

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
MIKROBA SEDIMEN BAKAU SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

(Skripsi)

Oleh

ANISYA REIKA AGUSTINA

1717011071



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER MIKROBA SEDIMEN BAKAU SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI

Oleh

ANISYA REIKA AGUSTINA

Ekosistem bakau menyimpan kelimpahan karbon organik dan kandungan nutrisi yang tinggi pada sedimennya, hal ini menyediakan adanya habitat bagi komunitas mikroorganisme. Mikroorganisme yang berasosiasi dengan ekosistem bakau diketahui memiliki potensi untuk memproduksi senyawa metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri. Pemanfaatan antibiotik dalam praktik klinis saat ini semakin meningkat karena tersebarnya patogen resisten antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba sedimen bakau di sekitar kawasan hutan bakau Lampung serta bioaktivitasnya sebagai antibakteri.

Penelitian ini dilaksanakan di UPT-LTSIT Universitas Lampung. Penelitian didahului dengan pengambilan sampel sedimen bakau pada Kawasan hutan bakau Petengoran dan Kawasan Pantai Dewi Mandapa, Lampung. Isolasi mikroorganisme dari sedimen bakau menggunakan media koloid kitin menunjukkan bahwa Isolat mikroba BL2R1-2 yang berasal dari sedimen bakau pada lokasi Kawasan hutan bakau Petengoran, terindikasi sebagai *Actinomycetes* genus *Streptomyces sp.* Uji bioaktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak isolat BL2R1-2 memiliki potensi menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan nilai penghambatan sebesar 56,75% pada masa inkubasi 18 jam.

Karakterisasi senyawa yang diperoleh dilakukan dengan metode *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), dan *Liquid Chromatography Mass Spectroscopy-Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS) menunjukkan bahwa Isolat BL2R1-2 diduga mampu memproduksi senyawa alkaloid diketopiperazin dengan nilai ion puncak m/z 210.1452 dengan formula $C_{11}H_{18}N_2O_2$. Prediksi senyawa dikonfirmasi dengan analisis FT-IR pada puncak serapan $3309,87\text{ cm}^{-1}$; $2922,23\text{ cm}^{-1}$; $1654,83\text{ cm}^{-1}$ sebagai gugus N-H, C-H alifatik dan C=O. serta serapan gugus C-N pada bilangan gelombang $1371,6\text{ cm}^{-1}$ dan $1237,47\text{ cm}^{-1}$.

Kata kunci: sedimen bakau, mikroorganisme, antibakteri, karakterisasi senyawa metabolit sekunder

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITE COMPOUND FROM MICROBIAL MANGROVE SEDIMENT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST

By

ANISYA REIKA AGUSTINA

Mangrove ecosystems have an abundance of organic carbon and high nutrient content in their sediments, providing habitat for communities of microorganisms. Microorganisms associated with mangrove ecosystems are known to have the potential to produce secondary metabolite compounds that have bioactivity as antibacterials. Antibiotics in clinical practice are becoming increasingly due to the spread of antibiotic-resistant pathogens. This study aims to determine the presence of secondary metabolite compounds produced by mangrove sediment microbes around the Lampung mangrove forest area and their bioactivity as antibacterial. This research was accomplished at UPT-LTSIT, University of Lampung. The study was preceded by mangrove sediment sampling in the Petengoran mangrove forest Area and Dewi Mandapa Beach Area, Lampung. Isolation of microorganisms from mangrove sediments using chitin colloidal media showed that BL2R1-2 microbial isolates from mangrove sediments at the Petengoran mangrove forest Area indicated as Actinomycetes genus *Streptomyces* sp. Antibacterial bioactivity test showed that BL2R1-2 isolate extract has the potential to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* with an inhibition value of 56.75% during an 18-hour incubation period. The characterization of the compounds obtained was carried out using the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) method, and Liquid Chromatography Mass Spectroscopy-Mass Spectroscopy (LC-MS/MS) showed that isolate BL2R1-2 was thought to be capable of producing diketopiperazine alkaloid compounds at the peak ion m/z 210.1452 with the formula $C_{11}H_{18}N_2O_2$. The compound prediction was confirmed by FT-IR analysis at the absorption of 3309.87 cm^{-1} ; 2922.23 cm^{-1} ; 1654.83 cm^{-1} as aliphatic N-H, C-H, and C=O groups also absorption of C-N group at wave numbers 1371.6 cm^{-1} and 1237.47 cm^{-1} .

Kata kunci: mangrove sediment, microorganisms, antibacteri, characterization of secondary metabolite compound

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
MIKROBA SEDIMEN BAKAU SERTA UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

Oleh

ANISYA REIKA AGUSTINA

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI
SENYAWA METABOLIT SEKUNDER
MIKROBA SEDIMEN BAKAU SERTA
UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI**

Nama Mahasiswa : **Anisya Reika Agustina**

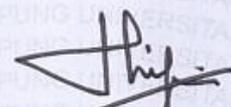
Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011071

Jurusan : Kimia

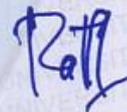
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

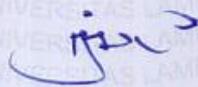


Syafiqul Bahri, M.Si.
NIP 19730825 200003 1 001



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

2. Ketua Jurusan Kimia

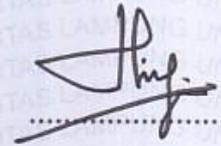


Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

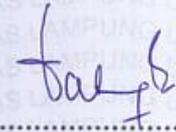
Ketua : Syaiful Bahri, M.Si.



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



Anggota : Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 19711001 200501 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 31 Mei 2023

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Anisya Reika Agustina
NPM : 1717011071
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Mikroba Sedimen Bakau serta Uji Aktivitas Antibakteri”** adalah benar karya dan hasil penelitian saya sendiri, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ada pernyataan yang tidak benar, maka saya bersedia dikenai sanksi sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 06 Juni 2023

Yang menyatakan



Anisya Reika Agustina
NPM 1717011071

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Anisya ReikaAgustina, lahir di Jakarta pada 14 Agustus 1999. Penulis merupakan putri pertama dari pasangan Bapak Purwoko dan Ibu Asiyah, yang memiliki satu adik laki-laki. Pendidikan formal penulis diawali pada tahun 2004 di Taman Kanak-kanak (TK) Bina Insan dan dilanjutkan di Sekolah dasar (SD) Negeri 2 Cikuya pada Tahun 2005. Penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 1 Cisoka pada tahun 2011 dan selanjutnya berhasil menyelesaikan pendidikan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Kabupaten Tangerang selama 3 tahun. Setelah lulus pada tahun 2017, Penulis melanjutkan pendidikan di Perguruan Tinggi Negeri sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

Selama menjadi mahasiswa penulis aktif dalam organisasi kemahasiswaan, sebagai anggota Biro Penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) tahun 2018. Pada tahun 2020, penulis melakukan praktik kerja lapangan di Laboratorium pengujian bahan makanan Balai Besar Pengawas Obat dan Makanan (BBPOM) di Bandar Lampung dengan mengangkat judul kerja praktik “Identifikasi dan Penetapan Kadar Asam Siklamat dalam Minuman Ringan secara Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)” dan juga telah menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di kelurahan Cikuya kecamatan Solear Kabupaten Tangerang.

KATA INSPIRASI

مَا وَدَّعَكَ رَبُّكَ وَمَا قَلَىٰ

“Tuhanmu tiada meninggalkan kamu dan tiada (pula) benci kepadamu”.

(Q.S Ad-Dhuha: 3)

“Just being myself isn't enough, be the best version of myself”.

“you will bloom in your time”

“Allah SWT selalu bersamamu, janganlah putus asa, janganlah merasa kesepian, dan janganlah patah semangat. Sesungguhnya Allah SWT tidak meninggalkanmu dan membencimu”.

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahirabbil 'alamin, sembah sujud serta syukur kepada Allah SWT, atas limpahan rahmat dan karunia-Nya. Shalawat dan salam senantiasa terlimpahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW. Kupersembahkan karya ini untuk orang yang kukasih dan kusayangi kepada:

Ibunda dan Ayahanda Tercinta

Sebagai tanda bakti, cinta, dan tanggung jawabku kepada Ibu Asiyah dan Ayah Purwoko yang selalu memberikan doa, dukungan, kesabaran, dan semangat yang tak pernah henti engkau berikan dalam setiap langkahku. Terima kasih atas cinta kasih dan ridhomu yang senantiasa menyertai diriku hingga aku dapat menyelesaikan Pendidikan sebagai seorang sarjana. Kupersembahkan karya ini yang InsyaAllah menjadi langkah awal untuk membahagiakan Ayah dan Ibu. Terima kasih atas pengorbanan dan jerih payah kalian sehingga aku dapat menggapai cita-citaku. Semoga kalian selalu disayangi Allah sebagaimana kalian menyayangiku.

Adikku dan Orang-orang Terdekatku

Sebagia tanda terima kasih kepada adikku tersayang yang senantiasa memberikan dukungan dan semangat kepadaku. Semoga doa dan semua hal baik yang engkau berikan menjadikanmu orang yang bermanfaat.

Seluruh sahabat dan teman-temanku yang selalu memberikan semangat, motivasi, dan mengersamaimu dalam keadaan apapun. Terima kasih telah memberikan kebaikan dalam setiap langkahku. Semoga semua hal baik yang kalian lakukan akan menjadi kebaikan untuk diri kalian sendiri.

SANWACANA

Asslamu 'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Allhamdulillahirabbil'alamin, segala puji syukur Penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan tugas akhir skripsi ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada Rasulullah Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya semoga kita termasuk kedalam umatnya yang mendapat *syafa'at* di *yaumul akhir* kelak, *aamiin yarabbal 'alamin*.

Skripsi dengan judul **“Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Mikroba Sedimen Bakau serta Uji Aktivitas Antibakteri”** sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program Sarjana (S1) pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung. Selama Menyusun skripsi ini penulis banyak mendapatkan bimbingan dan dukungan dari berbagai pihak. Dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Bapak Syaiful Bahri, M. Si selaku dosen pembimbing satu, yang selalu sabar dan memberikan arahan, saran, dan motivasi kepada Penulis selama kegiatan penyelesaian skripsi ini. Terima kasih banyak atas ilmu dan pengalaman berharga yang diberikan Bapak kepada Penulis selama ini.
2. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M. Si selaku dosen pembimbing dua, yang telah dengan tulus meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan saran, dan motivasi kepada penulis selama menjalani penelitian dan masa akhir perkuliahan. Terima kasih sebesar-besarnya atas segala bantuan dan ilmu berharga yang telah Ibu berikan kepada penulis selama ini.

3. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati M. S selaku dosen pembahas, yang telah dengan tulus meluangkan waktu, memberikan bimbingan dan saran kepada penulis. Terima kasih sebesar-besarnya atas segala ilmu yang telah Ibu berikan kepada penulis selama ini.
4. Ibu Dr. Dra. Ilim, M. S selaku dosen pembimbing akademik, yang telah memberikan bimbingan serta motivasi kepada Penulis selama menjalani kuliah dan sehingga dapat menyelesaikan kuliah dengan baik dan lancar.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
6. Bapak Mulyono, Ph. D selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas lampung.
7. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M. Si selaku sekretaris Jurusan Kimia Fmipa Universitas Lampung.
8. Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia atas segala ilmu yang telah diberikan kepada penulis selama menjalani perkuliahan. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan Bapak dan Ibu.
9. Pak ipul *research* '17, atas segala bantuan dan kerjasamanya selama penelitian.
10. Kakak-kakak dan teman-teman Laboratorium Biomassa dan Biopolimer atas segala kerjasama, bantuan, dan motivasi yang diberikan selama penelitian.
11. Teman-teman *chemistry*' 17 atas segala suka dan duka selama menjalani perkuliahan di Kimia.
12. Serta teman-teman yang Penulis temui selama tinggal di Lampung, yang dengan tulus telah membantu dan memberikan motivasi agar penulis tetap semangat dalam menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga selalu diberi kemudahan dan kelancaran dalam menggapai mimpinya.

Terima kasih atas segala bantuan dan dukungan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa dalam skripsi ini masih terdapat kekurangan dan keterbatasan. Penulis senantiasa mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat sebagai tambahan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Wasslamu'alaikum Warahmatullahi Wabarakatuh

Bandar Lampung, 06 Juni 2023

Penulis,

Anisya Reika Agustina

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Ekosistem Bakau	4
2.2. Sedimen Bakau.....	6
2.3. Mikroba Asosiasi Sedimen Bakau	7
2.4. Potensi Senyawa Bioaktif dari mikroba Sedimen Bakau.....	9
2.4.1. Ftalat	9
2.4.2. Diketopiperazin.....	10
2.4.3. Poliketida	11
2.5. Antibakteri	12
2.6. Kitin	14
2.7. <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	16
2.8. Metode Isolasi Bahan Alam.....	17
2.8.1. Maserasi	17
2.8.2. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair).....	18
2.9. Metode Pemisahan dan Pemurnian	19
2.9.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	19
2.9.2. Kromatografi Kolom.....	21
2.10. Karakterisasi	21
2.10.1. <i>Fourier Transform Infrared Spectrofotometry</i> (FT-IR).....	22
2.10.2. <i>Mass Spectrofotometry</i> (MS)	22
III. METODE PENELITIAN	24
3.1. Waktu dan Tempat	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Biomaterial	25
3.4. Metode.....	25
3.4.1. <i>Pretreatment</i> Media Pertumbuhan Mikroba	25
3.4.2. Penumbuhan isolat Asosiasi dengan Lumpur Bakau.....	27

3.4.3. Pemurnian Mikroba	28
3.4.4. Kultivasi secara <i>Solid State Fermentation</i> (SSF).....	28
3.4.5. Ekstraksi Senyawa Metabolite Sekunder.....	29
3.4.6. Peremajaan Isolat Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.4.7. Uji Skrining Bioaktivitas (Ekstrak Kasar)	30
3.4.8. Identifikasi mikroba	31
3.4.9. Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis	32
3.4.10. Fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi.....	33
3.4.11. Uji Bioaktivitas Antibakteri.....	33
3.4.12. Karakterisasi Senyawa	34
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	38
4.1. Pembuatan Koloid Kitin.....	38
4.2. Sampling Biomaterial.....	39
4.3. Isolasi dan Pemurnian Mikroba Sedimen Bakau	42
4.4. Kultivasi Mikroba secara <i>Solid State Fermentation</i> (SSF)	46
4.5. Uji Skrining Bioaktivitas sebagai Antibakteri	47
4.6. Identifikasi Mikroba Terpilih	49
4.7. Uji kromatografi Lapis Tipis.....	50
4.8. Fraksinasi secara Kromatografi Kolom.....	52
4.9. Karakterisasi senyawa dengan FT-IR dan LC-MS/MS.....	56
V. SIMPULAN DAN SARAN.....	59
5.1. Simpulan.....	59
5.2. Saran.....	59
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN.....	71
1. Diagram Alir Penelitian	72
2. Kultivasi Mikroba Hasil Isolasi Sedimen Bakau	73
3. Uji Skrining Aktivitas Antibakteri Ekstrak Isolat Sedimen Bakau terhadap <i>S. aureus</i>	75
4. Visualisasi 55 Fraksi Hasil Kromatografi Kolom	77
5. Karakterisasi Senyawa	78

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Karakteristik morfologi mikroba sedimen bakau pada media agar kitin	45
2. Bobot, bentuk, dan warna <i>crude</i> ekstrak yang diperoleh isolat mikroba	47
3. Kultivasi mikroba hasil isolasi sedimen bakau	73
4. Hasil pengukuran uji skrining antibakteri OD _{630nm}	76

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ekosistem Bakau di Pesawaran.....	5
2. Struktur Senyawa 2-Metil-Butil-Propil-Ftalat	10
3. Struktur Senyawa Dietil Ftalat.....	10
4. Struktur Senyawa Spirobrokazin A.....	11
5. Struktur Senyawa Eugenitol.....	12
6. Pembentukan koloid kitin (a) Kitin, (b) Koloid kitin.....	39
7. Lokasi sampling biomaterial sedimen bakau	40
8. Sedimen bakau pada lokasi A, (a) Keadaan lingkungan ekosistem bakau, (b) Sampel sedimen bakau	40
9. Sedimen bakau pada lokasi B, (a) Keadaan lingkungan ekosistem bakau, (b) Sampel sedimen bakau	41
10. Isolat mikroba sedimen bakau (a) AL1R, (b) AL4R, (c) BL2R, (d) BL3R, (e) BL4R.....	42
11. Isolat murni mikroba sedimen bakau (a) AL1R, (b) AL4R1, (c) AL4R2, (d) AL4R3, (e) AL4R3-2, (f) AL4R4, (g) BL2R1, (h) BL2R1-2.....	44
12. Kultivasi mikroba pada media kulit udang (a) Substrat kulit udang (b) Kultivasi hari ke -14.....	46
13. Aktivitas inhibisi <i>crude</i> ekstrak EtOAc isolat terhadap <i>S. aureus</i>	48
14. Identifikasi mikroba secara mikroskopik (a) Bentuk spora isolat BL2R1-2 perbesaran 400 M, (b) Bentuk spora <i>Streptomyces griseus</i> M-1027 oleh Amano, S., Miyadoh, S., dan Shomura, T (Actinojp., 2002).....	49
15. Tipe Rantai spora genus <i>Streptomyces</i> (a) <i>Rectiflixibiles</i> , (b) <i>Retinaculiaperti</i> , (c) <i>Spira</i> , (d) <i>Verticillat</i> , (e) Memecah cabang aerial hifa	50

16. Uji kromatografi lapis tipis ekstrak BL2R1-2 visualisasi (a) dengan pereaksi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, (b) pada UV254nm, (c) dengan Pereaksi <i>Dragendorff</i>	51
17. Kromatografi kolom.....	52
18. Identifikasi komponen fraksi 1-8 pada eluen <i>n</i> -heksana:etil (15:1) visualisasi (a) dengan $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, (b) pada UV 254 nm, (c) dengan reagen <i>Dragendorff</i>	52
19. Uji aktivitas antibakteri pada fraksi 1-8 terhadap <i>S. aureus</i>	53
20. Pola KLT fraksi hasil re-kolom pada eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (15:1) visualisasi (a) dengan pereaksi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, (b) pada UV254nm, (c) dengan pereaksi <i>Dragendorff</i>	54
21. Uji aktivitas antibakteri pada fraksi hasil re-kolom terhadap <i>S. aureus</i>	54
22. Uji kromatografi lapis tipis fraksi aktif K2FA5 dengan eluen <i>n</i> -heksana:etil asetat (3:1) visualisasi (a) dengan pereaksi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, (b) pada UV 254nm, (c) dengan pereaksi <i>Dragendorff</i>	55
23. Spektrum Inframerah fraksi K2FA5.	57
24. Profil kromatogram fraksi K2FA5 menggunakan LC-QToFMS/MS.....	58
25. Spektrum massa dari komponen senyawa pada fraksi K2F5A.....	58
26. Prediksi Struktur senyawa (3 <i>S</i> ,8 <i>aS</i>)-3- <i>Isobutylhexahydropyrrolo</i> [1,2- <i>a</i>] <i>pyrazine-1,4-dione</i> (Mangamuri <i>et al.</i> , 2016).....	59
27. Diagram Alir Penelitian	72
28. Uji Skinning Antibakteri dengan masa inkubasi 18 jam	75
29. Visualisasi fraksi hasil re-kolom dengan eluen <i>n</i> -heksana: IpA (7:3)	77
30. % kelimpahan senyawa pada fraksi K2FA5	78
31. ESI 2 TOF MS/MS fragmentasi senyawa target.....	78
32. Fragmentasi Senyawa $\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$ menggunakan <i>Software ChemDraw Ultra 12.0.1</i>	79

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bakau merupakan ekosistem yang kompleks. Hampir 60-70% dari garis pantai tropis dan subtropis dunia ditutupi dengan hutan bakau. Ekosistem bakau secara global ditemukan di Asia (42%), Afrika (20%), Amerika Utara dan Tengah (15%), Oceania (12%), dan Amerika Selatan (11%). Ekosistem bakau masih jarang dimanfaatkan, namun ekosistem ini sangat produktif di seluruh dunia dengan nilai ekologis yang besar (Thatoi dan Biswal, 2008).

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keragaman bakau tertinggi di dunia. Bakau menempati di sepanjang 30000 km² garis pantai Indonesia, sekitar 21% dari seluruh ekosistem bakau di dunia dan memiliki 45 spesies tanaman bakau dari 75 spesies bakau di dunia. Hutan bakau banyak ditemukan di beberapa daerah di Indonesia dan berperan penting secara regional terletak di Papua, Kalimantan, dan Sumatera (Spalding *et al.*, 2010; FAO, 2007). Ekosistem bakau di Indonesia banyak dimanfaatkan dalam sektor ekowisata dan agrikultural, salah satunya ialah ekosistem bakau di Provinsi Lampung dengan luas hutan bakau sebesar 17110 Ha, namun akibat eksploitasi yang berlebihan menyebabkan ekosistem bakau di beberapa daerah khususnya di Lampung mengalami kerusakan sebesar 50% dari total seluruh ekosistem bakau di Lampung (BPS, 2015).

Ekosistem bakau diketahui menyediakan habitat bagi sejumlah organisme seperti invertebrata, burung, dan mamalia. Kelimpahan karbon dan kandungan nutrisi yang cukup tinggi menyebabkan ekosistem bakau juga

menjadi habitat bagi sejumlah besar mikroorganisme, seperti bakteri, fungi, mikroalga, dan lainnya. Bakau menyimpan sejumlah besar karbon organik dalam sedimennya, ini memberikan dasar adanya jaring-jaring makanan yang besar dengan pelepasan nutrisi dalam sedimen yang dikendalikan oleh mikroorganisme (Holguin *et al.*, 2001).

Kompleksitas sedimen bakau menyediakan habitat bagi komunitas mikroba yang dapat beradaptasi dengan kondisi salinitas yang tinggi. Studi probabilitas menyatakan bahwa mikroba yang berasosiasi dengan ekosistem bakau lebih menjanjikan untuk produksi senyawa metabolit sekunder dibandingkan dengan mikroba terestrial, ini dikarenakan kondisi lingkungan yang unik dan kandungan bahan organik yang tinggi mempengaruhi sistem metabolisme mikroba yang bersimbiosis dengan lingkungannya (Mangamuri *et al.*, 2016). Mikroba asosiasi sedimen bakau merupakan *reservoir* yang kaya akan keragaman senyawa metabolit sekunder, sebagian besar jenis senyawa yang dihasilkan ialah alkaloid, flavonoid, terpenoid, poliketida, dan steroid (Li *et al.*, 2022).

Sampai saat ini penelitian mengenai senyawa metabolit sekunder hasil produksi mikroorganisme yang berasal dari lingkungan ekstrim, seperti ekosistem bakau, semakin meningkat (Xu *et al.*, 2014). Pemanfaatan produk bioaktif alami yang dihasilkan oleh mikroba cukup menjanjikan karena dapat dibudayakan untuk menghasilkan produk yang optimal dan tidak merusak ekosistem lingkungan tersebut (Dobretsov *et al.*, 2006). Sebagian besar senyawa yang dihasilkan mikroba asosiasi sedimen bakau diperoleh dari *Actinomycetes* genus *Streptomyces*, dan berasal dari *fungi* terutama genus *Aspergillus* dan *Penicillium* (Li *et al.*, 2022).

Studi yang dilakukan oleh Cai *et al.*, (2021) melaporkan bahwa produk alami yang berasal dari mikroorganisme sedimen bakau memiliki bioaktivitas sebagai antibiotik. Pemanfaatan antibiotik dalam praktik klinis kini

mengalami peningkatan dikarenakan adanya patogen resisten antibiotik dengan banyak strain yang tersebar. Masalah resistensi terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh bakteri gram positif salah satunya *S. aureus*. *S. aureus* memiliki aktivitas patogenitas dan kemampuan beradaptasi yang cepat pada beragam habitat, hal ini dapat menyebabkan infeksi akut pada tubuh. Ketika antibiotik baru digunakan untuk melawan *S. aureus*, bakteri tersebut akan mengembangkan mekanisme yang efektif untuk menetralkan antibiotik (Kiran *et al.*, 2018). Meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang tersedia saat ini, menjadi fokus penting untuk meningkatkan perkembangan antibiotik baru, dengan memanfaatkan sumber produk alami yang dihasilkan oleh mikroorganisme laut (Woodford *et al.*, 2011; So *et al.*, 2011; Drummond *et al.*, 2000). Mengetahui adanya potensi mikroba sedimen bakau untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki bioaktivitas sebagai antibiotik, penelitian ini difokuskan untuk isolasi senyawa bioaktif mikroba sedimen bakau, yang berasal dari kawasan ekosistem bakau Pesawaran, Lampung Selatan, serta karakterisasi struktur senyawa bioaktifnya.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba sedimen bakau di sekitar kawasan hutan bakau Lampung serta bioaktivitasnya sebagai antibakteri.

1.3 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi atas potensi mikroba pada sedimen bakau di Lampung sebagai sumber metabolit sekunder dan aktivitasnya sebagai antibakteri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ekosistem Bakau

Ekosistem bakau adalah ekosistem pesisir wilayah peralihan antara ekosistem laut dan darat serta terletak di daerah tropis dan subtropis hampir (Thatoi dan Biswal, 2008). Ekosistem bakau diyakini sangat penting sebagai salah satu sumber daya alam yang berharga untuk sektor pembangunan dalam rangka meningkatkan kesejahteraan manusia melalui eksploitasi sumber daya dan stabilitas lingkungan. Ekosistem bakau juga dapat menjaga kualitas air muara sebagai habitat bagi banyak komersial spesies penting seperti ikan, kepiting, moluska dan udang (Christensen, 1982).

Hutan bakau merupakan hutan di daerah tropis dengan kandungan karbon yang tinggi (Donato *et al.*, 2011). Hutan bakau di Indonesia menyimpan sekitar 78% karbon di dalam tanah dan 20% karbon disimpan di pohon, akar atau biomassa, serta 2% disimpan di pohon mati atau kayu yang ditebang (Murdiyarto *et al.*, 2015). Ekosistem bakau menghilang di seluruh dunia dengan laju 1-2% per tahun karena perkembangan industri, urbanisasi yang cepat, pertumbuhan penduduk yang semakin meningkat serta adanya aktivitas antropogenik (Duke *et al.*, 2007).



Gambar 1. Ekosistem Bakau di Pesawaran

Ekosistem bakau (Gambar 1) dibentuk oleh asosiasi antara tumbuhan, hewan, jamur, bakteri, mikroalga, dan invertebrata yang tinggal di daerah pesisir dan muara sungai (Holguin *et al.*, 2001). Ekosistem bakau mengalami kondisi lingkungan yang ekstrem dengan kondisi salinitas yang tinggi, perubahan suhu dan kelembapan yang ekstrem serta lumpur yang bersifat anoksik pada kedalaman yang dangkal, yaitu keadaan tanah tanpa oksigen atau anaerobik (Ghizelini *et al.*, 2012). Saat kondisi air surut, tanah pada ekosistem bakau merupakan lapisan sedimen yang lanau dengan kandungan bahan organik yang tinggi (FAO, 2007). Kandungan bahan organik yang tinggi pada ekosistem bakau salah satunya karena aktivitas enzimatik mikroba serta metabolismenya (Saadoun *et al.*, 2013).

Ekosistem bakau menjadi habitat bagi berbagai macam mikroba seperti pada bagian pohon dan endapan lumpurnya. Tingginya kandungan karbon dan nutrisi lainnya, menyebabkan ekosistem bakau menjadi tempat tinggal sejumlah besar komunitas mikroba yang dapat beradaptasi dengan kondisi salinitas yang tinggi. Komunitas mikroba ini memainkan peran penting dalam siklus nutrisi seperti karbon, belerang, fosfor, dan nitrogen, yang dapat mengendalikan bahan kimia pada ekosistem bakau (Alongi *et al.*, 1993). Indeks keanekaragaman spesies yang tinggi serta sumber nutrisi yang terbatas menyebabkan terjadinya kompetisi antar spesies populasi mikroba yang tinggal pada ekosistem bakau. Dalam kondisi tersebut, mikroba berada di

bawah tekanan seleksi sehingga mereka harus melakukan strategi bertahan hidup salah satunya dengan mengeluarkan senyawa metabolit bioaktif sekunder baru (Sengupta *et al.*, 2015).

2.2 Sedimen Bakau

Sedimen atau lumpur bakau adalah pondasi untuk hutan bakau dan semua yang hidup di dalamnya seperti arthropoda, ikan, dan amfibi. Hewan ini menghabiskan sebagian dari kehidupan mereka di ekosistem bakau. Berbeda dengan kebanyakan tanah, sedimen bakau memiliki kondisi lingkungan yang unik, yaitu memiliki kandungan bahan organik yang melimpah dengan tingkat salinitas tinggi, pH tinggi, suhu lingkungan tinggi, serta kelembaban yang memberikan kondisi menarik sebagai substrat pertumbuhan mikroorganisme. Sedimen bakau Sebagian besar bersifat anaerobik sehingga membutuhkan adaptasi khusus untuk bertahan hidup di lingkungan tersebut (Ghizelini *et al.*, 2012),.

Sedimen bakau didominasi dengan partikel partikel halus berukuran lanau yang dikombinasikan dengan bahan organik dan garam dengan konsentrasi yang cukup tinggi. Fenomena pasang surut air laut akan berdampak pada kandungan nutrisi dan salinitas pada sedimen bakau. Sedimen bakau yang masih asli dapat mengalami transisi dari kondisi aerobik ke anaerobik. Pada bagian permukaan sedimen akan bersifat aerobik dan akan bersifat anaerobik pada kedalaman yang dangkal (Ghizelini *et al.*, 2012). Pada sedimen bakau terjadi proses degradasi material organik yang dikendalikan oleh mikroba seperti siklus karbon dan siklus nitrogen yang terlibat dalam semua transformasi dari fiksasi, amonifikasi, nitrifikasi dan denitrifikasi.

2.3 Mikroba Asosiasi Sedimen Bakau

Keragaman mikroba yang hidup pada sedimen bakau merupakan suatu sumber daya potensial untuk mengeksplorasi senyawa bioaktif baru (Mangamuri *et al.*, 2016). Studi tentang mikroba dalam sedimen bakau dapat memberikan informasi mengenai peran ekologis dan potensi bioteknologis yang unik di bidang pertanian, industri, obat-obatan dan farmasi (Thatoi *et al.*, 2013). Konsorsium mikroba yang berasosiasi dengan bakau terus mendapat perhatian bagi peneliti, karena diduga dapat menghasilkan molekul baru dengan aktivitas antimikroba dan antitumor (Mangamuri *et al.*, 2016). Menurut Alongi (1993) total biomassa mikroba yang terdapat pada sedimen bakau tidak pernah lebih besar dari 1,2% dari masa total detritus. Kelompok bakteri, actinomycetes, dan fungi membentuk sekitar 91% dari total biomassa mikroba, alga dan protozoa membentuk masing-masing 7% dan 2% pada ekosistem ini (Alongi, 1993).

Sedimen bakau merupakan habitat yang cocok dengan fungi. Kondisi sedimen bakau yang lembab, kaya akan bahan organik, serta serasi dan pH yang rendah merupakan habitat dengan keanekaragaman fungi yang cukup tinggi (Ghizelini *et al.*, 2012). Studi menunjukkan bahwa sekitar setengah dari jamur yang hidup pada sedimen diserap oleh partikel sedimen sehingga sulit untuk dideteksi. Sedimen bakau dengan tekstur kasar dan berpasir mengandung jumlah fungi yang lebih sedikit dibanding sedimen bakau dengan tekstur yang lebih halus. Fungi yang berasal dari sedimen bakau merupakan organisme yang penting dalam proses degradasi bahan organik yang berasal dari tumbuhan bakau. Fungi ini juga terbukti dapat memproduksi senyawa bioaktif alami (Ghizelini *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2009). Genus *Aspergillus* merupakan koloni fungi yang banyak ditemukan pada sedimen bakau, genus ini juga dilaporkan dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti alkaloid, terpenoid, steroid, dan poliketida. Penelitian mengenai senyawa aktif untuk obat baru dari produk fungi *Aspergillus* yang berasal dari ekosistem laut belum pernah berhenti dalam dua dekade terakhir

dan masih ditelusuri lebih lanjut (Cai *et al.*, 2021). Fungi termasuk *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Chitridiomycetes*, *Myxocycetes*, *Oomycetes*, *Thraustochitrids*, *Zygomycetes*, dan fungi mitosporik telah dilaporkan tinggal di ekosistem bakau. Fungi ini menghasilkan berbagai macam enzim yang dapat mendegradasi substrat organik dan anorganik pada sedimen bakau, serta pada daun, batang, dan akar pada tumbuhan bakau (Ghizelini *et al.*, 2012).

Ekosistem bakau merupakan habitat yang baik bagi actinomycetes agar dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang potensial. Actinobacteria yang berasal dari ekosistem bakau merupakan sumber yang kaya akan senyawa metabolit sekunder baru yang menjanjikan, sebagian besar senyawa metabolit yang telah dilaporkan berasal dari genus *Streptomyces*. *Streptomyces* adalah actinobacteria gram positif yang dapat menghasilkan beragam senyawa metabolit sekunder yang berguna pada bidang farmasi, termasuk enzim terapeutik, antibiotik, agen antitumor, vitamin, dan immnosupresan (Watve *et al.*, 2001). Genus *Streptomyces* menghasilkan kurang lebih 80% produk alami yang telah dilaporkan sampai saat ini (Panchanathan *et al.*, 2014). Beberapa genus actinomycetes yang dilaporkan berhasil diisolasi dari sedimen bakau ialah *Micromonospora*, *Microbacterium*, *Streptomyces*, *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Microbiospora* (Thatoi *et al.*, 2013).

Bakteri, alga, fungi, dan actinomycetes dilaporkan berkontribusi pada pemecahan substrat organik dan daur ulang senyawa organik. Produksi beberapa enzim, seperti selulosa, proteolitik, amilolitik, lipolitik, kitinolitik, fosfat-solubilizing, yang diproduksi oleh mikroba tersebut dilaporkan berguna dalam biodegradasi bahan organik sehingga meningkatkan produktivitas pada lingkungan laut dan meningkatkan pertumbuhan tanaman. Mikroba yang tinggal pada ekosistem bakau juga dapat memasok makanan untuk organisme lain seperti ikan dan udang yang tinggal dalam ekosistem, dengan cara memproduksi metabolit sekunder yang berguna untuk pertumbuhan hewan-hewan tersebut (Sivakumar *et al.*, 2007; Sahu *et al.*, 2007).

2.4 Potensi Senyawa Bioaktif dari mikroba Sedimen Bakau

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroba merupakan zat perantara atau produk metabolisme yang dihasilkan selama proses fermentasi. Senyawa metabolit sekunder diproduksi selama fase stasioner dan berperan dalam kompetisi, antagonisme, dan mekanisme pertahanan mikroba. Senyawa ini dapat diaplikasikan dalam obat-obatan, makanan atau kosmetik (Kumar *et al.*, 2020).

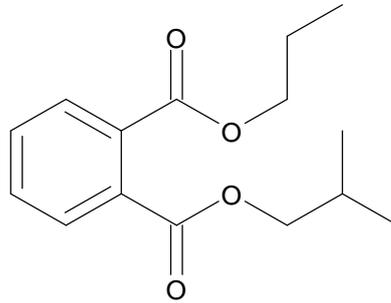
Sebagian besar senyawa metabolit sekunder berasal dari biosintesis mikroorganisme filamen seperti actinomycetes (sekitar 75%) dan mold (sekitar 17%). Ketika diisolasi dari alam, sekitar 40% dari filamentous fungi dan actinomycetes dapat menghasilkan senyawa metabolite sekunder dengan aktifitas antibakteri (Hassan *et al.*, 2012).

2.4.1 Ftalat

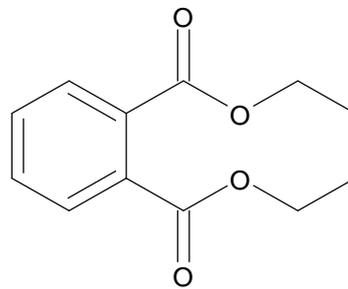
Ftalat adalah senyawa petrokimia yang digunakan sebagai *plasticizer* atau pelarut dalam berbagai produk industri. Turunan ftalat merupakan senyawa aktif biologis yang efektif. Banyak senyawa turunan ftalat yang berhasil diisolasi dari tanaman dan mikroorganisme, seperti fungi, bakteri, dan Actinomycetes terutama dari genus *Streptomyces* (Mangamuri *et al.*, 2016).

Penelitian mengenai isolasi senyawa metabolit sekunder dari mikroba sedimen bakau dan bioaktifitasnya, telah dilakukan oleh Mangamuri (2016) dengan menggunakan sampel sedimen bakau dari kawasan ekosistem bakau di Coringa. Dari hasil penelitian tersebut, berhasil diidentifikasi strain Actinomycetes yang diketahui *Streptomyces cheonanensis* VUK-A berdasarkan sifat morfologi, fisiologis, biokimia, dan molekuler. Dua senyawa turunan ftalat, yaitu 2-Metil butil propil

ftalat (Gambar 2) dan Dietil ftalat (Gambar 3) berhasil diisolasi dari strain ini dan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang diujikan pada *S. epidermis*, *E. coli*, dan *S. aureus*.



Gambar 2. Struktur Senyawa 2-Metil-Butil-Propil-Ftalat

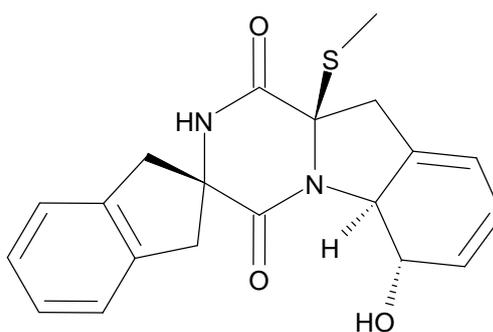


Gambar 3. Struktur Senyawa Dietil Ftalat

2.4.2 Diketopiperazin

Diketopiperazin merupakan dipeptida siklik terkecil dari hasil reaksi kondensasi ganda dua asam amino. Senyawa ini sangat berlimpah di alam dan memiliki struktur piperazin. Pembentukan dua ikatan peptida pada senyawa diketopiperazin dikatalisis oleh dua enzim, struktur senyawa metabolik yang unik ini dapat memainkan peran penting dalam penemuan obat baru. Senyawa metabolit sekunder diketopiperazin dilaporkan memiliki aktivitas yang tinggi terhadap antimikroba, antitumor, dan antivirus (Song *et al.*, 2021).

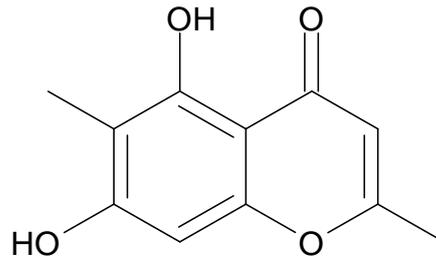
Penelitian yang dilakukan oleh Meng (2016) berhasil mengisolasi senyawa metabolit sekunder baru, alkaloid diketopiperazin dengan skeletons spirosiklik, dari fungi endofit *Penicillium broce* MA-23 yang diisolasi dari ekosistem bakau. Senyawa metabolite sekunder, Spirobrokazin A (Gambar 4) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, dan *S. aureus* dengan kontrol positif *chloromycetin*.



Gambar 4. Struktur Senyawa Spirobrokazin A

2.4.3 Poliketida

Poliketida merupakan senyawa metabolit sekunder yang dapat dihasilkan oleh mikroorganismenya, salah satunya ialah fungi. Poliketida memiliki berbagai macam aktivitas, termasuk antibakteri, anti-inflamatori, antioksidan, antivirus, penghambat enzim, dan aktivitas sitotoksik. Cai (2021) dilaporkan telah mengisolasi senyawa poliketida dari fungi *Aspergillus sp.* SCSIO41407 yang berasal dari sedimen bakau. Senyawa ini diidentifikasi sebagai Eugenitol (Gambar 5) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten pada *metichilin*.



Gambar 5. Struktur Senyawa Eugenitol

2.5 Antibakteri

Meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang tersedia saat ini, menjadi fokus penting untuk meningkatkan perkembangan antibiotik terbaru. Sebagian besar antibiotik yang tersedia bersumber dari produk alami yang dihasilkan oleh mikroba dan organisme laut. Sebagian tanaman juga diketahui memproduksi senyawa alami untuk melindungi diri dari mikroba patogen (Drummond *et al.*, 2000). Penisilin, merupakan senyawa metabolit sekunder pertama yang diekstrak dari fungi dan dapat mengendalikan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Hingga saat ini, lebih dari 400 senyawa peptida dengan aktivitas antimikroba ditemukan dari berbagai sumber seperti tanaman, searangga, mikroorganisme, dan vertebrata (Hassan *et al.*, 2012).

Secara umum, antibiotik adalah zat kimia yang kompleks, diproduksi oleh mikroorganisme sebagai senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit sekunder sebagai antibakteri dapat bereaksi terhadap bakteri baik dengan menghambat pertumbuhan maupun membunuh bakteri. Senyawa yang bersifat bakteriosatik bekerja menghambat replikasi bakteri dan pertumbuhannya sehingga apabila tubuh terinfeksi bakteri tertentu dan diberikan antibiotik jenis ini tubuh akan dapat memiliki lebih banyak waktu untuk membangun sistem kekebalan tubuh untuk melawan infeksi. Senyawa

yang bersifat bakterisidal akan bekerja membunuh atau melisis sel-sel bakteri ((Hassan *et al.*, 2012).

Senyawa metabolit dengan aktivitas antibiotik diproduksi melalui proses fermentasi mikroba setelah fase pertumbuhan logaritmik sel sel-nya atau selama fase stasioner sel mikroba (Lorenzo, 1985). Untuk mendapatkan produk alami, seperti ekstrak senyawa metabolit sekunder dan fraksi kromatografi untuk tujuan aktivitas antibakteri, penting untuk melakukan tes antibakteri *in vitro* yang sederhana, cepat, dan efisien, serta dapat diandalkan (Drummond *et al.*, 2000).

Metode yang digunakan untuk uji antibakteri suatu senyawa terbagi dalam tiga kelompok, termasuk metode bioautografi, difusi, dan dilusi. Metode dasar yang digunakan untuk uji bioaktivitas antibakteri ialah metode *broth dilution* atau metode pengenceran. Nilai MIC yang dihasilkan didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari zat antimikroba yang diuji yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam mg/ml atau mg/L (CLSI, 2012). Metode difusi agar dikembangkan sebagai prosedur alternatif praktis untuk metode *broth dilution* atau metode pengenceran. Metode difusi agar yang banyak digunakan adalah metode difusi *disk Kirby-Bauer*.³⁹ Dalam metode ini, cawan petri yang telah berisi media agar uji diusap dengan konsentrasi standar organisme uji, dan kemudian *disk* kertas yang mengandung konsentrasi antibiotik yang ditentukan ditempatkan di halaman bakteri pada media uji tersebut. Setelah inkubasi semalam, diameter zona pertumbuhan terhambat di sekitar *disk* diukur. Zona ini dipengaruhi oleh sejumlah variabel, termasuk media uji kerentanan (agar Mueller-Hinton adalah standar untuk uji bakteri), konsentrasi organisme uji, laju pertumbuhan organisme uji, konsentrasi antibiotik dalam petri, difusi antibiotik dalam media agar, dan kerentanan organisme terhadap antibiotik. Lima variabel pertama distandarisasi oleh CLSI; sehingga ukuran zona pertumbuhan terhambat secara langsung

berkaitan dengan kerentanan organisme. Semakin besar zona, semakin rentan organisme terhadap antibiotik (Patrick, 2015)

Sebagai produk organik alami dengan berat molekul yang rendah, antibiotik dapat menyerang mikroorganisme dengan tingkat konsentrasi yang rendah. Mekanismenya ialah antibiotik akan mengganggu biosintesis dinding sel peptidoglikan, membran sel, dan sintesis protein, hal ini akan menghambat replikasi DNA, transkripsi, serta metabolisme antara protein. Antibiotik akan memblokir biosintesis dinding sel dengan menghambat enzim yang bertanggung jawab untuk sintesis berbagai komponen dinding sel. Antibiotik dapat merusak struktur atau menghambat fungsi membran bakteri. Dalam sintesis protein, antibiotik dapat merusak subunit ribosom yang mengikat 50S untuk mencegah sintesis protein. antibiotik yang mempengaruhi DNA replikasi dan perbaikan menghambat enzim seperti girase, topoisomerase, dan N-metiltransferase. Beberapa antibiotik dapat juga menghambat subunit RNA polimerase bakteri dengan menolak masuknya nukleotida pertama yang penting untuk aktivasi polimerase (Hassan *et al.*, 2012).

2.6 Kitin

Kitin merupakan salah satu biopolimer alami terbarukan yang cukup melimpah dan mudah diperoleh, kedua setelah selulosa. Kitin adalah kelompok polisakarida yang tersusun oleh monomernya β -1,4-N-asetil-glukosamin (Herdaystuti dkk.,2009). Kitin tersebar luas di lingkungan baik darat maupun perairan sebagai komponen struktural eksoskeleton pada invertebrata, sisik ikan, dan dinding sel beberapa fungi dan alga. Kitin sering digunakan sebagai media yang dipadatkan untuk mengisolasi suatu mikroorganisme, zona bening yang terbentuk di sekitar koloni mikroba menunjukkan produksi kitinase ekstraseluler. Kitin tidak mudah larut dalam air atau sebagian pelarut organik dan sering dimodifikasi secara kimiawi

untuk membentuk suatu koloid dimana ukuran partikelnya lebih kecil sehingga mudah mendapatkan distribusi yang homogen dalam media agar (Murthy dan Bleakley , 2012).

Kitin dapat diperoleh dari kulit udang. Produksi kitin biasanya dilakukan dalam dua tahap, yaitu demineralisasi dan deproteinasi. Deproteinasi ialah tahap penghilangan protein yang terkandung pada kulit udang, dimana kadar proteinnya sekitar 21% dari bahan keringnya dengan menggunakan basa kuat (Solomon, 1980). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Emma dkk., kondisi optimum tahap deproteinasi adalah dengan menggunakan larutan NaOH 3,5% (b/v) dengan perbandingan 1 gram : 10 mL antara serbuk udang dan volume larutan NaOH , pada suhu 65°C selama 2 jam (Emma dkk., 2010). Demineralisasi bertujuan untuk menghilangkan senyawa anorganik yang terdapat pada kulit udang dengan menggunakan asam kuat. Kondisi optimumnya ialah menggunakan larutan HCl 1 N dengan perbandingan 1 gram sampel : 15 mL larutan HCl 1 N pada suhu kamar selama satu jam (Emma dkk., 2010).

Koloidal kitin adalah kitin yang dihidrolisis parsial dengan asam klorida (HCl) yang bertujuan untuk menghidrolisis atau melepaskan protein dan lemak yang terkandung di dalamnya sehingga memudahkan interaksi enzim dengan substrat. Koloid kitin banyak digunakan sebagai substrat dalam media fermentasi (Suraini dkk., 2008). Penambahan kitin ke dalam suatu media pertumbuhan menyebabkan koloni individu dari mikroorganisme yang diisolasi lebih baik dibandingkan tanpa kitin. Sebagai media, kitin menyediakan sumber karbon dan nitrogen utama yang dibutuhkan mikroorganisme (Joe dan Sarojini, 2017)

Media kitin memberikan selektivitas terhadap *Actinomycetes* dan bakteri yang hampir sama, namun pada jamur tidak memberikan pengaruh yang signifikan. Media kitin tanpa antibiotik memungkinkan perkembangan fungi yang

tumbuh akan rendah namun memiliki penyebaran radial yang besar. Kitin memiliki beberapa kelemahan yaitu keruhnya media membuat deteksi dan klasifikasi koloni kecil menjadi sulit, terutama jika media tidak dibersihkan, selain itu tidak berkembangnya pigmen suatu organisme pada media kitin dapat media lain untuk membedakan organisme yang diteliti dengan kelompok lain yang tumbuh bersamaan dalam media sehingga isolasi awal koloni harus dipindahkan ke penggunaan media baru (William dan Davies, 1965).

2.7 Solid State Fermentation (SSF)

Teknik fermentasi mendapat perhatian yang cukup besar dari industri farmasi dalam produksi senyawa metabolit yang berguna sebagai obat baru (Gupta dan Chaturvedi, 2019; Jiang *et al.*, 2020). SSF atau *Solid State Fermentation* merupakan proses fermentasi yang memanfaatkan matriks atau substrat padat yang mengandung kelembapan cukup untuk mendorong pertumbuhan mikroba tanpa tambahan air. Matriks padat dapat digunakan sebagai sumber nutrisi untuk pertumbuhan mikroba (Thomas *et al.*, 2013; Singhanian *et al.*, 2019). Kondisi pertumbuhan menggunakan *Solid State Fermentation* (SSF) menyerupai lingkungan asli mikroorganisme tersebut sehingga memungkinkan mikroba untuk beradaptasi dengan baik.

Substrat padat pada media fermentasi dapat digunakan sebagai sumber karbon dan energi untuk mikroorganisme tersebut (Pandey *et al.*, 2000). Tujuan penggunaan metode *Solid State Fermentasi* (SSF) ialah agar fungi atau bakteri yang dikultivasi pada media tersebut dapat berinteraksi secara erat dengan substrat sehingga akan menghasilkan produk fermentasi dengan konsentrasi yang tinggi pada substrat. Metode SSF biasanya hanya digunakan dalam skala kecil, namun memiliki potensi ekonomi dan ekologi yang lebih unggul dibanding dengan *Submerged Fermentation* (SmF). Beberapa

kelemahan SSF ialah penggunaan metode ini tidak disarankan untuk produksi industri, karena ketersediaan air yang terbatas pada substrat menyebabkan suhu, pH, dan kelembapan sulit dikendalikan (Hölker *et al.*, 2004).

Teknologi *Solid State Fermentation* (SSF) telah berhasil digunakan untuk produksi senyawa metabolit sekunder seperti antibiotik, senyawa aromatik, dan senyawa fenolik yang bernilai tinggi dalam industri farmasi. Sebagian besar filamentous fungi telah dieksploitasi untuk produksi senyawa metabolit sekunder menggunakan teknologi SSF, begitupun bakteri, actinomycetes dan ragi telah dilaporkan berhasil memproduksi senyawa metabolit dengan metode SSF (Kumar *et al.*, 2020).

2.8 Metode Isolasi Bahan Alam

Teknik yang digunakan untuk isolasi senyawa metabolit sekunder ialah ekstraksi. Teknik ekstraksi sangat berguna untuk memisahkan suatu komponen dari komponen-komponen yang lainnya menggunakan suatu pelarut yang bertujuan untuk menarik zat aktif dari suatu bahan, ini berkaitan dengan distribusi suatu zat terlarut baik organik maupun non-organik di antara dua fasa yang tidak saling bercampur (Achmadi, 1992). Metode ekstraksi memiliki prinsip polaritas senyawa '*like dissolve like*' (Khopkar, 2003). Teknik ekstraksi yang digunakan ialah maserasi dan partisi cair-cair.

2.8.1 Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana. Metode ini dilakukan dengan proses perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Teknik ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena tidak memerlukan adanya pemanasan sehingga kecil kemungkinan bahan alam menjadi rusak atau

terurai (Istiqomah, 2013). Rendaman maserat disimpan agar tidak terkena sinar matahari langsung, ini bertujuan untuk mencegah reaksi hidrolisis oleh cahaya atau perubahan warna (Khopkar, 2003). Proses ekstraksi dengan teknik maserasi dilakukan dengan perendaman sampel sehingga pelarut akan terjadi memecah dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan luar sel, ini akan menyebabkan senyawa metabolit sekunder akan terlarut sempurna dalam pelarut organik dan larutan menjadi pekat (Lenny, 2006). Proses maserasi dilakukan beberapa kali hingga larutan sampel bening yang menandakan senyawa metabolit sekunder telah ter-ekstrak seluruhnya (remaserasi). Ekstrak kemudian disatukan dan diuapkan dengan evaporator untuk memekatkan produk (Markham, 1998)

2.8.2 Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)

Partisi atau ekstraksi cair cair adalah metode pemisahan dengan menggunakan dua pelarut yang tidak saling bercampur, sehingga senyawa yang diinginkan dapat terpisah (Hanborne, 1996). Partisi didasarkan pada distribusi suatu zat terlarut baik zat organik maupun anorganik ke dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur dan memiliki kelarutan berbeda. Ekstraksi cair-cair didasarkan pada prinsip '*like dissolve like*', senyawa yang bersifat polar akan terbawa atau larut oleh pelarut polar, begitupun senyawa semipolar akan terbawa oleh pelarut semipolar, dan senyawa nonpolar akan terbawa oleh pelarut nonpolar (Khopkar, 2003).

2.9 Metode Pemisahan dan Pemurnian

Kromatografi ialah proses pemisahan yang didasarkan pada perbedaan distribusi campuran komponen antara fase gerak dan fase diam. Fase gerak terdiri dari cairan atau komponen gas, sedangkan fase diam terdiri dari padatan atau lapisan cairan yang teradsorpsi pada permukaan penyangga padat. Kecepatan elusi senyawa dapat dilihat dari interaksi antara senyawa dengan fase diam. Senyawa yang berinteraksi kuat dengan fase diam akan bergerak lebih sangat lambat, sedangkan senyawa dengan interaksi yang lemah akan bergerak cepat melalui sistem kromatografi. Kromatografi dapat berupa kromatografi kolom dan kromatografi lapis tipis (KLT) (Coskun, 2016; Skoog, 2014).

2.9.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan teknik pemisahan suatu senyawa dari campurannya sehingga senyawa yang dihasilkan lebih murni (Kristianti dkk., 2008). KLT adalah metode pemisahan fisikokimia pada senyawa bahan alam yang didasarkan adanya perbedaan distribusi molekul-molekul komponen diantara dua fase (eluen dan adsorben) dengan tingkat kepolaran berbeda (Hendayana, 2006).

Prinsip KLT adalah partisi dan adsorpsi, partisi ialah kemampuan suatu zat dalam larutan untuk berpisah ke dalam pelarut yang digunakan, sedangkan adsorpsi adalah penyerapan pada permukaan (Soebagio, 2002). KLT terdiri dari fase diam atau adsorben yaitu lapisan tipis silika gel, alumunium oksida, atau selulosa dan fase gerak atau eluen merupakan pelarut campuran yang ditempatkan dalam bejana pengembang.

Untuk mengidentifikasi senyawa dalam plat KLT dapat dilakukan dengan pengamatan langsung pada noda/bercak yang tampak dan dengan lampu UV pada rentang 245 nm dan 366 nm. Pada pelaksanaan kromatografi lapis tipis, larutan cuplikan atau sampel yang telah dipisahkan ditotolkan pada plat dengan injektor atau pipet mikro pada jarak 1 cm dari batas plat. Setelah itu plat siap untuk dikembangkan dengan fasa gerak di dalam *chambers* sampai pada batas tertentu (Widiyatni, 2010). Dalam kasus senyawa molekul sampel tidak berwarna, senyawa radioaktif, *fluorescence*, dan atau substansi bahan kimia tertentu dapat digunakan agar menghasilkan warna *visible* pada kromatogram (Donald *et al.*, 2006).

Posisi masing-masing molekul dalam campuran dapat diukur dengan menghitung rasio antara jarak yang ditempuh molekul dan pelarut, ini digunakan untuk mendeskripsikan molekul secara kualitatif. Nilai pengukuran ini disebut mobilitas relatif atau dikenal dengan simbol R_f (Donald *et al.*, 2006).

R_f (*Retention factor*) secara sistematis dinyatakan sebagai berikut:

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

Jika dari hasil identifikasi suatu komponen memiliki nilai R_f yang sama, maka mengindikasikan senyawa tersebut memiliki karakteristik yang sama, dan sebaliknya. Harga R_f ini dipengaruhi oleh beberapa parameter yaitu sistem pelarut, adsorben (ukuran butir, kandungan air, ketebalan), jumlah cuplikan yang ditotolkan pada plat dan suhu.

2.9.2 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom digunakan pemurnian suatu biomolekul.

Kromatografi kolom berupa gelas pipa yang dilengkapi dengan kran dan penyaring di dalamnya, *glass wool* atau kapas biasanya digunakan untuk menahan agar fase diam tidak menyumbat kran. Eluen yang digunakan dalam kromatografi kolom diawali dengan eluen yang memiliki tingkat kepolaran rendah dan kemudian dinaikkan tingkat kepolarannya secara perlahan-lahan. Berikut merupakan urutan eluen pada kromatografi berdasarkan kenaikan tingkat kepolarannya :

<i>n</i> -heksana	Non-polar  Polar
Sikloheksana	
Karbon tetraklorida	
Benzena	
Toluena	
Kloroform	
Etil asetat	
Aseton	
<i>n</i> -propanol	
Etanol	
Asetonitril	
Metanol	
Air	
Sumber : Gritter <i>et al.</i> ,1991.	

2.10 Karakterisasi

Spektroskopi adalah ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara energi cahaya dan materi. Teknik analisis spektroskopi dapat digunakan untuk menentukan struktur suatu senyawa belum diketahui. Keuntungan menggunakan teknik ini adalah waktu pengerjaan yang relatif cepat dan jumlah zat yang diperlukan untuk analisis relatif kecil (Silverstein *et al.*, 2014). Metode spektroskopi yang digunakan dalam analisis senyawa pada

penelitian ini antara lain *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), dan *Mass Spectroscopy* (MS).

2.10.1 *Fourier Transform Infrared Spectrofotometry* (FT-IR)

Analisis *Fourier Transform Infrared Spectrofotometry* (FT-IR) digunakan mengidentifikasi ikatan kimia dalam suatu senyawa yang belum diketahui strukturnya dengan menggunakan inframerah spektrum yang diserap oleh materi. Spektroskopi adalah teknik non-destruktif yang menggunakan efek interaksi radiasi elektromagnetik untuk menentukan struktur atom atau molekul dan tingkat energi substansi (Munajad, 2018)

FT-IR menunjukkan intensitas penyerapan puncak kelompok fungsional dari senyawa yang dianalisis untuk dapat mengidentifikasi ikatan kimia. Radiasi elektromagnetik yang berinteraksi dengan suatu zat dapat diserap, ditransmisikan, dipantulkan, dan disebarkan sehingga memberikan informasi yang signifikan mengenai struktur molekul dan tingkat transisi energi. FTIR digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsional dari materi yang dianalisis, yang ditunjukkan oleh intensitas penyerapan puncak.

2.10.2 *Mass Spectrofotometry* (MS)

Spektrofotometri massa dapat menentukan struktur molekul induk dari senyawa yang dianalisis, dengan merangkaikan berbagai struktur fragmen yang terdapat dalam spektrum massa. Spektroskopi massa berbeda dengan spektroskopi lainnya, pada spektroskopi ini senyawa yang dianalisis dapat mengalami perubahan fisika dan kimia karena terjadinya fragmentasi molekul-molekul senyawa.

Spektrometer massa dapat mendeteksi hasil pemecahan ion molekul senyawa dan dibaca dalam bentuk spektrum massa yang merupakan aluran antara massa fragmen dengan kelimpahan atau intensitasnya. Setiap fragmen akan muncul sebagai garis dengan tinggi dan massa garis berbeda yang menunjukkan kelimpahannya, dengan merangkaikan struktur fragmen yang diperoleh, maka struktur dari senyawa organik dapat ditentukan (Suhartati, 2017).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2022 sampai dengan Februari 2023 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Analisis spektrofotometer FT-IR dan uji bioaktivitas sebagai antibakteri dilakukan di UPT-LTSIT, Universitas Lampung. Analisis LC-MS/MS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Polri, Bogor

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu alat-alat gelas di antaranya: pipet tetes, gelas kimia, Erlenmeyer, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, kapas, kasa, karet gelang, *tissue*, lampu spiritus, mikropipet, pipa kapiler, pinset, jarum ose, spidol, autoklaf Tomy SX-700, *rotary evaporator* Buchii/R210, lampu UV Kohler/SN402006, *Laminar air flow*, neraca analitik *Wigen Houser*, inkubator Memmert-Germany/INC-02, mikroskop *axio Zeiss A1*, oven vakum *precision scientific 29 Laboratory 31566-26*, satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kolom kromatografi, dan instrument spektrofotometer FT-IR *carry 630*. Analisis LC-MS/MS menggunakan instrument *ultra-performance liquid chromatography (UPLC)* unit LC: ACQUITY UPLC H-class system, waters, USA dan spektrofotometer massa unit Xevo G2-S QToF, Waters, USA.

Bahan-bahan kimia yang digunakan yaitu, pereaksi serium sulfat, akuades, metanol, heksana, etil asetat (EtOAc), agar, kulit udang, etanol 70%, HCl 12M, NaOH, plat KLT silika gel 60 F254, air laut steril, *Tryptic Soy Broth* (TSB), plastik *wrap*, antibiotik (*ciproflacaxin* dan *cloramphenikol*), alumunium foil, Dimetil Sulfoksida (DMSO).

3.3 Biomaterial

Sampel lumpur bakau diambil secara acak pada dua titik berbeda untuk mewakili keragaman mikroba yang terkandung di dalam lumpur bakau. Penentuan koordinat masing-masing lokasi *sampling* menggunakan alat *Global Positioning System* (GPS). Sampel lumpur diambil dari zona akar pada kedalaman 10-20 cm tanaman *Avicennia marina*. Sampel lumpur diambil sebanyak 0,5 kg dengan menggunakan sendok *stainless steel*, dimasukkan ke dalam kemasan plastik steril (*ziplock*) yang telah diberi tanggal, lokasi dan disimpan dalam *coolbox* untuk dibawa ke laboratorium. Di laboratorium sampel lumpur disimpan dalam *refrigerator* dengan suhu 5-10°C sampai digunakan.

3.4 Metode

3.4.1 *Pretreatment* Media Pertumbuhan Mikroba

3.4.1.1 Persiapan Sampel Kulit Udang

limbah kulit udang disiapkan dan dibersihkan pada bagian kulit dan kepala udang dengan menggunakan air suling, lalu dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$ selama 48 jam. Limbah kulit udang selanjutnya dihaluskan agar

menjadi bubuk kulit udang yang akan digunakan sebagai substrat atau media pertumbuhan.

3.4.1.2 Persiapan Bubuk Kitin

Kitin dibuat dengan merujuk pada Hendri dkk., (2007) dengan beberapa modifikasi. Kitin dibuat dari 100 gram bubuk kulit udang kering didemineralisasi dengan penambahan HCl 1,5% (1:10 w/v) kemudian distirer selama 2 jam pada suhu ruang. Setelah itu, residu disaring dan dinetralkan hingga pH ± 7 , lalu dikeringkan dalam oven selama 24 jam. Residu hasil demineralisasi kemudian dideproteinasi dengan NaOH 10% dengan perbandingan 1:10 (w/v) dan di *stirer* selama 2 jam pada suhu $\pm 60^{\circ}\text{C}$. Residu kemudian disaring, dan dinetralkan hingga pH ± 7 . Hasil yang diperoleh didiamkan hingga kering dalam oven dan ditimbang. Serbuk yang didapatkan merupakan kitin.

3.4.1.3 Persiapan Koloid Kitin

Koloid kitin dibuat dengan merujuk pada Shaun dan Suma, (2017) dengan sedikit modifikasi. Koloid kitin dibuat dari 10 gram serbuk kitin dimasukkan ke dalam gelas *Beaker* 2000 mL, ditambahkan perlahan ± 150 ml HCl 12 M dan distirer selama 1 jam, hal ini bertujuan untuk menghidrolisis kitin agar menjadi partikel yang lebih kecil. Selanjutnya, hasil dari hidrolisis ditambahkan ± 2 L akuades dan didinginkan pada suhu $4-5^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam untuk memudahkan pembentukan endapan koloid kitin. Endapan yang terbentuk dinetralkan dengan akuades hingga pH ± 7 . Endapan disentrifus selama 5 menit 6000 rpm. Endapan diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan selanjutnya endapan yang merupakan koloidal kitin disimpan pada suhu 4°C .

3.4.1.4 Pembuatan Media Agar Kitin

Proses pembuatan media agar kitin dimulai dengan mensterilisasi alat-alat yang akan dipakai menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sejumlah 1% (w/v) koloid kitin, 2% (w/v) agar ditimbang, lalu dilarutkan ke dalam air laut pada Erlenmeyer. Selanjutnya, homogenat yang berada di dalam erlenmeyer ditutup dengan sumbat dan dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media agar kitin ditambahkan 50 µg/mL antibiotik *ciprofloxacin* untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Media agar dituang dalam cawan petri dan diberi sinar UV. Media agar kitin yang sudah memadat ditutup dengan *wrap* dan siap digunakan untuk isolasi mikroba.

3.4.2 Penumbuhan Isolat Asosiasi dengan Lumpur Bakau

Isolasi mikroorganisme asosiasi lumpur bakau dilakukan di dalam *laminar air flow cabinet*. Teknik isolasi merujuk pada Mangamuri *et al.*, (2016) dengan beberapa modifikasi. Secara umum, 1 g sampel lumpur magrove dilarutkan dalam 10 mL air laut steril lalu dihomogenkan. Selanjutnya, suspensi diambil 1 mL dan ditambahkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi 9 mL air laut, dilakukan pengenceran berseri hingga 10^{-4} , dari masing masing pengenceran diambil sebanyak 200 µL untuk diinokulasikan pada medium agar kitin dengan teknik sebar. Cawan petri yang telah berisi sampel kemudian ditutup, dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7- 28 hari sebagai masa pertumbuhan mikroorganisme. Setelah 7-28 hari, akan terlihat pertumbuhan dari mikroba pada media agar kitin. Setiap sampel yang ditanam dapat menghasilkan beberapa pertumbuhan mikroba yang berbeda.

3.4.3 Pemurnian Mikroba

Mikroba yang telah tumbuh kemudian dimurnikan ke dalam media kitin yang baru, ini bertujuan untuk memisahkan koloni mikroba yang memiliki morfologi berbeda untuk dijadikan isolat tersendiri atau isolat murni. Pengamatan morfologi pada isolat baru dilakukan kembali setelah masa inkubasi selama 3-7 hari. Jika masih ditemukan adanya morfologi mikroba yang berbeda dalam suatu media maka dipisahkan kembali hingga didapat isolat murni.

3.4.4 Kultivasi secara *Solid State Fermentation* (SSF)

Kultivasi secara *Solid State Fermentation* mengacu pada Setiawan *et al.*, (2021). Isolat yang telah murni kemudian diinokulasikan ke dalam media cair, dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Pertama tama dibuat media inokulum dengan menggunakan 1% kitin (w/v) dan 20 mL air laut buatan dalam wadah 100 mL , kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setiap isolat diambil sebanyak 1-2 ose untuk diinokulasikan ke dalam media cair yang telah disiapkan. Media inokulum diinkubasi selama 7-10 hari secara statis pada suhu ruang dengan dilakukan pengamatan selama masa pertumbuhan.

Isolat yang telah tumbuh pada media inokulum kemudian diinokulasikan pada media fermentasi padat (*Solid State Fermentation*). Sebanyak 100 gr kulit udang basah dihaluskan dengan *blender* untuk digunakan sebagai substrat padat tanpa demineralisasi dan deproteinasi, kemudian substrat dipindahkan ke dalam wadah berkapasitas 1 L dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya inokulum cair diinokulasikan ke dalam media fermentasi padat, prosedur ini dilakukan di dalam *Laminar Air Flow* (LAF). Media

fermentasi yang telah mengandung isolat kemudian diinkubasi selama 14 hari secara statis pada suhu ruang (Setiawan *et al.*, 2021).

3.4.5 Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Setelah tahapan fermentasi, hasil yang diperoleh kemudian diekstraksi dengan menambahkan etil asetat (EtOAc) (1:1) ke dalam wadah fermentasi, kemudian dihomogenisasi dan disimpan selama 1 x 24 jam pada suhu ruang. Hasil ekstraksi kemudian disaring untuk mendapatkan filtrat produk dari mikroorganisme. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan dan padatnya diekstraksi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat untuk mengambil senyawa bioaktif yang masih tertinggal di padatan. Tahapan ekstraksi dilakukan hingga rendaman maserat sudah tidak berwarna yang mengindikasikan bahwa senyawa metabolit sudah tereskrak seluruhnya. Keseluruhan filtrat dipekatkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan tekanan 95 mbar dan suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak EtOAc setiap isolat. Ekstrak kasar EtOAc digunakan untuk uji skrining bioaktivitas dari sampel (Sengupta *et al.*, 2015).

3.4.6 Peremajaan Isolat Bakteri *S. aureus*

Bakteri yang digunakan pada uji bioaktivitas penelitian ini ialah bakteri *S. aureus*, yang didapatkan dari deposit Laboratorium Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Peremajaan bakteri dilakukan sebelum digunakan dalam pengujian, hal ini dilakukan agar bakteri uji memulai metabolisme kembali setelah penyimpanan. Media yang digunakan dalam peremajaan bakteri ialah *Tryptic Soy Broth* (TSB), media ini memiliki nutrisi yang dibutuhkan dalam masa pertumbuhan bakteri. Pembuatan media TSB dilakukan dengan melarutkan 3 g TSB dalam 100 mL akuades dan ditambahkan 2% (w/w) agar. Media kemudian

disterilisasi dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C. Media dituang ke dalam tabung reaksi dan didiamkan hingga media memadat dalam *laminar air flow* (LAF). Bakteri *S. aureus* digores pada media agar TSB menggunakan jarum ose bulat. Bakteri diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C di dalam inkubator (Missiakas and Schneewind, 2013).

3.4.7 Uji Skrining Bioaktivitas (Ekstrak Kasar)

Skrining awal bioaktivitas dilakukan dengan metode dilusi menggunakan *microplate 96 wells* yang merujuk pada Sarker *et al.*, (2007) dengan beberapa modifikasi. Bakteri uji yang digunakan adalah *S. aureus*.

3.4.8.1 Persiapan Inokulum Bakteri

Inokulum bakteri disiapkan menggunakan *Tryptic Soy Broth* (TSB) dan disesuaikan kekeruhannya dengan standar McFarland 0,5. Bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian dilakukan pengenceran 1: 100 (v/v) dalam media *Broth* sebelum digunakan untuk pengujian.

3.4.8.2 Persiapan Ekstrak Mikroba dan Antibiotik

Crude ekstrak mikroba yang ingin diuji disiapkan dalam konsentrasi 10 mg/mL dengan melarutkan ekstrak menggunakan DMSO 2%. Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif dalam uji ialah kloramfenikol dengan konsentrasi 2 mg/mL.

3.4.8.3 Uji aktivitas senyawa sebagai antibakteri dengan bakteri *S. aureus*

Microplate 96 wells disiapkan, selanjutnya pada sumuran blanko ditambahkan 195 μL media TSB dan 25 μL inokulum bakteri. Kontrol positif yang digunakan ialah 145 μL media TSB, 25 μL inokulum bakteri, dan 50 μL kloramfenikol (2 mg/mL). Sumuran kontrol negatif ditambahkan 145 μL media TSB, 25 μL inokulum bakteri, dan 50 μL DMSO 2 %. Kontrol media yang digunakan ialah 220 μL media TSB. Sumuran senyawa uji mengandung 145 μL media TSB, 25 μL inokulum bakteri, dan 50 μL senyawa uji (10 mg/mL). Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan. *Plate wells* yang sudah dibalut longgar dengan plastik *warp* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Hasil skrining *crude* ekstrak sampel terhadap *S. aureus* diukur dengan alat *hospitex reader* (OD_{630nm}) dan hasilnya dimaknai sesuai dengan *standar Clinical dan Laboratory Standard Institute* (Komite Nasional Standar Laboratorium Klinis, 2012).

3.4.8 Identifikasi mikroba

Isolat yang aktif sebagai antibakteri kemudian dilakukan identifikasi menggunakan metode *slide culture* yang merujuk pada McCleary (2005) dengan beberapa modifikasi. Pertama-tama, disiapkan *coverslip* yang akan digunakan, lalu *coverslip* ditanamkan ke dalam media agar kitin 1% pada kemiringan 45°, selanjutnya koloni mikroba murni digoreskan berdekatan dengan sudut pada *coverslip*. Setelah 3-7 hari, *coverslip* diambil secara perlahan dari media agar untuk dipindahkan ke dalam kaca preparat. Hifa, miselium, spora, atau konidia diamati di bawah mikroskop *Zeis Axio Imager A1* pada perbesaran 50, 100, dan 400 M serta didokumentasikan hasil yang diperoleh.

3.4.9 Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengkonfirmasi keberadaan komponen yang terdapat dalam sampel, selain itu uji KLT juga dapat digunakan untuk mengetahui pola pemisahan senyawa yang terdapat dalam sampel. Ekstrak kasar yang telah didapatkan sebelumnya kemudian dianalisis menggunakan KLT dengan fase diam berupa plat silika F254. Fase gerak atau eluen yang digunakan merupakan kombinasi dari heksana dan etil asetat dengan perbandingan tertentu yang telah dijenuhkan sebelumnya. Setelah dielusi, plat KLT akan menampilkan noda atau bercak yang terlihat di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm.

Plat KLT kemudian disemprot dengan reagen serum sulfat untuk menampilkan noda hasil KLT, lalu dikeringkan di atas pemanas. Pereaksi serum sulfat digunakan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa organik di dalam sampel yang ditandai dengan timbulnya bercak berwarna coklat kehitaman. Untuk pengamatan lebih lanjut digunakan pereaksi ninhidrin dan *Dragendorff*. Pereaksi ninhidrin digunakan untuk mengetahui kandungan asam amino yang pada sampel, ditandai dengan terbentuknya bercak berwarna ungu yang mengindikasikan adanya gugun NH_2 . Pereaksi *Dragendorff* digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid (N-tercier) dalam sampel ditandai dengan terbentuknya bercak *orange* pada hasil KLT. Plat KLT yang telah dikeringkan, diamati dan dihitung nilai R_f nya guna mengetahui tingkat kepolaran masing-masing komponen.

3.4.10 Fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi

Fraksi-fraksi yang telah diketahui kandungan senyawanya, kemudian dilakukan fraksinasi lebih lanjut dengan kolom kromatografi.

Fraksinasi dilakukan beberapa kali dengan fase diam yakni silika gel.

Elusi dilakukan dengan beberapa sistem gradien pelarut dari non-polar ke polar. Pertama-tama, fase diam (silika gel) ditambahkan *n*-heksana lalu dimasukkan secara perlahan-lahan dari atas kolom dan mengalir ke bawah kolom kaca silinder dengan bantuan gravitasi. Setelah kolom siap, sampel ditambahkan melalui bagian atas kolom. Fase gerak kemudian dialirkan melalui kolom. Senyawa dalam campuran memiliki kemampuan yang berbeda dalam berinteraksi dengan fase diam dan fase gerak, sehingga jangka waktu yang dibutuhkan untuk mengalir pada kolom menuju penampung juga berbeda. Fraksi-fraksi hasil kolom divisualisasikan dengan KLT di bawah lampu UV 254nm dan menggunakan pereaksi serium sulfat (Bajpai *et al.*, 2016).

3.4.11 Uji Bioaktivitas Antibakteri

Uji bioaktivitas fraksi hasil kromatografi kolom kemudian dilakukan dengan metode difusi agar yang merujuk pada Hudzicki (2009) dengan beberapa modifikasi. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus*.

3.4.14.1 Persiapan Inokulum Bakteri

Inokulum bakteri disiapkan dengan menggunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB), lalu diinkubasi selama 2 jam.

Inokulum bakteri kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan standar Mc-Farland 0,5.

3.4.14.2 Persiapan Ekstrak Mikroba dan Antibiotik

Fraksi yang ingin diuji disiapkan dalam konsentrasi 2 mg/mL dengan melarutkan fraksi menggunakan DMSO 2%. Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif dalam uji ialah kloramfenikol dengan konsentrasi 2 mg/mL.

3.4.14.3 Uji aktivitas antibakteri dengan bakteri *Staphylococcus aureus*

Media agar *Tryptic Soy Broth* (TSB) disiapkan pada cawan petri dan ditempatkan dalam *Laminar Air Flow* (LAF) pada suhu ruang agar media memadat. *Cotton swab* steril disiapkan, kemudian dimasukkan *swab* ke dalam inokulum bakteri. *Swab* yang telah mengandung bakteri kemudian diinokulasikan pada media agar TSB dengan teknik *streak*. Ring dengan diameter 8 mm dimasukkan secara perlahan ke dalam media agar menggunakan pinset yang sebelumnya telah dibakar di atas bunsen. Pada setiap ring ditambahkan 50 μ L fraksi uji (konsentrasi 2 mg/ mL) secara perlahan. Kontrol positif yang digunakan ialah 50 μ L kloramfenikol dan kontrol negatif digunakan 50 μ L DMSO 2%. Cawan petri kemudian dibalut longgar dengan plastik *warp* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati secara visual dengan pembentukan zona bening, diameter zona bening diukur menggunakan penggaris (Komite Nasional Standar Laboratorium Klinis, 2012).

3.4.12 Karakterisasi Senyawa

Sampel yang sudah murni, selanjutnya dianalisis dengan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), dan *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FT-IR).

3.4.15.1 Analisis *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FT-IR).

Analisis dengan spektrofotometri FT-IR digunakan untuk mengkonfirmasi gugus fungsional dari senyawa yang dianalisis. Pengukuran pada spektrum inframerah dilakukan pada daerah cahaya inframerah pada bilangan gelombang 4000-200 cm^{-1} . Pita absorpsi inframerah yang dihasilkan spesifik untuk menunjukkan gugus fungsional suatu senyawa organik.

Analisis spektrum FT-IR dilakukan pada daerah spektrum FT-IR tengah (4000-200 cm^{-1}). Dalam analisis spektrum FTIR, pertama-tama ialah mengidentifikasi jumlah pita serapan, jika sampel menghasilkan pita serapan kurang dari lima pita maka sampel yang dianalisis merupakan senyawa organik sederhana dengan berat massa molekul kecil. Spektrum FT-IR yang memiliki lebih dari lima pita serapan maka merupakan molekul kompleks. Selanjutnya dilakukan analisis pada daerah *single bond* (2500-4000 cm^{-1}), lalu dilakukan analisis pada daerah *triple bond* (2000-2500 cm^{-1}) dan pada daerah *double bond* (1200-2000 cm^{-1}) ikatan rangkap dapat berupa karbonil (C=O), kelompok imina (C=N), dan azo (N=N). Selanjutnya dilakukan analisis pada daerah sidik jari (600-1200 cm^{-1}) daerah ini biasanya spesifik dan unik. Analisis FT-IR juga dapat dilakukan dengan menggunakan referensi sebagai perbandingan standar (Nandiyanto dkk., 2019),

3.4.15.2 Analisis dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Sampel yang sudah murni kemudian dilarutkan dalam metanol, selanjutnya sampel disuntikkan ke dalam sistem LC-MS/MS.

Analisis pada sistem *Liquid Chromatography (LC)* akan menghasilkan puncak kromatogram dengan waktu retensi yang sesuai, hal ini mengindikasikan bahwa telah terjadi pemisahan komponen-komponen dalam fraksi berdasarkan kepolaran.

Analisis kemudian diteruskan ke dalam sistem spektrometri massa (MS/MS), hasil analisis meliputi spektrum massa dari tiap komponen berupa rasio massa terhadap muatan

(m/z). Data hasil Analisa LC-MS/MS diolah dengan menggunakan *software masslynx* untuk mengidentifikasi komponen senyawa metabolit sekunder dalam fraksi.

Kromatogram diolah melalui deteksi puncak dan penyelarasan waktu retensi. Hasil dari langkah tersebut akan menunjukkan spektrum massa yang meliputi hubungan antara rasio massa terhadap muatan (m/z) dengan intensitas puncak. Hasil pengolahan data analisa LC-MS/MS akan menunjukkan berat molekul senyawa dan rumus molekulnya. Prediksi komponen senyawa metabolit sekunder dalam fraksi kemudian dilakukan dengan membandingkan hasil analisis yang diperoleh dengan *database* yang ada pada *website chemspider* (Septianingsih *et al.*, 2018).

Diagram alir penelitian ditunjukkan pada Lampiran 1.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan hasil penelitian yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Isolat mikroba BL2R1-2 yang berasal dari sedimen bakau pada lokasi B yaitu Kawasan hutan bakau Petengoran, telah berhasil diisolasi serta terindikasi sebagai *Actinomycetes* dari genus *Streptomyces sp.*
2. *Crude* ekstrak isolat BL2R1-2 memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dengan nilai penghambatan sebesar 56,75% pada masa inkubasi 18 jam.
3. Isolat BL2R1-2 diduga mampu menghasilkan senyawa alkaloid diketopiperazin berdasarkan hasil karakterisasi senyawa menggunakan FT-IR dan LC-MS/MS.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian, maka perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut terhadap ekstrak aktif isolat BL2R1-2 yang diperoleh, serta uji bioaktivitas antibakteri terhadap fraksi yang telah murni menggunakan bakteri gram positif dan gram negatif. Selain itu, berdasarkan prediksi identifikasi mikroba yang diperoleh menunjukkan kemiripan dengan *Streptomyces sp* sehingga perlu dilakukan identifikasi lebih lanjut secara filogenetik.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmadi, S. 1992. *Teknik Kimia Organik*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Alongi, D. M., Christoffersen, P., and Tirendi, F. 1993. The Influence of Forest Type on Microbial-Nutrient Relationships in Tropical Mangrove Sediments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **171**(2): 201-223.
- Bajpai, V. K., Majumder, R., and Park, J.G. 2016. Isolation and Purification of Plant Secondary Metabolites using Column Chromatography Technique. *Bangladesh. J. Pharmacol.* **11**(4): 844-848.
- Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 3rd Edition*. Burgess Publishing Co. Minneapolis.
- Baskaran, R., Mohan, P. M., Sivakumar, K., & Kumar, A. 2016. Antimicrobial Activity and Phylogenetic Analysis of *Streptomyces Parvulus* Dosmb-D105 Isolated from the Mangrove Sediments of Andaman Islands. *Acta. Microbiol. Immunol. Hung.* **63**(1): 27-46.
- BPS. 2015. *Luas dan Kondisi Hutan Mangrove Menurut Provinsi Lampung*. Badan Pusat Statistik Provinsi Lampung. <https://lampung.bps.go.id>. Diakses pada 8 Januari 2022.
- Cai, J., Chen, C., Tan, Y., Chen, W., Luo, X., Luo, L., Yang, B., Liu, Y., and Zhou, X. 2021. Bioactive Polyketide and Diketopiperazine Derivatives from The Mangrove-Sediment-Derived Fungus *Aspergillus sp.* SCSIO41407. *Molecules* **26**(16): 48-51.
- Camilli, A. and Bassler, B.L. 2006. Bacterial Small-Molecule Signaling Pathways. *Science* **311**(5764): 1113-1116.

- Carrol, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., Morse, S. A., Mietzner, T. A., Detrick, B., Mitchell, T. G., McKerrow, J. H., and Sakanari, J. A. 2019. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology 27 th edition: Growth, Survival, and Death of Microorganisms*. McGraw Hill Medical.
- Cheng, Z. S., Pan, J. H., Tang, W.C., Chen, Q. J., and Lin, Y.C .2009. Biodiversity and Biotechnological Potential of Mangrove-Associated Fungi. *J. For. Res* **20**(1):63-72.
- Christensen, B. 1982. *Management and Utilization of Mangroves in Asia and The Pacific*. FAO Environmental Paper 3. Rome.
- CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed CLSI document M07-A9*. Clinical and Laboratory Standards Institute. USA.
- Coskun, O. 2016. Separation Techniques : Chromatography. *North. Clin. Instabul* **3**(2): 156-160.
- De Rop, A.-S.; Rombaut, J.; Willems, T.; De Graeve, M.; Vanhaecke, L.; Hulpiau, P.; De Maeseneire, S.L.; De Mol, M.L.; Soetaert, W.K. 2021. Novel Alkaloids from Marine Actinobacteria: Discovery and Characterization. *Mar. Drugs* **20**(6).
- Debbab, A., Aly, A. H., and Proksch, P. 2013. *Mangrove* derived Fungal Endophytes–A Chemical and Biological Perception. *Fungal. Divers.* **61**(1):1-27.
- Dobretsov, S., Dahms, H.U., and Qian, P.Y. 2006. A review: Inhibition Of Biofouling By Marine Microorganisms And Their Metabolites. *Biofouling* **22**:43-54.
- Dompeipen, E. J., Kaimudin, M., dan Dewa, R. P. Isolasi Kitin dan Kitosan dari Limbah Kulit Udang. *Majalah Biam* **12**(1): 32-39.
- Donald, P. L., Lampman, G.M., Kritz, G.S., and Engel R. G. 2006. *Engel Introduction to Organic Laboratory Techniques (4th Ed)*. Thompson Brooks/Cole. P. 797-817. <http://www.chemicke-listy.cz>. Diakses pada 9 Januari 2022.

- Donato, D. C., Kauffman, J. B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., Stidham, M., and Kanninen, M. 2011. Mangroves Among The Most Carbon-Rich Forests in The Tropics. *Nat. Geosci.* **4**(5): 293-297.
- Drummond A.J and Waigh R.D. 2000. The Development of Microbiological Methods for Phytochemical Screening. *Recent Research Developments in Phytochemistry* **4**: 143-152.
- Duke, N. C., Meynecke, J. O., Dittmann, S., Ellison, A. M., Anger, K., Berger, U., Cannicci, S., Diele, K., Ewel, K. C, Field, C. D., Koedam, N., Lee, S. Y., Marchand, C., Nordhaus, I., and Dahdouh-Guebas, F. 2007. A World Without Mangroves?. *Science* **317**(5834): 41-42.
- Emma, S., Soeseno, N., and Adiarto, T., 2010. *Sintesis Kitosan, Poli (2-amino-2-deoksi-D-Glukosa), Skala Pilot Project dari Limbah Udang sebagai Bahan Baku Alternatif Pembuatan Biopolimer*, (Prosiding Seminar Nasional Teknik Kimia "kejuangan"). UPV Veteran Yogyakarta. Yogyakarta
- FAO. 2007. *The World's Mangroves 1980-2005*. Viale delle Terme di Carla, 00153. Rome
- Fessenden, R. J and Fessenden, J. S. 1986. *Kimia Organik Edisi ke -3*. Erlangga. Jakarta.
- Ghizelini, A.M., Mendonça-Hagler, L. C. S., and Macrae, A. 2012. Microbial Diversity in Brazilian Mangrove Sediments: A Mini Review. *Braz. J. Microbiol.* **43**(12):42-54.
- Gritter. R.J., Bobbit, J.M., dan Swarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Penerbit ITB. Bandung.
- Gupta, S., Chaturvedi, P. 2019. Enhancing Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants using Endophytic Elicitors: *A Case Study Of Centella Asiatica (Apiaceae) and Asiaticoside*. In: Hodkinson, T. R., Doohan F. M., Saunders, M. J., Murphy, B. R. (Eds.). *Endophytes for a Growing World*. Cambridge University Press. Cambridge.

- Harborne, J.B. 1996. *Metode Fitokimia :Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB. Bandung.
- Harrigan, W. F. 1998. *Laboratory Methods in Food Microbiology 3rd edition* Academic Press. California.
- Hassan, M. A., Kamal, Y. I. E., Ramlan, A., Mohamed, R. S., and Hesham, A. E. 2012. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *J. Technol. (Sciences and Engineering)* **59**(1): 101-111.
- He, F., Li, X., Yu, J.-H., Zhang, X., Nong, X., Chen, G. Zhang, H. 2019. Secondary Metabolites from The Mangrove Sediment-Derived Fungus *Penicillium pinophilum* SCAU037. *Fitoterapia* **136**(104177).
- Hendayana, S. 2006. *Kimia Pemisahan Metode Kromatografi dan Elektroforesis Modern*. PT. Remaja Rosadakarya. Bandung.
- Hendri, J., dan Laila, A. 2007. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Lampung
- Herdaystuti, N., Raharjo, T.J., Mudasir., dan Matsjch, S. 2009. Kitin dari Limbah Cangkang Udang sebagai Media untuk Bakteri Kitinolitik yang Diisolasi dari Lumpur Sawah. *JML* **16**(2): 115-121.
- Holguin, G., Vazquez, P., & Bashan, Y. 2001. The Role of Sediment Microorganisms in The Productivity, Conservation, and Rehabilitation of *Mangrove* Ecosystems: An Overview. *Bio. Fertil. Soils*. **33**: 265-278.
- Holker, U., Hofer, M., and Lenz, J. 2004. Biotechnological Advantages of Laboratory-Scale Solid –State Fermentation with Fungi. *App. Microbiol. Biotech.* **64**(2): 175-186
- Ichikawa, S and Matsuda, A. 2008. Chemistry and Structure-Activity Relationship of Antibacterial Nucleoside Natural Products. *J. Nucleic. Acids*. **52**(1): 77-78.

- Istiqomah. 2013. *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis Retrofacti Fructus)*, (Skripsi). UIN Jakarta. Jakarta
- Jiang, J., Zu, Y., Li, X., Meng, Q., and Long, X. 2020. Recent Progress Towards Industrial Rhamnolipids Fermentation: Process Optimization And Foam Control. *Bioresour. Technol.* **298**: 122-394.
- Joe, S and Sarojini, S. 2017. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. *Mapana Journal of Science* **16**(4): 37-45.
- Justin N. K., Edmond S., Ally R. M. and Xin He. 2014. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties . *J. Pharm. Pharmacol.* **2**:377-392.
- Katili, A. S, and Retnowati, Y. 2017. Short Communication: Isolation of Actinomycetes from mangrove ecosystem in Torosiaje, Gorontalo, Indonesia. *Biodiversitas* **18**(2): 826-833.
- Khopkar, S.M. 2003. *Konsep Dasar Kimia Analitik Edisi Pertama*. UI Press. Jakarta.
- Kiran, G. S., Priyadharsini, S., Sajayan, A., Ravindran, A., and Selvin, J. 2018. An Antibiotic Agent Pyrrolo[1,2-a]Pyrazine-1,4-Dione, Hexahydro Isolated from A Marine Bacteria Bacillus Tequilensis MSI45 Effectively Controls Multi-Drug Resistant Staphylococcus aureus. *RSC. Advances* **8**(32): 17837-17846.
- Koch, A. L. 1970. Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments. *Anal. Biochem.* **38**: 252-259.
- Kristianti, A.N., Aminah N.S., Tanjung M., dan Kurniadi, B. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. FMIPA Universitas Airlangga. Surabaya.
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Kumar Patel, A., and Rani Singhania, R.. 2020. Recent Developments On Solid-State Fermentation For Production of Microbial Secondary Metabolites, Challenges And Solutions. *Bioresour. Technol.* **323**(12): 45-66.

- Lenny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenil Propanoida, dan Alkaloida*, (Karya Tulis Ilmiah). FMIPA Universitas Sumatera Utara. Sumatera Utara.
- Li, K., Chen, S., Pang, X., Cai, J., Zhang, X., Liu, Y., Zhu, Y., and Zhou, X. 2022. Natural Products from Mangrove Sedimen-derived Microbes: Structural Diversity, Bioactivities, Biosynthesis, and Total Syntesis. *Eur. J. Med. Chem.* **230**: 114-117.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications* **3**: 60-86.
- Li, X.-L., Xu, M.-J., Zhao, Y.-L., & Xu, J. 2010. A Novel Benzo[f][1,7]Naphthyridine Produced by *Streptomyces Albogriseolus* from Mangrove Sediments. *Molecules* **15**(12), 9298-9307.
- Locci R. 1989. *Streptomyces and related Genera, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins Company. Baltimore. **4**: 2451-2508.
- Lorenzo, D. V. 1985. Factors Affecting Microcine 492 Production. *J. Antibiot.* **38**(3): 340-45.
- Mangamuri, U. K., Muvva, V., Poda, S., Manavathi, B., Bhujangarao, C., and Yenamandra, V. 2016. Chemical Characterization and Bioactivity of Diketopiperazine Derivatives from The Mangrove derived *Pseudonocardia endophytica*. *Egypt. J. Aquat. Res.* **42**(2): 169-175.
- Mangamuri, U., Muvva, V., Poda, S., Naragani, K., Munaganti, R.K., Chitturi, B., and Yenamandra, V. 2016. Bioactive Metabolites Produced by *Streptomyces cheonanensis* VUK-A from Coringa Mangrove Sediments: Isolation, Structure Elucidation and Bioactivity. *3 Biotechnol* **6**(1): 63.
- Markham, K.R. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Penerbit ITB. Bandung.
- McCleanny, N. 2005. Laboratoty Detection and Identifiacion of *Aspergillus* Species by Microscopic Obeservation and Culture : the Traditional Approach. *Med. Mycol.* **43**(1): 125-128.

- Meng, L.H., Wang, C.Y., Mandi, A., Li, X.M., Hu, X.Y., Kassack, M.U., Kurtan, T., and Wang, B.G. 2016. Three Diketopiperazine Alkaloids with Spirocyclic Skeletons and One Bisthiodiketopiperazine Derivative from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Penicillium brocae* MA-231. *Org. Lett.* **18**(20): 5304-5307.
- Missiakas, D.M., and Schneewind, O. 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr. Protoc. Microbiol* **28**(9): 9C.1.
- Munajad, A., Subroto, C and Suwarno. 2018. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy Analysis of Transformer Paper in Mineral Oil-Paper Composite Insulation under Accelerated Thermal Aging. *Energies* **11**(2): 364.
- Murdiyarso, D., Purbopuspito, J., Kauffman, J. B., Warren, M., Sasmito, S., Donato, D., and Kurnianto, S. 2015. The potential of Indonesian Mangrove Forests for Global Climate Change Mitigation. *Nat. Clim. Change.* **5**: 1089-1092.
- Murthy, N and Bleakley, B. 2012. Simplified Method of Preparing Colloidal Chitin Used For Screening of Chitinase- Producing Microorganisms. *Internet. J. Microbiol.* **10**(2).
- Mutiasari, I. R. 2012. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Jamur Pleurotus ostreatus Dengan Metode DPPH dan Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Teraktif, (Skripsi)*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia. Depok.
- Nandiyanto, A. B. D., Oktiani, R., and Ragadhita, R. 2019. How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. *Indones. J. Sci. Technol.* **4**(1): 97-118.
- Niu, G and Tan, H. 2015. Nucleoside Antibiotics: Biosynthesis, Regulation, and Biotechnology. *Trends. Microbio.* **23**(2): 110-119.
- Panchanathan, M., Jayachandran, V., Kannan, S., and Se-Kwon, K. 2014. Pharmaceutically Active Secondary Metabolites of marine Actinobacteria. *Microbiol. Res.* **169**(4): 262-278.

- Pandey, A., Soccol, C. R., Nigam, P., and Soccol, V. T. 2000. Biotechnological Potential of Agro-Industrial Residues. I: Sugarcane Bagasse. *Bioresource Technol.* **74**(1): 69-80.
- Patrick, R. M. 2015. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition): The Clinician and the Microbiology Laboratory*. Elsevier Health. USA.
- Pettit, R. K. 2011. Small-Molecule Elicitation of Microbial Secondary Metabolites. *Microbes. Biotechnol.* **4**(4): 471-478.
- Saadoun, I., Humoudi, K. B., Kalander, M., Al-Joubori, B., and Jaradat, Z.W. 2013. Inhibitory Bioactive Metabolites Produced by Actinomycetes Isolated from Mangrove Ecosystem of Khor Kalba' shores, UAE. *Int. J. Biotechnol. Food. Sci.* **1**(2): 39-45.
- Sahu, M. K., Sivakumar, K., Thangaradjou, T., and Kannan L. 2007. Phosphate Solubilizing Actinomycetes in The Estuarine Environment: An Inventory. *J. Environ. Biol.* **28**:795-7.
- Sarker, S. D., Nahar, L., and Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre Plate-Based Antibacterial Assay Incorporating Resazurin as An Indicator of Cell Growth, and Its Application in The In Vitro Antibacterial Screening of Phytochemicals. *Methods* **42**: 321-324.
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., and Bhattacharyya, M. 2015. Antimicrobial Activities Of Actinomycetes Isolated From Unexplored Regions of Sundarbans Mangrove Ecosystem. *BMC Microbiol* **15**(170).
- Septianingsih, D. A., Darusman, L. K., Afendi, F. M., and Heryanto, R. 2018. Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) Fingerprint Combined with Chemometrics for Identification of Metabolite Content and Biological Activities of *Curcuma aeruginosa*. *Indones. J. Chem.* **18**(1): 43-52.
- 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. *J. Ferment.* **7**(4): 247.

- Shaun, J and Suma, S. 2017. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. *Mapana Journal of Science* **16**(4): 37-45.
- Sherman, R. E., Fahey, T. J., and Howarth, R. W. 1998. Soil-Plant Interactions in A Neotropical Mangrove Forest: Iron, Phosphorus and Sulfur Dynamics. *Oecologia* **115**(4): 553-563.
- Silverstein, M. K., Webster, F. X., Kiemle, D.J and Bryce, D. L. 2014. *Spectrometric Identification of Organic Coumpounds*. John Wiley and Sons. New York
- Silverstein, R. M., Bassler, G. C., Hartomo, A. J., Morril, T. C., and Purba, A. V. 1986. *Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik Edisi Ke-4*. Erlangga. Jakarta.
- Simatupang, D. S. 2008. *Berbagai Mikroorganisme Rhizosfer pada Tanaman Pepaya (Carica papaya L.) di Pusat Kajian Buah-buahan Tropika (PKBT) IPB Desa Ciomas, Kecamatan Pasirkuda, Kabupaten Bogor, Jawa Barat. (Skripsi)*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Singh, B. P., Rateb, M. E., Rodriguez-Couto, S., Polizeli, M. de L. T. de M., and Li, W.-J. (2019). Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges. *Front. Microbiol.* **10**: 914.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Gottumukkala, L.D., Rajasree, K., Soccol, C.R., Pandey, A., 2019. Solid-State Fermentation: Current Trends and Future Prospects, In: fourth edition, El-Mansi, E.M.T., Nielsen, J., Mousdale, D., Allman, T., Carlson, R., (Eds.). *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. CRC Press, Taylor and Francis. New York.
- Sivakumar K, Sahu MK, Thangaradjou T, Kannan L. 2007. Research on Marine Actinobacteria in India. *Ind. J. Microbiol.* **47**:186-196.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. F., and Crouch, S. R. 2014. *Fundamental of Analytical Chemistry 9th Edition*. Cengage Learning. Singapore

- So, A. D., Gupta, N., Brahmachari, S. K., Chopra, I., Munos, B., Nathan, O. C. K., Paccaud, J. P., Payne, D. J., Peeling, R. W., Spigelman, M., and Weigelt, J. 2011. Towards New Business Models for R&D for Novel Antibiotics. *Drug. Res. Updat* **14**: 88-94.
- Soebagio. 2002. *Kimia Analitik II*. JICA. Malang.
- Solomon and Graham. T, W. 1980. *Organic Chemistry, 2nd ed*. John Willey & Sons Inc. New York.
- Song, Z., Hou, Y., Yang, Q., Li, X., and Wu, S. 2021. Structures and Biological Activities of Diketopiperazines from Marine Organisms: A Review. *Mar. Drugs* **19**(8): 403.
- Spalding, M., M. Kainuma, and Collins, L. 2010. *World Atlas of Mangrove*. Earthscan. London, UK.
- Suhartati, T. 2017. *Dasar-Dasar Spektrofotometri Uv-Vis dan Spektrometri Massa Untuk Penentuan Struktur Senyawa Organik*. Aura. Bandar Lampung.
- Suraini, A. A., Sin, T. I., Alitheen, N., Shahab, N and Kamaruddin, K. 2008. Mikrobial Degadation Of Chitin Materials By *Trichoderma virensukmi*. *J. Biol. Sci.* **8**(1): 52-59.
- Thatoi, H. N and Biswal, A. K . 2008. Mangroves of Orissa Coast: Floral Diversity and Conservation Status. Special Habitats and Threatened Plants of India. *ENVIS Wild Life and Protected Area* **11** (1):201-207.
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., and Dutta, S. K. 2013. Biodiversity and Biotechnological Potential of Microorganisms from Mangrove Ecosystems: A Review. *Ann. Microbiol.* **63**:1-19.
- The Society for Actinomycetes Japan. 2002. Digitas Atlas of Actinomycete Ver. 2: *Streptomyces griseus* M-1027. Actino.jp. http://www.actino.jp/journal/Actinomycetologica_28-2_suppl.pdf. Diakses pada 25 Februari 2023.

- Thomas, L., Larroche, C., and Pandey, A. 2013. Current Developments in Solid-State Fermentation. *Biochem. Eng. J* **81**: 146-161.
- Venn, R. F. 2008. *Principles and Practice of Bioanalysis: Second Edition*. CRC Press. New York.
- Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. 2001. How Many Antibiotics are Produced by The Genus Streptomyces?. *Arch. Microbiol.* **176**:386-390.
- Widiyatni. 2010. *Isolasi, Penentuan Struktur Senyawa Serta Uji Aktivitas Biologi Dari Ekstrak Etanol Tanaman Musa paradisa* (Tesis). FMIPA Program Magister Ilmu Kimia Kekhususan Kimia Hayati. Depok.
- Willian, T and Davies, F.L. 1965. Use of Antibiotics for Selective Isolation and Enumeration of Actinomycetes in Soil. *J. Gen. Microbiol.* **38**: 251-261.
- Woodford, N., Turton, J. F., and Livermore, D. M. 2011. Multi Resistant Gram Negative Bacteria: The Role of High-Risk Clones in The Dissemination of Antibiotic Resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* **35**:736737.
- Xu, D. B., Ye, W.-W., Han, Y., Deng, Z.X., and Hong, K. 2014. Natural Products from Mangrove Actinomycetes. *Mar. Drugs.* **12**(5): 2590-2613.
- Yan, Y.; Li, X.; Zhang, C.; Lv, L.; Gao, B.; Li, M. 2021. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics* **10**(318).
- Yanti, A. H., Setyawati, T. R., and Kurniatuhadi, R. 2019. Composition and Characterization of Actinomycetes Isolated from Nipah Mangrove Sediment, Gastrointestinal and Fecal Pellets of Nipah Worm (*Namalycastis Rhodhocorde*). *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science* **550**: 1-11.