beda, diantaranya (A) *rectiflexibiles type*, memiliki rantai spora lurus; (B) *retinaculiaperti type*, memiliki rantai spora dengan kait, *loop* terbuka atau spiral pendek tidak beraturan 1-4 putaran; (C) *spira type*, memiliki spora yang berbentuk spiral dengan subtipe: (a) spiral tertutup dan padat; (b) spiral terbuka, bebas, dan melebar; (D) *verticillati type*, memiliki rantai spora melingkar. *Nocardiosis* merupakan genus lain yang memiliki spora dalam rantai panjang, *aerial hypae* berkembang dengan baik, berbentuk lurus-lentur atau zig-zag, sepenuhnya menjadi spora dengan berbagai panjang (Gambar 3) (Meyer, 1989).



**Gambar 3.** *Streptomyces*: (A) *Rectiflexibiles* type, (B) *Retinaculiaperti* type, (C) *Spira* type, (D) *Verticillati* type. *Nocardiopsis*: (E) memecah hifa udara bercabang (Li *et al.*, 2016).

*Actinomycetes* pada umumnya dapat ditemukan di lingkungan tanah, air tawar, dan laut. Beberapa diantaranya dapat hidup di dalam jaringan ataupun organ pada tanaman (Janardhan *et al.*, 2014), serta biota laut seperti *sponge* (El-Hawary *et al.*, 2018) dan *tunicate* (Shaala *et al.*, 2016). Lingkungan laut merupakan sumber menjanjikan untuk mendapatkan *Actinomycetes* langka yang diyakini dapat memproduksi senyawa baru yang masih belum banyak dimanfaatkan (Subramani *and* Aalbersberg, 2013; dan Dhakal *et al.*, 2017). *Actinomycetes* langka sebanyak 80 spesies pada tahun 2007-2013 dilaporkan berasal dari lingkungan laut. *Actinomycetes* tersebut termasuk dalam 23 *family* langka, dengan 3 *family* baru dan 20 genus baru (Subramani *and* Aalbersberg, 2013).

## 2.2 Kultivasi *Actinomycetes*

*Actinomycetes* mampu hidup di lingkungan bernutrisi rendah serta mengonsumsi lignin dan selulosa. Suhu optimum untuk pertumbuhannya berkisar antara 25-30°C. Waktu inkubasi *Actinomycetes* biasanya 7-14 hari (Chavan *et al.*, 2013).

Teknik kultivasi *Actinomycetes* dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu:

- *Solid-State Fermentation (SSF)*

SSF merupakan suatu teknik kultur secara fermentasi menggunakan media padat, seperti ampas tebu. Keuntungan menggunakan teknik ini yaitu media adalah bahan limbah yang kaya nutrisi yang dapat dengan mudah didaur ulang sebagai media. Teknik fermentasi ini, media dimanfaatkan dengan sangat lambat dan terus-menerus, sehingga media yang sama dapat digunakan untuk periode fermentasi yang lama. SSF paling cocok untuk teknik fermentasi yang melibatkan jamur dan mikroorganisme yang membutuhkan kadar air lebih sedikit. SSF tidak dapat digunakan dalam proses fermentasi yang melibatkan organisme yang membutuhkan aktivitas air tinggi (Babu *and* Satyanarayana, 1996).

- *Submerged Fermentation (SmF)/Liquid Fermentation (LF)*

SmF yaitu suatu teknik kultur secara fermentasi menggunakan substrat cair yang mengalir bebas, seperti molase dan kaldu. Substrat dimanfaatkan cukup cepat; karenanya perlu terus-menerus diganti atau ditambah dengan nutrisi. Teknik fermentasi ini paling cocok untuk mikroorganisme seperti bakteri yang membutuhkan kadar air tinggi. Keuntungan tambahan dari teknik ini adalah pemurnian produk lebih mudah.

Siklus pertumbuhan *Actinomycetes* terjadi diawali dengan spora menyesuaikan diri pada kondisi pertumbuhan. Spora yang telah mendapatkan kondisi lingkungan yang menguntungkan akan mengalami pematangan. Spora matang akan berkecambah membentuk pertumbuhan vegetatif yang terstruktur dalam suatu jaringan, sehingga akan menghasilkan miselium primer seperti miselium substrat yang berperan menyerap nutrisi dari media. Miselium primer tumbuh menjadi miselium sekunder yaitu *aerial hyphae* yang tumbuh di atas substrat/media. *Aerial hyphae* akan tumbuh menjadi melingkar dalam kondisi yang tidak menguntungkan (kekurangan unsur hara). Septa akan terbentuk di antara hifa vegetatif yang matang dan membentuk rantai spora. Spora terbentuk oleh fragmentasi atau pembengkakan hifa. Saat terjadi kondisi yang tidak menguntungkan, spora akan dipisahkan dari hifa vegetatif dan hidup bebas di lingkungan (Barka *et al.*, 2016).

Hasil kultivasi *Actinomycetes* sangat bervariasi untuk setiap substrat/media, oleh karena itu sangat penting untuk memilih media yang tepat. Produksi senyawa metabolit sekunder dapat diperoleh secara optimal melalui proses kultivasi dengan memperhatikan media pertumbuhan. *Actinomycetes* dapat tumbuh pada media selektif koloid kitin, hal ini terjadi karena kemampuan *Actinomycetes* dalam menghasilkan enzim kitinase. Enzim kitinase yang ada tersebut, *Actinomycetes* dapat memperoleh sumber karbon dari kitin (Asif *et al.*, 2019; Pramesti and Puspita, 2020). Jeuniaux (1955) melaporkan bahwa *Actinomycetes* mampu tumbuh dalam media agar kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen. Menurut Lingappa and Lockwood (1961), media dengan kitin sebagai sumber karbon dan nitrogen yang selektif untuk pertumbuhan *Actinomycetes*. Produksi senyawa metabolit sekunder pada *Actinomycetes* terjadi pada fase lag, fase stasioner, fase kematian (Harir *et al.*, 2018).

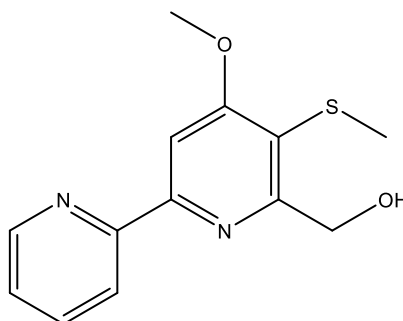
Kondisi lain yang memengaruhi suatu pertumbuhan mikroorganisme yaitu kondisi kultivasi menggunakan *shaker* ataupun secara statis. Hu *et al.* (2018) melaporkan selama kultivasi dengan kondisi statis, proses pertumbuhan miselium suatu mikroorganisme di permukaan bersentuhan dengan konsentrasi oksigen yang lebih tinggi dan hal tersebut yang mungkin menjadi alasan mengapa lapisan miselium eksternal terbentuk lebih cepat dan mengakumulasi tingkat senyawa metabolit sekunder yang jauh lebih tinggi daripada miselium dengan kondisi *shaker*. Keuntungan kultivasi dengan kondisi statis yaitu dapat menghemat biaya untuk produksi metabolit sekunder dari suatu mikroorganisme.

Produksi metabolit sekunder saat proses kultivasi juga dipengaruhi dengan kondisi oksigen yang ada akibat volume media kultivasi yang digunakan. Semakin meningkat volume media kultivasi yang digunakan, maka produksi senyawa metabolit sekunder akan menurun, hal ini menunjukkan bahwa suplai oksigen menjadi salah satu faktor penting yang signifikan (Hu *et al.*, 2018)



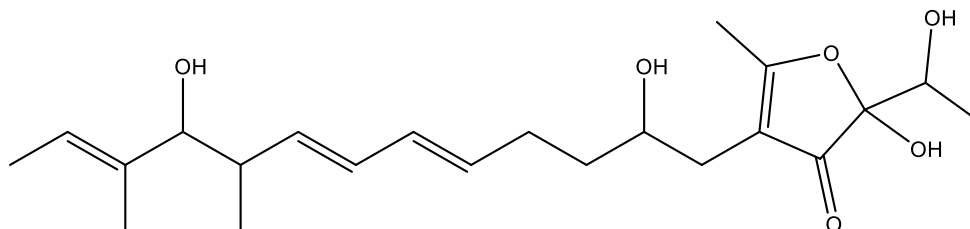


Lee *et al.* (2017) mengisolasi senyawa alkaloid jenis piridin yang diberi nama *collismycin C* dari *Streptomyces* sp. yang memiliki aktivitas menghambat biofilm *S. aureus* resisten pada konsentrasi 50  $\mu\text{g/mL}$  (Gambar 5).



**Gambar 5.** Senyawa *collismycin C* dari *Streptomyces* sp. (Lee *et al.*, 2017).

Driche *et al.* (2017) mengisolasi senyawa 5-[(5E,7E,11E)-2,10-dihydroxy-9,11-dimethyl-5,7,11tridecatrien-1-yl]-2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-4-methyl-3(2H)-furanone dari *Streptomyces* sp. yang memiliki aktivitas menghambat biofilm *S. aureus* resisten pada konsentrasi 10-15  $\mu\text{g/mL}$  (Gambar 6).



**Gambar 6.** Senyawa antibiofilm dari *Streptomyces* sp. (Driche *et al.*, 2017).

## 2.4 Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

### 2.4.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan komponen-komponen senyawa pada suatu sampel menggunakan pelarut tertentu. Prinsip ekstraksi didasarkan pada distribusi senyawa yang terlarut dalam dua pelarut yang tidak saling melarutkan (Khopkar, 2002).

Pemilihan pelarut merupakan suatu hal yang sangat penting diperhatikan pada proses ekstraksi. Hal yang perlu dipertimbangkan dalam pemilihan pelarut yaitu selektivitas, kelarutan, biaya, dan keamanan. Berdasarkan sifat *like dissolve like*, pelarut dengan sifat polaritas yang mendekati polaritas zat terlarut cenderung menjadi pilihan untuk mendapatkan hasil ekstraksi yang lebih baik dan sebaliknya (Zhang *et al.*, 2016). Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu metode ekstraksi cair-cair.

#### **2.4.1.1 Ekstraksi Cair-Cair (Partisi)**

Partisi merupakan suatu proses pemisahan komponen campuran didasarkan pada prinsip distribusi zat terlarut (analit) antara dua pelarut yang tidak saling bercampur. Komponen campuran biasanya terdiri dari fase air dan fase organik, seperti diklorometan, dietil eter, etil asetat, atau kloroform. Komponen campuran yang tidak saling bercampur akan membentuk dua lapisan dan zat yang memiliki massa jenis lebih besar berada di bawah, sedangkan zat dengan massa jenis lebih kecil berada di atas. Berdasarkan sifat *like dissolve like*, suatu senyawa yang bersifat polar akan terbawa dalam pelarut polar, sedangkan senyawa semipolar akan terbawa dalam pelarut yang bersifat semipolar, dan senyawa yang bersifat nonpolar akan terbawa dalam pelarut bersifat nonpolar (Khopkar, 2002).

Suatu sampel campuran yang terdiri dari senyawa polar dan nonpolar dapat dilakukan pemisahan menggunakan teknik partisi. Pemisahan dengan teknik partisi dilakukan menggunakan corong pisah dengan cara larutan sampel campuran yang akan dipisahkan dikocok dengan tujuan memperluas area permukaan kontak di antara kedua pelarut sehingga pendistribusian zat terlarut di antara keduanya dapat berlangsung dengan baik. Syarat pelarut dalam tahap ekstraksi yaitu memiliki sifat kepolaran yang sesuai dengan senyawa yang akan diekstraksi serta harus terpisah setelah proses pengocokan (Khopkar, 2002).

## 2.4.2 Kromatografi

Kromatografi adalah teknik pemisahan komponen pada suatu campuran yang didasarkan atas perbedaan laju distribusi komponen-komponen campuran tersebut diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam (adsorben) bertindak sebagai pemisah campuran sedangkan fase gerak (eluen) bertindak sebagai pembawa campuran. Prinsip kerja dari teknik kromatografi yaitu proses pemisahan komponen-komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dengan pelarut yang digunakan. Berdasarkan karakteristik molekul dan tipe interaksi, kromatografi bermacam-macam yaitu adsorpsi permukaan (padat-cair), pertukaran ion, partisi (padat-cair), dan perbedaan berat molekul atau afinitas. Teknik kromatografi lainnya didasarkan pada fasa diam, yaitu kromatografi kolom, lapis tipis, dan kertas (Ismail *and* Nielsen, 2010). Penelitian ini dilakukan pemisahan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom (KK).

### 2.4.2.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan suatu metode pemisahan yang didasarkan pada perbedaan adsorpsi dan afinitas suatu komponen campuran oleh fase diam terhadap fase gerak (eluen) (Hostettman dkk., 1995). Proses pemisahan pada teknik KLT yaitu menggerakkan eluen di atas permukaan fase diam, dimana suatu senyawa yang teradsorpsi lebih kuat pada fase diam, maka perpindahan yang terjadi tidak akan jauh ( $R_f$  rendah), sebaliknya jika senyawa yang teradsorpsi lebih lemah maka perpindahan yang terjadi akan semakin cepat mengikuti pergerakan eluen ( $R_f$  tinggi) (Kumar *et al.*, 2013). Data yang diperoleh dari uji KLT yaitu memberikan informasi mengenai komponen dalam sampel serta tingkat kepolaran komponen dalam suatu senyawa.

Mekanisme pada proses KLT yaitu suatu sampel ditotolkan pada fase diam dengan jumlah tertentu, kemudian dielusi menggunakan eluen yang sesuai hingga tanda batas. Pada proses elusi tersebut akan terjadi perpindahan komponen sesuai dengan afinitasnya di atas permukaan fase diam. Fase diam pada KLT pada umumnya

berupa silika gel yang bersifat elektropositif, hal ini yang menyebabkan silika bersifat sangat polar. Proses KLT menggunakan plat silika yang bersifat polar, menyebabkan suatu senyawa polar memiliki afinitas besar dan bergerak lambat akibat adanya interaksi antara senyawa dengan gugus –OH yang terdapat pada silika (nilai  $R_f$  kecil) sedangkan eluen akan naik cepat membawa senyawa non polar yang tidak berinteraksi dengan fase diam (silika) (Kumar *et al.*, 2013). Setelah dielusi, proses yang dilakukan yaitu deteksi bercak dengan 2 cara, yaitu secara fisika dan kimia. Fase diam lain pada KLT dapat berupa lempeng  $C_{18}$ . Bagian ujung pada fase diam  $C_{18}$  diikat oleh karbon 18, hal ini yang menyebabkan fase diam tersebut bersifat nonpolar maka akan terikat pada senyawa bersifat nonpolar.

Deteksi bercak secara fisika, dilakukan menggunakan sinar UV yang akan menampilkan senyawa yang mengalami fluoresensi. Panjang gelombang UV yang umum digunakan yaitu 254 nm dan 366 nm. Deteksi bercak secara kimia, dilakukan menggunakan pereaksi spesifik yang kemudian dipanaskan dengan tujuan untuk mengoksidasi sampel organik yang akan tampak sebagai bercak berwarna sesuai pereaksi yang digunakan. Pereaksi yang biasa digunakan yaitu Dragendorff, ninhidrin, dan serium sulfat. Pada pereaksi Dragendorff, ditandai dengan noda *orange* yang mengindikasikan adanya N tersier (senyawa alkaloid) dalam suatu sampel. Pereaksi ninhidrin, saat uji ditandai dengan adanya noda ungu yang mengindikasikan terdapat gugus  $NH_2$  dan noda orange/kuning adanya gugus  $NH$  pada sampel. Hasil uji positif pada serium sulfat ditandai dengan noda coklat kehitaman yang memberikan informasi adanya kandungan senyawa organik dalam sampel.

Distribusi komponen senyawa pada uji KLT biasa disebut sebagai  $R_f$  (*Retention factor*), secara sistematis ditentukan dengan rumus sebagai berikut:

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

Nilai  $R_f$  yang diperoleh akan semakin besar apabila jarak yang ditempuh senyawa pada fase diam semakin besar. Saat membandingkan dua sampel yang berbeda di bawah kondisi kromatografi yang sama, bila suatu sampel memiliki nilai  $R_f$  yang



sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki karakteristik yang sama atau mirip (Kumar *et al.*, 2013).

#### **2.4.2.2 Kromatografi Kolom (KK)**

Kromatografi kolom adalah suatu metode yang sering digunakan untuk pemisahan dan pemurnian senyawa dalam suatu campuran. Prinsip utama kromatografi kolom yaitu proses pemisahan komponen campuran berdasarkan perbedaan interaksi daya serap atau partisi suatu fase diam terhadap komponen-komponen sampel yang akan dipisahkan yang digerakkan oleh fase gerak (eluen) (Ismail *and* Nielsen, 2010).

Suatu sampel yang akan dipisahkan dilarutkan dengan eluen yang sesuai, kemudian dibiarkan mengalir melewati fase diam dengan adanya gaya gravitasi, maka akan terjadi perbedaan kecepatan pada masing-masing komponen sampel, perbedaan tersebut tergantung pada afinitas suatu zat terhadap fase diam. Dalam kolom akan terjadi kesetimbangan antara zat terlarut yang diadsorpsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom, sehingga terjadi pola pemisahan dari masing-masing komponen senyawa. Komponen yang memiliki adsorpsi dan afinitas yang rendah terhadap fase diam, akan cepat keluar dibandingkan dengan komponen yang memiliki adsorpsi dan afinitas yang lebih besar terhadap fase diam (Ismail *and* Nielsen, 2010).

Pada teknik kromatografi kolom digunakan kolom yang terbuat dari kaca yang ditempatkan secara vertikal, sehingga pada proses pemisahan, zat dapat turun dengan bantuan gaya gravitasi. Pada kolom, terdapat keran yang berfungsi untuk mengatur aliran eluen sehingga dapat mengatur zat yang akan ditampung dalam wadah. Fase diam merupakan bahan padat yang memiliki sifat adsorpsi yang baik sesuai untuk memisahkan zat. Fase diam yang umum digunakan yaitu silika gel yang bersifat polar dan C<sub>18</sub> bersifat nonpolar. Fase gerak merupakan pelarut yang digunakan sebagai eluen yang umumnya digunakan dengan variasi kepolaran pelarut untuk menghasilkan pemisahan yang optimum.

## 2.5 Karakterisasi Fraksi Aktif

### 2.5.1 Bioassay

#### 2.5.1.1 Bakteri

Bakteri merupakan mikroorganisme mikroskopis (kurang dari 10  $\mu\text{m}$ ) yang memiliki sel tunggal dengan struktur internal sederhana yang tidak memiliki membran inti sel. Bakteri berdasarkan bentuknya digolongkan menjadi tiga yaitu:

- Bakteri bundar yang disebut cocci (coccus), contohnya *S. aureus*
- Bakteri spiral yang disebut spirilla (spirillum), contohnya *Spirillum minor*
- Bakteri berbentuk kapsul yang disebut basil (bacillus), contohnya *B. subtilis*

Berdasarkan pewarnaan gram, bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Perbedaan tersebut didasarkan pada kemampuan suatu bakteri mempertahankan zat warna seperti kristal violet pada proses pewarnaan. Bakteri Gram positif berwarna biru atau ungu sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah. Hal ini terjadi karena peptidoglikan (dinding sel) pada Gram positif jauh lebih besar, akibatnya zat warna seperti kristal violet mengendap di dinding sel yang menebal dan tidak dielusi oleh alkohol saat proses pencucian zat warna. Bakteri Gram negatif, saat proses pencucian zat warna, zat warna (kristal violet) mudah dielusi dari bakteri (Beveridge, 2001).

Kurva pertumbuhan bakteri menunjukkan jumlah sel hidup dalam populasi bakteri selama periode waktu tertentu. Terdapat empat fase berbeda dari kurva pertumbuhan bakteri, yaitu:

- Fase awal (fase lag) merupakan fase suatu bakteri menyesuaikan diri dengan kondisi pertumbuhan, di mana bakteri individu menjadi dewasa dan belum dapat membelah.
- Fase eksponensial (log) adalah waktu pertumbuhan eksponensial, fase ini merupakan periode yang ditandai dengan penggandaan sel.

- Fase stasioner (fase diam), terjadi disebabkan oleh penghambatan pertumbuhan seperti penipisan nutrisi. Pada fase diam, pertumbuhan mencapai titik optimum karena jumlah sel yang mati sama dengan jumlah sel yang membelah.
- Fase kematian ditandai dengan penurunan jumlah sel hidup (bakteri mati).

*S. aureus* adalah salah satu bakteri Gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2  $\mu\text{m}$ , tersusun dalam kelompok yang tidak teratur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37°C. *S. aureus* dapat membentuk biofilm serta dapat menyebabkan infeksi pada kulit, hidung, uretra, vagina, dan saluran pencernaan. Berdasarkan data yang dirilis oleh Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Amerika Serikat pada 5 Maret 2019, menunjukkan bahwa infeksi dari *Staphylococcus aureus* adalah masalah utama di Amerika Serikat, terjadi 2,8 juta infeksi akibat resistensi bakteri setiap tahunnya dan lebih dari 35.000 orang meninggal (CDC, 2019).

Bakteri patogen mampu menyebabkan berbagai penyakit terhadap makhluk hidup. Salah satu upaya untuk mengatasi berbagai penyakit akibat bakteri yaitu dengan antibiotik. Antibiotik adalah senyawa kimia yang berasal dari atau diproduksi oleh organisme hidup, yang dalam konsentrasi kecil, dapat digunakan untuk mengatasi penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen. Bakteri patogen memiliki kemampuan dengan menolak kerja sistem imun maupun menciptakan suatu resistensi bakteri terhadap antibiotik. Resistensi antimikroba merupakan masalah kesehatan serius yang dialami masyarakat di dunia.

Mekanisme utama dari resistensi (Reygaert, 2018) yaitu:

- Bakteri dapat menghasilkan pompa pembuangan yang berada di membran atau dinding selnya. Pompa pembuangan ini sangat umum terjadi pada bakteri dan dapat mengangkut berbagai senyawa seperti molekul sinyal dan nutrisi. Pompa juga dapat mengangkut antibiotik ke luar dari bakteri, hal ini dapat menurunkan konsentrasi antibiotik di dalam sel bakteri. Dalam beberapa kasus, mutasi pada DNA bakteri dapat membuat bakteri menghasilkan lebih banyak pompa tertentu, hal ini dapat meningkatkan resistensi.

- Menurunkan permeabilitas membran yang mengelilingi sel bakteri. Perubahan tertentu pada membran bakteri membuatnya lebih sulit untuk dilewati, dengan cara ini, lebih sedikit antibiotik yang masuk ke dalam bakteri.
- Menghancurkan antibiotik. Ada enzim bakteri yang dapat menonaktifkan antibiotik. Contohnya adalah enzim  $\beta$ -laktamase yang dapat menghancurkan komponen aktif penisilin (cincin  $\beta$ -laktam), antibiotik yang sangat penting untuk mengobati infeksi manusia.
- Ubah antibiotik. Bakteri terkadang dapat menghasilkan enzim yang mampu menambahkan kelompok kimia yang berbeda ke dalam antibiotik. Hal ini pada gilirannya melarang pengikatan antara antibiotik dan targetnya di dalam sel bakteri.

Penyebab lain yang dapat meningkatkan terjadinya resistensi yaitu adanya pembentukan biofilm pada bakteri. Fenomena pembentukan biofilm oleh bakteri patogen merupakan salah satu faktor penyebab peningkatan resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik (Penesyant *et al.*, 2020).

Mekanisme umum resistensi akibat biofilm yaitu matriks biofilm membatasi proses difusi suatu antibiotik akibat kelebihan produksi EPS (Tseng *et al.*, 2013); enzim dalam matriks biofilm dapat menonaktifkan molekul antibiotik (Fux *et al.*, 2005); dan sel-sel yang tidak aktif secara metabolik di lapisan biofilm yang lebih dalam menunjukkan respons stres adaptif yang mengatur daya tahan biofilm yang disebabkan oleh kekurangan nutrisi, faktor ekologi, dan beberapa respons adaptif lainnya seperti SOS dan respons yang ketat (Harms *et al.*, 2016; Ciofu and Tolker-Nielsen, 2019; Soares *et al.*, 2012).

### **2.5.1.2 Antibakteri**

Antibakteri merupakan senyawa yang dapat mengganggu pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri dengan cara mengganggu metabolisme suatu bakteri tersebut. Senyawa antibakteri dapat digunakan jika hanya memiliki sifat toksik selektif yaitu hanya dapat membunuh bakteri yang menyebabkan suatu penyakit

tanpa bersifat beracun bagi penderitanya. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri, secara umum yaitu dengan cara merusak dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat serta protein (Brooks *et al.*, 2013). Penentuan aktivitas senyawa antibakteri dapat diuji dengan metode secara difusi ataupun dilusi, yaitu:

- Metode difusi

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, yaitu menggunakan difusi agar. Pada metode ini, dilakukan inokulasi bakteri secara merata pada media permukaan agar, kemudian sampel akan ditempatkan di atas permukaan tersebut. Sampel tersebut kemudian akan berdifusi ke media agar yang telah ditumbuhi bakteri, sehingga sampel akan menghambat pertumbuhan bakteri. Pengamatan yang dilakukan pada metode difusi didasarkan pada pengukuran zona bening di sekeliling cakram. Zona bening yang tampak mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan bakteri, yang menunjukkan senyawa tersebut berpotensi sebagai antibakteri (Brooks *et al.*, 2013).

- Metode dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang pada umumnya menggunakan variasi konsentrasi sampel (pengenceran). Metode ini dilakukan dengan cara mencampurkan suatu sampel dengan media yang diinokulasi dengan suatu bakteri. Keuntungan dari metode dilusi yaitu dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum suatu sampel yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Madigan *et al.*, 2015).

### 2.5.1.3 Biofilm

Biofilm adalah lapisan yang terbentuk oleh koloni sel-sel mikroba dan melekat pada permukaan substrat, berada dalam keadaan diam, berlendir, dan tidak mudah terlepas. Biofilm mengandung *extracellular polysaccharides substance* (EPS) yang berfungsi untuk melekatkan diri dan melindungi sel-sel bakteri tersebut (Gowrishankar *et al.*, 2012).

Mekanisme pembentukan biofilm yaitu sebagai berikut (Reygaert, 2018):

- Fase pelekatan (*adhesion* atau *adherence*)  
Pembentukan biofilm dimulai dengan melekatnya bakteri ke permukaan yang bertindak sebagai substrat untuk adhesi mikroba, berlanjut dengan agregasi yang dibentuk oleh adhesi sel-sel. Pada tahap pelekatan awal, sel-sel bakteri tidak melekat dengan kuat (*reversible*) akibat adanya interaksi mikroba dengan permukaan.
- Fase pematangan  
Bakteri yang sudah melekat pada permukaan jaringan/substrat, pembentukan mikrokoloni segera terjadi. Bakteri akan mengalami multiplikasi/proliferasi dan sambil mengalami *quorum sensing* (QS) yaitu mengeluarkan sinyal kimia yang berguna untuk berkomunikasi kepada bakteri-bakteri di sekitarnya. Hal ini terjadi agar jumlah sel mencukupi, saat jumlah sel mikroba sudah cukup banyak, maka hal ini akan memicu pembentukan biofilm. Bakteri akan memproduksi EPS, yang berfungsi untuk melekatkan bakteri yang telah bereplikasi, membentuk mikrokoloni. Mikrokoloni ini menyebabkan perlekatan bakteri dengan permukaan jaringan menjadi lebih stabil. Sel-sel yang melekat dengan kuat pada permukaan substrat, akan bergabung melalui interaksi antarsel. Pada fase pematangan, biofilm akan terus tumbuh seiring dengan pertumbuhan koloni.
- Fase pelepasan  
Pada tahap ini, sel-sel melepaskan diri dari biofilm berubah menjadi keadaan *planktonik* yang dapat menyebar dan berkolonisasi di tempat lain untuk pembentukan biofilm baru. Pelepasan dapat terjadi akibat ketersediaan nutrisi mulai habis.

Biofilm pada suatu bakteri mampu melindungi bakteri dari serangan luar termasuk serangan antibiotik. Akibat adanya biofilm tersebut, menyebabkan adanya permasalahan baru yaitu efektifitas antibiotik terhadap bakteri menjadi menurun, sehingga biofilm yang terbentuk mampu menyebabkan suatu resistensi bakteri terhadap suatu antibiotik. Telah dibuktikan bahwa bakteri patogen dalam biofilm mampu menyebabkan tingkat resistensi lebih tinggi dibandingkan apabila tidak di

dalam biofilm (Bowler, 2018). Oleh karena itu, untuk mengatasi infeksi biofilm tersebut, maka diperlukan senyawa antibiofilm.

#### 2.5.1.4 Antibiofilm

Antibiofilm adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm yang mengakibatkan suatu bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik. Secara umum, studi tentang agen antibiofilm berkaitan dengan pencegahan pembentukan biofilm, gangguan atau penyebaran biofilm, dan pembunuhan bakteri, terutama subpopulasi yang tersisa (Bhattacharya *et al.*, 2015). Beberapa strategi mengatasi biofilm yaitu:

- Fase pertama dalam pembentukan biofilm yaitu proses perlekatan (bergantung apakah bakteri *S. aureus* menempel pada permukaan abiotik atau biotik). Oleh karena itu, strategi dalam mengatasi biofilm melibatkan pengembangan pelapisan antibakteri untuk mencegah perlekatan bakteri. Windolf *et al.* (2014) membuktikan strategi implan ortopedi dilapisi dengan *lysostaphin* (antibakteri) mampu mengurangi pertumbuhan bakteri (model mencit). Strategi ini digunakan untuk mengatasi infeksi biofilm pada permukaan buatan atau abiotik seperti seperti kaca, logam (Co-Cr, 316SS, titanium) dan plastik (poliester, silikon, polietilen).
- Agen pendegradasi matriks  
Matriks ekstraseluler biofilm terdiri dari protein, DNA ekstraseluler (eDNA), dan polisakarid yang dapat menjadi penghalang untuk melindungi bakteri dalam biofilm dari serangan luar seperti antibiotik. Matriks tersebut mampu menghambat penerobosan senyawa antibiotik ke dalam biofilm, sehingga memperlambat fungsi antibiotik dalam membunuh bakteri. Strategi mengatasi hal tersebut dengan mencari agen pendegradasi matriks yang diduga melindungi bakteri sehingga melumpuhkan fungsi antibiotik dalam menyerang bakteri.



### 2.5.2 *Mass Spectroscopy (MS)*

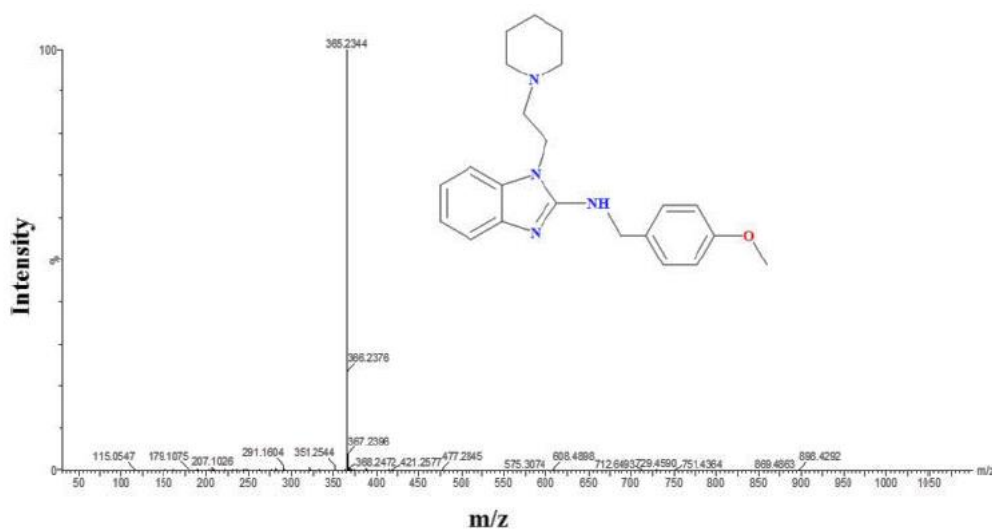
*Mass Spectroscopy (MS)* merupakan suatu teknik analisis yang digunakan untuk mengetahui berat molekul (g/mol) serta rumus molekul dari suatu senyawa yang dianalisis. Prinsip spektroskopi massa yaitu suatu sampel dalam keadaan gas akan dibombardir oleh energi dengan elektron yang tinggi (energi potensial ionisasi rata-rata 185-300 kkal/mol), dapat menyebabkan elektron dari molekul yang terdapat dalam sampel akan lepas dan menghasilkan ion organik (Silverstein *et al.*, 2005).

*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LCMS/MS)* merupakan salah satu teknik yang digunakan untuk analisis senyawa bahan alam. LCMS adalah teknik analisis yang menggabungkan pemisahan kromatografi resolusi tinggi dengan deteksi spektrometer massa yang sensitif dan spesifik. Pada LC-MS, sampel yang diinjeksikan, akan dipisahkan dalam perangkat LC, komponen yang sudah dipisahkan akan disemprotkan ke sumber ion tekanan atmosfer, sehingga akan diubah menjadi ion dalam fasa gas. *Mass analyzer* kemudian digunakan untuk mengurutkan ion menurut rasio massa terhadap muatannya dan detektor menghitung ion yang muncul dari *mass analyzer* dan juga dapat memperkuat sinyal yang dihasilkan dari setiap ion. Spektrum massa yang dihasilkan, digunakan untuk menentukan massa partikel dan molekul serta untuk menjelaskan struktur kimia molekul (Korfmacher, 2005).

Umumnya MS terdiri dari sumber ionisasi, *mass analyzer*, *mass spectrometric data acquisition*. Salah satu sumber ionisasi yaitu *electrospray ionization (ESI)*. *Elektrospray* diproduksi dengan menerapkan medan listrik yang kuat ke cairan yang melewati tabung kapiler dengan fluks yang lemah. Sensitivitas pendeteksian pada teknik ini dibatasi pada 10-8  $\mu\text{L}$  dan membutuhkan volume yang besar untuk meningkatkan kepekaan pendeteksian. Kelemahan sumber ionisasi ESI adalah sensitivitas yang buruk, fragmentasi rendah, dan sumber tidak stabil. Prinsip teknik APCI melibatkan nebulasi fase gerak dengan gas nitrogen dan penguapan dengan memanaskan hingga suhu yang relatif tinggi (di atas 400°C). MALDI adalah teknik ionisasi untuk molekul besar dan/atau labil seperti peptida, protein, polimer (Calderaro *et al.*, 2014).

*Analyzer* adalah komponen spektrometer massa yang mengambil molekul terionisasi dan memisahkannya berdasarkan rasio muatan terhadap massa dan mengeluarkannya ke detektor kemudian molekul tersebut dideteksi dan diubah menjadi keluar digital. *Time of Flight (TOF) analyzer* adalah salah satu alat *analyzer*. *Time of Flight (TOF) analyzer*, prinsip kerjanya yaitu pembentukan ion dari sumber ion dan akan dipercepat menjadi kecepatan tinggi oleh medan listrik yang ada di 'tabung penyimpanan' instrumen. Ion yang dipercepat akan dideteksi oleh detektor dengan mode linier atau mode refleksi (Chernushevich *et al.*, 2001).

Salah satu senyawa alkaloid dari *Actinomycetes* yang telah berhasil dianalisis menggunakan MS yaitu senyawa golongan benziimidazol terlihat pada Gambar 7. Fraksi aktif C38BK2FA golongan alkaloid diisolasi dari *Kocuria palustris* 19C38A1, hasil analisis menggunakan ESI TOF MSMS, menunjukkan puncak ion molekul  $[M+H]^+$  pada  $m/z$  365,2344 dengan rumus molekul  $C_{22}H_{28}N_4O$  (Setiawan *et al.*, 2022).



**Gambar 7.** Spektrum ESI TOF MSMS fraksi C38BK2FA (Setiawan *et al.*, 2022).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilakukan pada bulan Maret - Desember 2021 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Identifikasi isolat unggul dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Analisis LCMS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik, Bogor.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas di antaranya: pipet tetes, gelas kimia, Erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi. Alat-alat lainnya seperti tip, mikropipet, *microplate* 96-well IWAKI, ose, spatula, *ring*, spirtus dan alat pemantik, *cell spreader*, *microtube*, *wrapp*, label. Alat-alat instrumen seperti *autoclave* Tomy SX-700 *High Pressure Steam Sterilizer*, mikroskop Zeiss *Axioo imager A1*, *laminar air flow* ESCO, *incubator* CO<sub>2</sub> memmert 2007, seperangkat alat *vacuum rotary evaporator* Buchii/Rotavator R-210, neraca analitik KERN ABJ/BBJ-220-4M, satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat aluminium silika gel F<sub>254</sub> (Merck) dan lampu UV Kohler/SN402006, set perlengkapan kromatografi kolom dengan fase diam silika gel 60 (Merck), *microplate reader* (*hospitex diagnostic/plate screen*), SEM EVO.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu limbah kulit udang, akuades, HCl pekat, NaOH, *artificial sea water* (ASW) (NaCl 22100 mg/L, MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O 9900 mg/L, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

3900 mg/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 1500 mg/L, NaHCO<sub>3</sub> 190 mg/L, KCl 610 mg/L, KBr 96 mg/L, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O 78 mg/L, SrCl<sub>2</sub> 13 mg/L, NaF 3 mg/L, LiCl 1 mg/L dan lainnya 0,12 mg/L), agar, *nutrient* agar (NA) (1.05450.0500), glukosa, *tryptic soy broth* (TSB) (1.05459.0500), alkohol 70%, diklorometan (DCM), metanol (MeOH), *n*-heksana, etil asetat, butanol, isopropil alkohol, kristal violet (1.01408.0025), *resazurin*, etanol, pereaksi Dragendorff, pereaksi serum sulfat, pereaksi ninhidrin. Cara pembuatan pereaksi serum sulfat dan Dragendorff terlihat pada **Lampiran 2**.

### 3.3 Metode

#### 3.3.1 Biomaterial

Pada penelitian ini diperoleh 12 strain *Actinomycetes* dari deposit Unit Pelayanan Teknis Laboratorium Terpadu Pusat Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Strain *Actinomycetes* diisolasi dari organisme laut yang diambil secara acak dengan teknik selam SCUBA pada kedalaman 10-30 meter pada koordinat 8°07'20.9" S-114°34'03.8" E di perairan Buleleng, Bali pada tahun 2018 dan di perairan Teluk Oluhuta, Gorontalo pada tahun 2019 pada koordinat 0°25'11.9" N-123°08'31.8" E. *Staphylococcus aureus* resisten diperoleh dari deposit RSUD Abdoel Moelek, Bandar Lampung yang diisolasi dari kulit pasien. Isolat *S. aureus* diremajakan pada media 2% (b/v) NA (Wijesinghe *et al.*, 2018).

#### 3.3.2 Persiapan Limbah Kulit Udang dan Koloid Kitin

Limbah kulit udang diperoleh dari pasar bebas di kawasan Teluk Betung, Bandar Lampung. Limbah dibersihkan dan dikeringkan (pada oven 55°C semalam) untuk mendapatkan kulit udang kering yang digunakan sebagai bahan baku substrat. Pembuatan koloid kitin mengacu pada metode Hsu *and* Lockwood (1975) dengan beberapa modifikasi. Limbah kulit udang didemineralisasi menggunakan HCl 6N

(1:10), kemudian di deproteinasi menggunakan NaOH 10%. Hasil deproteinasi dikeringkan dalam oven (pada oven 55°C semalam) dan ditimbang berat yang diperoleh, produk yang diperoleh merupakan kitin. Kitin yang didapat selanjutnya ditambahkan HCl pekat (1:10 w/v) dan diaduk selama 2 jam, dinetralkan hingga pH 7. Filtrat dan endapan dipisahkan menggunakan sentrifius 6000 rpm, 4°C, selama 10 menit. Produk koloid kitin netral disimpan dalam kulkas 4°C.

### **3.3.3 Analisis Makroskopis *Actinomyces***

Peremajaan isolat *Actinomyces* dilakukan menggunakan metode Hsu and Lockwood (1985) dengan beberapa modifikasi. Isolat *Actinomyces* diremajakan dalam media 1% koloid kitin dan 2% NA dalam ASW. *Actinomyces* selanjutnya diamati secara makroskopis berupa warna *aerial mycelium* dan *substrate mycelium*.

### **3.3.4 Analisis Mikroskopis *Actinomyces***

Susunan spora dan struktur sporulasi diamati secara mikroskopis menggunakan metode kultur *cover slip* mengacu pada Kawato and Shinobu (1959). Isolat digores pada *cover slip* steril yang telah dimasukkan di tengah pelat agar kitin 1% dengan sudut kemiringan 45°. Setelah 7 hari diinkubasi pada suhu 30°C, *cover slip* dilepas dan diletakkan di atas kaca objek yang bersih. Spora diamati di bawah mikroskop *Zeiss Axioo Imager A1* (400 M).

### **3.3.5 Skrining Senyawa Bioaktif *Actinomyces***

Isolat *Actinomyces* dikultivasi dalam media cair koloid kitin mengacu pada Hsu and Lockwood (1975) dengan beberapa modifikasi. Inokulum dibuat menggunakan 5 mL media koloid kitin 1% (b/v) yang dilarutkan dalam ASW. Setelah tumbuh, kultur ditambahkan (1:10) ke media koloid kitin baru sebanyak 50 mL pada

erlenmeyer 250 mL, kemudian diinkubasi hingga 14 hari pada suhu 30°C dalam kondisi statis. *Actinomycetes* yang dikultur selanjutnya diekstraksi menggunakan metanol, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm untuk memisahkan supernatan dan residu. Supernatan yang diperoleh dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 122 mbar. Ekstrak kasar dibuat larutan stok 2 mg/mL untuk skrining antibakteri dan 0,5 mg/mL untuk skrining antibiofilm.

### 3.3.5.1 Uji Ketahanan *Staphylococcus aureus*

Uji ketahanan *disk diffusion* (Bauer *et al.*, 1966) digunakan untuk mengetahui pola resistensi antibiotik pada bakteri dengan beberapa modifikasi. Menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2017), 8 antibiotik umum digunakan yaitu *clindamycin* 2 µg (CDM), *doxycycline hyclate* 30 µg (DCH), *ciprofloxacin* 5 µg (CFX), *cefadroxil* 30 µg (CFDX), *lincomycin* 2 µg (LC), *amoxicillin* 25 µg (AMX), *amoxicillin clavulanate* 30 µg (AMX-CL), dan *erythromycin* 15 µg (ERH). *S. aureus* dipelihara pada 2% (w/v) *nutrient agar* (NA). Inokulum disesuaikan dengan kekeruhan standar 0,5 McFarland (OD<sub>630</sub> 0,08-0,1). Setelah 18 jam diinkubasi, diukur zona bening untuk setiap antibiotik.

### 3.3.5.2 Skrining Antibakteri

Isolat *Actinomycetes* selanjutnya dilakukan skrining antibakteri. Metode pengujian antibakteri mengacu pada CLSI (2017) dengan beberapa modifikasi. Pengujian dilakukan dengan menggunakan *microplate 96-well*. Mula-mula disiapkan kultur *S. aureus* dalam media NA selama 18 jam. Inokulum bakteri selanjutnya disiapkan dengan cara, koloni *S. aureus* diambil dan dimasukkan dalam wadah, inokulum kemudian disesuaikan dengan kekeruhan standar 0,5 McFarland (OD<sub>630</sub> 0,08-0,1) (Blando *et al.*, 2019) dan diencerkan menjadi 1:100. Pengujian dilakukan dalam 3 ulangan, masing-masing *well* diisi 145 µL media TSB, 25 µL inokulum bakteri, 50

$\mu\text{L}$  larutan kloramfenikol 2 mg/mL sebagai kontrol positif, 50  $\mu\text{L}$  MeOH 12,5% sebagai kontrol negatif, dan 50  $\mu\text{L}$  ekstrak metanol 2 mg/mL sebagai senyawa uji. Proses inkubasi dilakukan selama 18 jam pada suhu 37°C. Setelah itu ditambahkan resazurin dan dilakukan pengukuran nilai OD<sub>630</sub> menggunakan *hospitex diagnostic* pada 630 nm.

### 3.3.5.3 Uji Pembentukan Biofilm

Metode uji pembentukan biofilm mengacu pada Kwasny *and* Opperman (2010) menggunakan *microplate 96-well*. *S. aureus* dikultur pada 2% (b/v) NA. Inokulum disiapkan dengan mengencerkan biakan semalam 1:100 dalam media uji. Media yang digunakan adalah TSB yang mengandung glukosa 0,25% dengan cara membuat 1,88 ml glukosa 40% dan ditambahkan 100 mL TSB. Inokulum sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan 100  $\mu\text{L}$  media ditambahkan ke masing-masing *well*, yang sesuai dengan inokulum sekitar  $5 \times 10^6$  sel, sebagai kontrol untuk pertumbuhan biofilm. Inokulum pada pelat uji diinkubasi selama  $\pm$  16-18 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, media dibuang, dan bakteri yang tidak melekat dihilangkan dengan mencuci setiap *well* 3-4 kali dengan akuades. Lebih lanjut pewarnaan dilakukan dengan menambahkan 200  $\mu\text{L}$  larutan kristal violet 0,1% (b/v) (Blando *et al.*, 2019), dan didiamkan selama 5-15 menit. Setelah reaksi pewarnaan selesai, dihilangkan noda berlebih dengan pencucian berulang (3-4 kali) dengan akuades. Kemudian ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  etanol, dibiarkan pewarnaan dilakukan minimal 60 menit. Nilai OD diukur menggunakan *hospitex diagnostic* pada 630 nm. Nilai OD<sub>630</sub> diukur pada 0, 4, 8, 12, 16, 20, dan 24 jam.

### 3.3.5.4 Skrining Antibiofilm

Metode mengacu pada Kwasny dan Opperman (2010) dengan menggunakan *microplate 96-well*. *S. aureus* dikultur pada 2% (b/v) NA yang dilarutkan dalam akuades. Inokulum disiapkan dengan mengencerkan biakan semalam 1:100 dalam



media uji. Media sebanyak 100  $\mu\text{L}$  dan 100  $\mu\text{L}$  inokulum dipindahkan ke *well* sebagai kontrol untuk pertumbuhan biofilm. Pada senyawa uji ditambahkan 100  $\mu\text{L}$  ekstrak 0,5 mg/mL dan 100  $\mu\text{L}$  inokulum. Dilakukan inkubasi selama  $\pm$  16-18 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, media dibuang dan dihilangkan bakteri yang tidak melekat dengan cara mencuci tiap *well* 3-4 kali dengan akuades. Pewarnaan dilakukan dengan menambahkan 200  $\mu\text{L}$  larutan kristal violet 0,1% (b/v) (Blando *et al.*, 2019) dan didiamkan selama 5-15 menit. Setelah reaksi pewarnaan selesai, dihilangkan sisa noda dengan pencucian 3-4 kali dengan akuades. Kemudian ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  etanol, dibiarkan pewarnaan dilakukan minimal 60 menit. Nilai OD diukur menggunakan *hospitex diagnostic* pada 630 nm. Nilai % hambatan dihitung berdasarkan rumus Blando *et al.* (2019), sebagai berikut:

$$\% \text{ hambatan biofilm} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD sampel}}{\text{OD kontrol}} \times 100\%$$

### 3.3.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Identifikasi menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) EVO dilakukan untuk mempelajari susunan miselium dan spora dari isolat unggul *Actinomyces*, mengacu pada metode Setiawan *et al.* (2021). *Actinomyces* di kultur pada kulit udang. Setelah 14 hari, sebagian kecil kulit udang dipotong menggunakan mikrotom SLEE *Disposable Blades* sehingga diperoleh potongan berukuran 0,5 cm x 0,5 cm dengan ketebalan 0,1 cm. Sampel yang telah disiapkan ditempatkan pada *stub* aluminium, yang difiksasi dengan tab perekat karbon. Permukaan atas setiap rintisan kemudian dilapisi, di bawah vakum, dengan lapisan emas. Proses pelapisan emas selesai dalam 20 menit. Rintisan logam berlapis emas dilihat pada SEM pada tegangan tinggi elektron 10 kV, Zeiss EVO MA 10.

### 3.3.7 Isolasi Senyawa Bioaktif Antibiofilm

Isolat *Actinomycetes* dikultivasi skala besar dalam media cair koloid kitin mengacu pada Hsu *and* Lockwood (1975) dengan beberapa modifikasi. Mula-mula, dibuat inokulum menggunakan media koloid kitin 1% (b/v) yang dilarutkan dalam ASW sebanyak 50 mL. Setelah tumbuh, kultur ditambahkan (1:10) ke media koloid kitin baru sebanyak 500 mL pada erlenmeyer 2 L, kemudian diinkubasi hingga 14 hari pada suhu 30°C dalam kondisi statis. *Actinomycetes* yang dikultur selanjutnya diekstraksi menggunakan metanol, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm untuk memisahkan supernatan dan residu. Supernatan yang diperoleh dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 122 mbar. Ekstrak kasar yang diperoleh kemudian dilakukan identifikasi komponen dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT).

Ekstrak kasar yang telah diidentifikasi dengan KLT, selanjutnya dilakukan partisi menggunakan corong pisah dengan pelarut butanol-air (1:1). Kedua fraksi kemudian dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan tekanan 122 mbar. Ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan uji KLT untuk mengetahui komponen senyawa dari sampel. Fraksi dominan alkaloid kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase diam C<sub>18</sub> dan fase gerak MeOH-air. Fraksinasi lebih lanjut dilakukan menggunakan metode kromatografi kolom dengan fase diam silika dan fase gerak DCM 100%. Setiap proses isolasi senyawa, dilakukan uji KLT untuk mengetahui komponen senyawa dari sampel. Uji KLT dilakukan menggunakan plat silika F<sub>254</sub> sebagai fase diam dan variasi pelarut sebagai fase gerak. Selanjutnya KLT divisualisasi dengan pereaksi serum sulfat dan Dragendorff. Fraksi dominan alkaloid selanjutnya dilakukan uji antibiofilm untuk mengetahui kemampuan fraksi dalam menghambat pertumbuhan biofilm.

### 3.3.8 *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)*

Pada fraksi dominan alkaloid, dilakukan uji MBIC mengacu pada metode uji antibiofilm (Kwasny *and* Opperman, 2010). Senyawa uji yang digunakan pada MBIC menggunakan beberapa konsentrasi yaitu ekstrak 15,6 µg/mL-250 µg/mL. Plat uji diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Pewarnaan dilakukan menggunakan kristal violet 0,1% (w/v) (Blando *et al.*, 2019). Nilai OD diukur menggunakan *hospitex diagnostic* pada 630 nm.

### 3.3.9. *Karakterisasi Fraksi Aktif dengan Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS)*

Fraksi aktif selanjutnya dianalisis menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS). LC-MS/MS digunakan untuk mengetahui berat molekul (m/z) dan rumus molekul yang terdapat pada sampel (Silverstein *et al.*, 2005). Fraksi aktif dilarutkan dengan metanol, kemudian 5 µL sampel dianalisis dengan LCMS yang dilengkapi dengan kolom ACQUITY UPLC® HSS C<sub>18</sub> (1.8 µm 2.1x100 mm) (waters, USA) dan Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (waters, USA)

Diagram alir penelitian dapat dilihat pada **Lampiran 1**.

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Hasil skrining antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak metanol 33A1T2; 33A2T7; 21A1T11; dan 38A1T12 memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 500 µg/mL.
2. Hasil skrining antibiofilm menunjukkan bahwa ekstrak 32A2T1, 50A2T9; 07A1T10; 21A1T11; dan 38A1T12 memiliki potensi sebagai antibiofilm terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 250 µg/mL.
3. Isolat 19A07A1 mampu menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antibiofilm dari *Actinomycetes* asosiasi biota laut tanpa memengaruhi pertumbuhan bakteri *S. aureus*.
4. Karakterisasi menggunakan LCMS-MS menunjukkan fraksi aktif T10FbK1K2 mengandung senyawa alkaloid golongan indol dengan nama *indole,2-(3-pyridyl)-* yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm.

### 5.2 Saran

Untuk dapat dimanfaatkan sebagai senyawa antibiofilm, maka perlu dilakukan kajian lebih lanjut terkait kajian sinergis senyawa antibiofilm dengan antibiotik yang sudah tidak memberikan efek antibakteri terhadap suatu bakteri.

# **DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmohsen, U.R., Bayer, K., and Hentschel, U. 2014. Diversity, Abundance and Natural Products of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.* 31 (3): 381-399.
- Al-Hatmi, A., Curfs-Breuker, I., de Hoog, G. S., Meis, J.F., and Verweij, P.E. 2017. Antifungal Susceptibility Testing of Fusarium: A Practical Approach. *Journa of fungi (Basel, Switzerland)*. 3(2): 19.
- Asif, T., Javed, U., Zafar, S.B., Ansari, A., Ul Qader, S.A. and Aman, A. 2019. Bioconversion of Colloidal Chitin Using Novel Chitinase from *Glutamicibacter uratoxydans* Exhibiting Anti-fungal Potential by Hydrolyzing Chitin Within Fungal Cell Wall. *Waste Biomass Valorization*.
- Babu, K.R. and Satyanarayana, T. 1996. Production of Bacterial Enzymes by Solid State Fermentation. *J. Sci. Ind. Res.* 55: 464-467.
- Balasubramanian, S., Othman, E. M., Kampik, D., Stopper, H., Hentschel, U., Ziebuhr, W., Oelschlaeger, T. A. and Abdelmohsen, U. R. 2017. Marine Sponge-Derived *Streptomyces* sp. SBT343 Extract Inhibits Staphylococcal Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 8 (236): 1-14.
- Balasubramanian, S., Skaf, J., Holzgrabe, U., Bharti, R., Förstner, K. U., Ziebuhr, W., Humeida, U. H., Abdelmohsen, U. R., and Oelschlaeger, T. A. 2018. New Bioactive Compound From the Marine Sponge-Derived *Streptomyces* sp. SBT348 Inhibits Staphylococcal Growth and Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 9: 1473.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and van Wezel, G.P. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol.* 80: 1-43.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Truck, M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *The Amer J Clin Pathol.* 45: 493-496.
- Beveridge, T. J. 2001. Use of the Gram Stain in Microbiology. *Biotechnic & Histochemistry.* 76(3): 111-118.

- Blando, F., Russo, R., Negro, C., Bellis, D., and Frassinetti, S. 2019. Antimicrobial and Antibiofilm Activity Against *Staphylococcus aureus* of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. *Antioxidants*. 8, 117.
- Bhattacharya, M., Wozniak, D. J., Stoodley, P., and Hall-Stoodley, L. 2015. Prevention and Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Expert Rev. of Anti Infect. Ther.* 13 (12): 1499–1516.
- Bowler, P. G. 2018. Antibiotic Resistance and Biofilm Tolerance: A Combined Threat in the Treatment of Chronic Infections. *J. Wound Care*. 27 (5): 273-277.
- Brodie, J. E., Devlin, M., Haynes, D., and Waterhouse, J. 2011. Assessment of the Eutrophication Status of the Great Barrier Reef lagoon (Australia). *Biogeochemistry*. 106(2): 281-302.
- Brooks, G.F., K.C. Carroll, J.S. Butel, S.A. Morse, and T.A. Mietzner. 2013. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology Twenty-Sixth Edition*. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA. 150-151.
- Calderaro, A., Arcangeletti, M. C., Rodighiero, I., Buttrini, M., Gorrini, C., Motta, F. 2014. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep*. 4: 6803.
- Centers for Disease Control and Prevention U.S. 2019. Antibiotic Resistance Threats In The United States.
- Chavan, D. V., Mulaje, S. S., and Mohalkar, R. Y. 2013. a Review on Actinomycetes and Their Biotechnological Application. *Int J Pharm Sci Res*. 4 (5): 1730–1742.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V., Thomson, B.A. 2001. An introduction to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 36(8): 849-65.
- Ciofu, O. and Tolker-Nielsen, T. 2019. Tolerance and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to antimicrobial agents-how *P. aeruginosa* can escape antibiotics. *Front. Microbiol*. 10: 913.
- CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- Cross, T. 1970. The diversity of bacterial spores. *J Appl Bacteriol*. 33: 95-102.



- Dhakal, D., Pokhrel, A.R., Shrestha, B., and Sohng, J.K. 2017. Marine rare actinobacteria: Isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. *Front. Microbiol.* 8: 1106.
- Dolatabadi, S., Moghadam, H. N., and Mahdavi-Ourtakand, M. 2018. Evaluating the anti-biofilm and antibacterial effects of *Juglans regia* L. extracts against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis.* 118: 285–28.
- Driche, E. H., Sabaou, N., Bijani, C., Zitouni, A., Pont, F., Mathieu, F., and Badji, B. 2017. *Streptomyces* sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 33 (6): 105.
- El-Hawary, S.S., Sayed, A.M., Mohammed, R., Khanfar, M.A., Rateb, M.E., Mohammed, T.A., Hajjar, D., Hassan, H.M., Gulder, T.A. M., and Abdelmohsen, U.R. 2018. New Pim-1 Kinase Inhibitor From the Co-culture of Two Sponge-Associated Actinomycetes. *Front. Chem.* 6: 538.
- Fux, A., Costerton, W., Stewart, P., and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13: 34–40.
- Gowrishankar, S., Mosioma, N.D., and Pandian, S.K. 2012. Coral-Associated Bacteria as a Promising Antibiofilm Agent against Methicillin-Resistant and Susceptible *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Evid-based Comp Alt Med.*
- Hamed, A., Abdel-Razek, A. S., Frese, M., Stammler, H. G., El-Haddad, A. F., Ibrahim, T. M. A., Sewald, N., and Shaaban, M. 2018. Terretinin N: A new meroterpenoid from *Nocardiosis* sp. *Molecules.* 23 (2): 299.
- Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M. and Fortas and Rebecca Pogni, Z. 2018. *Streptomyces* Secondary Metabolites. *Basic Biology and Applications of Actinobacteria.*
- Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. 2016. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science.* 354: 42–68.
- Hostettman, K., Hostettman, M., dan Marston, A. 1995. *Cara Kromatografi Preparatif*. Alih bahasa oleh K. Padmawinata. ITB. Bandung. 1-38.
- Hsu, S.C. and Lockwood, J. L. 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Appl. Microbiol.* 29: 422-426.
- Huang, X., Kong, F., Zhou, S., Huang, D., Zheng, J., and Zhu, W. 2019. *Streptomyces tirandamycinicus* sp. nov., a Novel Marine Sponge-Derived Actinobacterium With Antibacterial Potential Against *Streptococcus agalactiae*. *Front. Microbiol.* 10: 482.

- Hu, G., Zhai, M., Niu, R., Xu, X., Liu, Q. and Jia, J. 2018. Optimization of culture condition for ganoderic acid production in ganoderma lucidum liquid static culture and design of a suitable bioreactor. *Molecules*. 23 (10): 2563.
- Ismail, B.d and Nielsen, S.S. 2010. Basic principles of chromatography. *Journal of Chromatography Library*.
- Janardhan, A., Kumar, A. P., Viswanath, B., Saigapol, D. V. R., Narasimha, G. 2014. Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. *Biotechnol Res Int*. 1-8.
- Jeuniaux, C., C.R. 1955. *Streptomyces* production of exochitinase. *Soc. Biol.* 149, 1307.
- Kawato, M. and Shinobu, R. 1959. On *Streptomyces herbaricolor* sp. nov., supplement: a simple technique for microscopical observation. *Memoirs of the Osaka University Liberal Arts and Education*. 8: 114-119.
- Khopkar, S.M. 2002. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Diterjemahkan oleh Saptohardjo, A. Universitas Indonesia. Jakarta. 84-311.
- Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H., and Mack, D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*. 191(2): 101–106.
- Korfmacher, W.A. 2005. Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. *Drug Discov Today*. 10 (20): 1357-1367.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., and Sarangi, M. 2013. Thin layer chromatography: A tool of biotechnology for isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 18 (1): 126–132.
- Kwasny, S.M. and Opperman, T.J. 2010. *Current Protocols in Pharmacology*. 50: 13A.8.1-13A.8.23.
- Lee, J., Kim, Y., Kim, C., Lee, J., Cho, M. H., and Lee J. 2012. Indole-3-acetaldehyde from *Rhodococcus* sp. BFI 332 inhibits *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 96: 1071-1078.
- Lee, J. H., Kim, E., Choi, H., and Lee, J. 2017. Collismycin C from the micronesian marine bacterium *Streptomyces* sp. MC025 Inhibits *Staphylococcus Aureus* biofilm formation. *Marine Drugs*. 15 (12): 387.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria Chapter 3.

- Lingappa, Y. and Lockwood, J. L. 1961. A Chitin Medium for isolation, Growth, and Maintenance of Actinomycetes. Nature Publishing Group. 189:158-159.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko, K.S. Bender, D.H. Buckley, D.A. Stahl. 2015. *Brock Biology Of Microorganism Fourteenth Edition*. Pearson Education, Inc. USA. 176-177.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., and Monnet, D. L. 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18: 268–281.
- Meyer, J. 1989. Genus *Nocardiopsis*. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4, 2562-2568, Williams & Wikins, Baltimore.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267 (17), 5421–5426.
- Penesyana, A., Paulsen, I. T., Gillings, M.R., Kjelleberg, S. and Manefield, M.J. 2020. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Front. Microbiol.* 11: 2109.
- Petrachi, T., Resca, E., Piccinno, M. S., Biagi, F., Strusi, V., Dominici, M., and Veronesi, E. 2017. An alternative approach to investigate biofilm in medical devices: A feasibility study. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 14 (12): 1587.
- Pramesti, E. and Puspita, I. D. 2020. Optimization of Colloidal Chitin and Inoculum Concentration in Chitinase Production by *Streptomyces* sp. PB2 Using Response Surface Methodology. *E3S Web of Conferences.* 147.
- Rajivgandhi, G. N., Ramachandran, G., Kanisha, C. C., Li, J. L., Yin, L., Manoharan, N., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., and Li, W. J. 2020. Anti-biofilm compound of 1, 4-diaza-2, 5-dioxo-3-isobutyl bicyclo[4.3.0]nonane from marine *Nocardiopsis* sp. DMS 2 (MH900226) against biofilm forming *K. Pneumoniae*. *J. King Saud Univ. Sci.* 32: 3495–3502.
- Reygaert, W.C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology.* 4 (3): 482–501.

- Seneviratne, C. J., Yip, J. W. Y., Chang, J. W. W., Zhang, C. F., Samaranayake, L. P. 2013. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology*. 58(10): 1327–1334.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*, 7(4): 247.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., and Arai, M. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *J. Fungi*. 8, 280.
- Sethupathy, S., Sathiyamoorthi, E., Kim, Y., Lee, J., and Lee J. 2020. Antibiofilm and Antivirulence Properties of Indoles Against *Serratia marcescens*. *Front. Microbiol.* 1: 584812.
- Shaala, L.A., Youssef, D.T.A., Badr, J.M. and Harakeh, S.M. 2016. Bioactive 2(1H)-pyrazinones and diketopiperazine alkaloids from a tunicate-derived actinomycete *Streptomyces* sp. *Molecules*. 21 (9): 1116.
- Sharma, M., Dangi, P., and Choudhary, M. 2014. Actinomycetes : Source , Identification , and Their Applications. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3 (2), 801-832.
- She, P., Wang, Y., Liu, Y., Tan, F., Chen, L., Luo, Z., and Wu, Y. 2019. Effects of exogenous glucose on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *MicrobiologyOpen*, 8(12): 1–15.
- Silverstein, R. M., F.X. Webster, and D.J. Kiemle. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds Seventh Edition*. John Wiley & Sons, Inc. New York. 1-22.
- Soares, G. M. S., Figueiredo, L. C., Faveri, M., Cortelli, S. C., Duarte, P. M., and Feres, M. 2012. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 20: 295-305.
- Subramani, R. and Aalbersberg, W. 2013. Culturable rare Actinomycetes: Diversity, isolation and marine natural product discovery. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (21): 9291–9321.
- Subramani, R. and Sipkema, D. 2019. Marine Rare Actinomycetes: A Promising Source of Structurally Diverse and Unique Novel Natural Products. *Mar. Drugs*. 17: 249.

- Suzuki, N., Ohtaguro, N., Yoshida, Y., Hirai, M., Matsuo, H., Yamada, Y., Imamura, N., and Tsuchiya, T. 2015. A compound inhibits biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from *Streptomyces*. *Biol. Phar. Bull.* 38 (6): 889–892.
- Tata, S., Aouiche, A., Bijani, C., Bouras, N., Pont, F., Mathieu, F., and Sabaou, N. 2019. Mzabimycins A and B , novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp . PAL114 in synthetic medium containing. *Saudi Pharmaceutical Journal.* 27 (7): 907–913.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., and Wagner, M. 2007. Sponge-Associated Microorganisms: Evolution, Ecology, and Biotechnological Potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71 (2): 295-347.
- Tseng, B. S., Zhang, W., Harrison, J. J., Quach, T. P., Song, J. L., Penterman, J., Singh, P. K., Chopp, D. L., Packman, A. I., Parsek, M. R. 2013. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. *Environ. Microbiol.* 15: 2865–2878.
- Wijesinghe, G., Dilhari, A., Gayani, B., Kottegoda, N., Samaranayake, L., and Weerasekera, M. 2018. Influence of Laboratory Culture Media on in vitro Growth, Adhesion, and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Med Prin Pract.* 28: 28–35.
- Windolf, C. D., Lögters, T., Scholz, M., Windolf, J., and Flohé S. 2014. Lysostaphin-Coated Titan-Implants Preventing Localized Osteitis by *Staphylococcus aureus* in a Mouse Model. *PLoS ONE*, 9 (12): e115940.
- World Health Organization (WHO). 2020. Antimicrobial resistance. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Diakses 14 Maret 2021.
- Xie, T. T., Zeng, H., Ren, X. P., Wang, N., Chen, Z. J., Zhang, Y., and Chen, W. 2018. Antibiofilm activity of three Actinomycete strains against *Staphylococcus epidermidis*. *Lett Appl Microbiol.* 68 (1): 73–80.
- Zhang, Y., Adnani, N., Braun, D.R., Ellis, G.A., Barns, K.J., Parker-Nance, S., Guzei, I.A., and Bugni, T.S. 2016. Micromonohalimanes A and B: Antibacterial Halimane-Type Diterpenoids from a Marine Micromonospora Species. *J. Nat. Prod.*, 79 (11): 2968-2972.
- Zhang, C., Occi, J., Masurekar, P., Barrett, J. F., Zink, D. L., Smith, S., Onishi, R., Ha, S., Salazar, O., Genilloud, O., Basilio, A., Vicente, F., Gill, C., Hickey, E.J., Dorso, K., Motyl, M., and Singh, S.B. 2008. Isolation, structure, and antibacterial activity of philipimycin, a thiazolyl peptide discovered from *Actinoplanes philippinensis* MA7347. *J. Am. Chem. Soc.*, 130 (36): 12102–12110.