KARAKTERISASI DAN EVALUASI UJI SENYAWA BIOAKTIF ISOLAT AKTINOMISETES ASOSIASI BIOTA LAUT PERAIRAN INDONESIA SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

(SKRIPSI)

Oleh

Wahyu Indah Silvi Budyanti
NPM 1917011089

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023

ABSTRAK

KARAKTERISASI DAN EVALUASI UJI SENYAWA BIOAKTIF ISOLAT AKTINOMISETES ASOSIASI BIOTA LAUT PERAIRAN INDONESIA SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

Oleh

WAHYU INDAH SILVI BUDYANTI

Aktinomisetes yang tersebar luas di lingkungan laut dilaporkan mengandung senyawa bioaktif dan berperan sebagai antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif isolat unggul yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* patogen klinis. Sebanyak 6 isolat (isolat kode 18A13O1, 18D36A1, 18D36A2, 19A07A1, 19B19A1 dan 19C38A1) yang berasal dari perairan Gorontalo dan Bali dikultivasi dengan variasi media tumbuh yaitu media standar ISP-2 dan media selektif kulit udang diekstraksi menggunakan etil asetat. Skrining uji aktivitas antibakteri dengan metode *microdilution plate* terhadap bakteri dan dilakukan analisis menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Karakterisasi gugus fungsi dilakukan dengan menggunakan FT-IR. Setelah didapatkan isolat unggulan dilakukan kultivasi skala besar kemudian dilakukan pemurnian ekstrak dan memonitoring aktivitas antibakteri dengan uji KLT-Bioautografi. Hasil ekstraksi pada media selektif kulit udang memiliki potensi sebagai antibakteri. Hasil skrining isolat unggul aktinomisetes dengan kode 19B19A1 mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi 2 mg/mL. Hasil analisis FT-IR ekstrak EtOAc aktinomisetes 19B19A1 memiliki gugus C-N ulur yang terindikasi sebagai senyawa alkaloid. Hasil uji KLT-autobiografi, senyawa alkaloid diduga muncul pada rf 0.2 dengan kristal berbentuk *amorf* sebesar 0,006 g.

Kata Kunci : Aktinomisetes, ISP-2, kulit udang, antibakteri, alkaloid.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION AND EVALUATION CHECKING BIOACTIVE COMPOUND OF ACTINOMYCETES ASSOCIATION FROM INDONESIA MARINE AS AN ANTIBACTERIAL AGENT AGAINST *Staphylococcus aureus*

By

WAHYU INDAH SILVI BUDYANTI

Actinomycetes are widely distributed in the marine environment, contain bioactive compounds and are reported to act as antibacterial agents. This study aims to characterize superior bioactive isolates that can inhibit the growth of clinically pathogenic *Staphylococcus aureus*. A total of 6 isolates (18A13O1, 18D36A1, 18D36A2, 19A07A1, 19B19A1, and 19C38A1) from Gorontalo and Bali marine were cultured using different growth media: standard ISP-2 medium and selective shrimp shell medium extracted with ethyl acetate. Antibacterial activity was tested by microdilution plate against bacteria and analyzed by thin-layer chromatography (TLC). Functional group characterization was performed by FT-IR. After obtaining high-quality isolates, we performed large-scale cultures, then purified extracts, and monitored antimicrobial activity using a TLC bioautography assay. Extraction results from selective shrimp shell media have antibacterial properties. Screening results for a high-quality actinomycetes isolate code 19B19A1 were able to inhibit bacterial growth at a concentration of 2 mg/mL. FT-IR analysis of actinomycetes EtOAc extract 19B19A1 revealed a C-N stretching group, indicated as an alkaloid compound. TLC bioautography assay results indicated that the alkaloid compound appeared at Rf 0.2 in the form of *amorf* crystals weighing 0.006 g.

Keywords: *Actinomycetes*, ISP-2, shrimp shell, antibacterial, alkaloid.

KARAKTERISASI DAN EVALUASI UJI SENYAWA BIOAKTIF ISOLAT AKTINOMISETES ASOSIASI BIOTA LAUT PERAIRAN INDONESIA SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

Oleh

WAHYU INDAH SILVI BUDYANTI

Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS

Pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023

Judul Skripsi	: **KARAKTERISASI DAN EVALUASI UJI SENYAWA BIOAKTIF ISOLAT AKTINOMISETES ASOSIASI BIOTA LAUT PERAIRAN INDONESIA SEBAGAI AGEN ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus***
Nama Mahasiswa	: Wahyu Indah Silvi Budyanti
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1917011089
Program Studi	: S1-Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI,

Komisi Pembimbing

Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP. 19581021198703001

Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.
NIP. 195809221988111001

Ketua Jurusan Kimia

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua	: **Prof. John Hendri, Ph.D**	.....
Sekretaris	: **Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**	.....
Penguji Bukan Pembimbing	: **Dra. Aspita Laila, M.S.**	.....

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **4 Agustus 2023**

SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama Mahasiswa	: Wahyu Indah Silvi Budyanti
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1917011089
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul "**Karakterisasi dan Evaluasi Uji Senyawa Bioaktif Isolat Aktinomisetes Asosiasi Biota Laut Perairan Indonesia sebagai Agen Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus***" adalah benar karya saya, meliputi gagasan penelitian, perolehan data hasil penelitian, dan pengolahan data hasil penelitian.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran untuk selanjutnya dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 15 Agustus 2023

Yang menyatakan

Wahyu Indah Silvi Budyanti

NPM. 1917011089

RIWAYAT HIDUP

Penulis Bernama lengkap Wahyu Indah Silvi Budyanti dilahirkan di Bandar Lampung, 8 Mei 2002. Penulis merupakan anak tunggal dari pasangan Bapak Tri Utomo Budi Raharjo dan Ibu Asmeri Yanti. Saat ini penulis bertempat tinggal di Jalan R.A. Basyid Perumahan PU Fajar Baru, Blok R21/R22, Fajar Baru, Jati Agung, Lampung Selatan. Perjalanan pendidikan penulis dimulai dengan menempuh pendidikan taman kanak-kanak di TK Islam Bina Balita (2006-2008). Penulis kemudian melanjutkan pendidikan sekolah dasar di SDN 2 Perumnas Way Halim Bandar Lampung (2008-2011) namun ketika kenaikan kelas 4 penulis pindah dan menamatkan pendidikan dasar di SD S Global Surya (2011-2014). Kemudian penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah menengah pertama SMPN 2 Bandar Lampung (2014-2016) serta mengikuti program kelas akselerasi dan menyelesaikan pendidikan sekolah menengah pertama selama 2 tahun. Penulis melanjutkan pendidikan sekolah menengah atas di SMA S YP Unila (2016-2019). Selama masa pendidikan sekolah menengah atas, penulis aktif mengikuti kegiatan organisasi intra-sekolah, yaitu *Japanese Club of Smanila* (2016-2018) dan diberikan kepercayaan menjadi sekretaris umum pada periode 2017-2018. Setelah menyelesaikan pendidikan formal, penulis mendapatkan kesempatan untuk

melanjutkan pendidikan ke jenjang Sarjana pada tahun 2019 di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjalankan perkuliahan penulis turut mengikuti berbagai kegiatan baik akademik maupun non-akademik yang diselenggarakan pihak internal maupun eksternal kampus. Peenulis aktif sebagai kader muda Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) pada periode 2019.

Pada tahun 2021, penulis mengikuti salah satu program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) yaitu Pertukaran Mahasiswa Merdeka Dalam Negeri (PMM-DN) di Institut Teknologi Bandung (ITB) dan Universitas Gadjah Mada (UGM) yang diselenggarakan oleh Kementrian Pendidikan, Kebudayaan, Riset dan Teknologi (KEMENDIKBUD RISTEK).

Pada Maret – Juni 2022, penulis melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung dengan judul penelitian berupa “Karakterisasi Kitosan Dari Fungi Kode Isolat 19A15-RF Menggunakan Media Malt Ekstrak”. Penulis juga telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sidorejo, Kecamatan Sumberejo, Kabupaten Tanggamus pada Juni – Agustus 2022.

MOTTO

"Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"
~ QS. Al-Insyirah : 5-6 ~

"Jangan terlalu keras pada dirimu sendiri karena hasil akhir dari semua urusan di dunia ini sudah ditetapkan oleh Allah. Jika sesuatu ditakdirkan untuk menjauh darimu, maka ia tak akan pernah mendatangimu. Namun, jika ia ditakdirkan bersamamu, maka kau tak akan bisa lari darinya.:
~ Umar bin Khattab ~

"Do it, I walk without hesitation, I run without hesitation, without hesitation I fly, I must go on, Don't give up, never give up"
~ BooSeokSoon ~

"Hidup hanya sekali, jadi nikmati setiap momen dengan senyum dan kebahagiaan"
~ Lee Haechan ~

PERSEMBAHAN

Bismillahiromanirohim.

Alhamdulillaahirobbil'alamiin

Allahuma sholli ala sayyidina Muhammad, wa'ala ali sayyidina Muhammad.

Dengan mengucapkan rasa syukur yang tak terhingga atas karunia dan rahmat Allah Yang Maha Kuasa, dengan rasa bangga kupersembahkan skripsiku yang telahku kerjakan dengan penuh usaha ini kepada:

Kedua orang tuaku,
Bapak Tri Utomo Budi Raharjo dan Ibu Asmeri yanti,
dengan penuh kasih sayang telah memberikan banyak hal dan selalu mendukung dengan segala hal yang telah dilakukan penulis sehingga skripsi ini dapat diselesaikan.

Dosen-dosen yang telah banyak membimbingku,
Bapak Prof. John Hendri, Ph.D, Bapak Prof. Andi Setiawan Ph.D, dan Ibu Dra. Aspita Laila, M.S,
telah banyak membantu, memberikan masukkan yang membangun, serta memberikan arahan selama proses penelitian hingga penyelesaian penulisan skripsi ini.

Diri Sendiri,
Wahyu Indah Silvi Budyanti,
Seorang anak yang tidak berhenti berjuang untuk terus bertahan dan menjalankan setiap langkah kehidupannya salah satunya adalah proses meraih pendidikan demi membahagiakan dirinya dan kedua orang tuanya.

SANWACANA

Puji syukur kehadirat Allah SWT yang selalu melimpahkan rahmat, nikmat dan karunia-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul "**Karakterisasi dan Evaluasi Uji Senyawa Bioaktif Isolat Aktinomisetes Asosiasi Biota Laut Perairan Indonesia sebagai Agen Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus***" sebagai salah satu syarat dalam meraih gelar Sarjana Sains pada program studi S1-Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua dapat Penulis lalui berkat pertolongan Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari orang-orang terdekat Penulis. Pada kesempatan ini Penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua Penulis, Bapak Tri Utomo Budi Raharjo dan Ibu Asmeri Yanti yang selalu memeberikan cinta, kasih serta sayang yang tidak akan terbalaskan, memberikan dukungan serta jutaan doa, dan terus menerus memotivasi Penulis agar selalu semangat dan tidak menyerah dalam menjalankan penelitian. Semoga Allah selalu memberikan keberkahan dan semoga bisa tetap untuk menemani Penulis. *Aamiin yarabbal'alamin.*
2. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. selaku pembimbing 1 sekaligus pembimbing akademik yang telah membimbing, memberikan banyak ilmu, kritik, saran yang membangun, dan waktu untuk membimbing Penulis selama penulis melaksanakan penelitian skripsi ini serta turut memberikan motivasi dan arahan selama masa studi Penulis di Jurusan Kimia.

3. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. selaku pembimbing 2 yang selalu memberikan banyak ilmu, saran, motivasi, serta waktu untuk membimbing Penulis sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. Ibu Dra. Aspita Laila, M.S. selaku dosen pembahas yang telah menyempatkan waktunya untuk memberikan saran yang membangun serta perbaikan dalam menulis skripsi ini.
5. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
6. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.
7. Seluruh dosen dan staf Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung yang telah memberikan banyak ilmu dan membantu Penulis selama menjalani perkuliahan.
8. Teman-teman mahasiswa dibawah bimbingan Bapak Prof. John Hendri, Ph.D. Angkatan 2019, Wahidatun Nur Khasanah, Adhella Pragustiyanti Mintarjo dan Farich Andre Anas, yang telah menjadi tempat bercerita mengenai penelitian dan *partner* berjuang bersama menyelesaikan skripsi. *See you on the top.*
9. Senior yang bekerja dan melakukan penelitian di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT), Kak Fendi, Mbak Rosyi, Kak Ridho, Mbak Caca, Mbak Nafila, Kak Purna, dan Mbak Widyastuti, yang telah banyak memberikan arahan serta bantuan kepada Penulis selama melaksanakan penelitian. Semoga selalu dipermudah segala urusannya.
10. Rekan-rekan penelitian Penulis di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT), Sinur, Opi, Leha, Ify, Reza. Fatur, Kipang, Cici, Ibnu, dan Dira. Semoga selalu dipermudah segala urusannya.

11. Sahabat-sahabat Penulis, Atikah Putri Amelia dan Meisya Kirasyahni Aulia, yang selalu mendengarkan keluhan Penulis, menghibur Penulis, menemani Penulis ketika dalam keadaan kurang baik dan terus menyemangati Penulis. Doa baik selalu Penulis kirimkan dan semoga bisa terus membersamai Penulis. *Aamiin yarabbal'alamin*.
12. Sahabat-sahabat kuliah Penulis, Dewi Restika Ayu Safitri, Rahel Azzahra, Sinur Angelina, dan Ariel Dameria, yang telah menjadi teman berdiskusi banyak hal.
13. Teman-teman *Cyber,* Ica, Kak Devin, Revan, Kak Gio, Yaya, Zara, Kevin, Teteh Novi, Acca, Valerian, Livia, Zulfi, Zahra, Ichell dan Ayya yang memberikan banyak masukkan, semangat, mendengarkan pendapat Penulis dan menghibur Penulis. Semoga selalu dipermudah segala urusannya.
14. Keluarga besar Jurusan Kimia Angkatan 2019 yang banyak membantu Penulis selama masa perkuliahan.
15. Artis Favorit Penulis, NCT Dream, TREASURE, dan SEVENTEEN yang selalu menghibur melalui konten dan karya yang diciptakan serta memotivasi melalui usaha kerasnya menjadi artis.
16. Seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan skripsi ini dan tidak bisa tersebutkan satu persatu. Terimakasih atas seluruh doa, dukungan serta bantuannya.

Bandar Lampung, Agustus 2023
Penulis

Wahyu Indah Silvi Budyanti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL xviii

DAFTAR GAMBAR xix

I. PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Tujuan Penelitian 3
1.3 Manfaat Penelitian 4

II. TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Perairan Indonesia 5
2.2 Perairan Bali 6
2.3 Perairan Gorontalo 7
2.4 Krustasea 8
2.5 *Sponge* 9
2.6 Kitin 10
2.7 Aktinomisetes 11
2.8 Aktinomisetes Sebagai Penghasil Senyawa Bioaktif 12
2.9 *Submerged Fermentation* (SmF) 14
2.10 *Solid State Fermentation* (SSF) 14
2.11 *Fourier Transform Infrared* (FTIR) 15
2.12 *Staphylococcus aureus* 17
2.13 Antibakteri 18
2.14 Kromatografi 19
2.15 KLT-Bioautografi 20
2.16 *High Throughput Screening Assay* (HTS *Assay*) 21

III. METODE PENELITIAN 22
3.1 Waktu dan Tempat 22
3.2 Alat dan Bahan 22
3.3 Prosedur Penelitian 23
3.3.1 Biomaterial 23
3.3.2 Kultivasi dan Ekstraksi Aktinomisetes Pada Media Pertumbuhan 24
3.3.2.1 *Submerged Fermentation* (SmF) 24
3.3.2.2 *Solid State Fermentation* (SSF) 25
3.3.3 Skrining Aktivitas Antibakteri 25
3.3.4 Identifikasi Morfologi Isolat Unggul 26
3.3.5 Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isolat Unggul Menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR) 26
3.3.6 Kultivasi (*Scale up*) pada Isolat Unggul 27
3.3.7 Pemurnian Senyawa Bioaktif 27
3.3.8 Uji KLT-Bioautografi Metode Difusi Agar 28

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 29
4.1 Biomaterial 29
4.2 Kultivasi dan Ekstraksi Aktinomisetes Pada Media Pertumbuhan 30
4.3 Skrining Aktivitas Antibakteri 31
4.4 Identifikasi Morfologi Isolat Unggul 34
4.5 Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isolat Unggul Menggunakan FTIR 35
4.6 Kultivasi (*Scale Up*) pada Isolat Unggul 37
4.7 Pemurnian Senyawa Bioaktif 38
4.8 Uji KLT-Bioautografi Metode Difusi Agar 41

V. SIMPULAN DAN SARAN 43
5.1 Simpulan 43
5.2 Saran 43

DAFTAR PUSTAKA 45

LAMPIRAN 50
Lampiran 1. Diagram Alir Penelitian 51
Lampiran 2. Hasil Kultivasi dan Ekstraksi 52
Lampiran 3. Ekstrak Kasar Isolat Aktinomisetes 55
Lampiran 4. Nilai % Inhibisi dan Uji Aktivitas Antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* 57
Lampiran 5. Rumus-Rumus Perhitungan 59

DAFTAR TABEL

Tabel……Halaman

1. Tabel Serapan FTIR 16
2. Tabel Serapan FTIR Senyawa Alkaloid..... 36
3. Ekstrak Kasar Isolat Aktinomisetes. 55
4. Data Hasil Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *S.aureus.* 57

DAFTAR GAMBAR

Gambar……Halaman

1. Peta Kawasan Konservasi Perairan Indonesia 5
2. Peta Kabupaten Buleleng, Bali 7
3. Peta teluk Tomini, Gorontalo 8
4. Struktur organ *sponge*. 9
5. Struktur Kitin. 10
6. Bentuk Rantai Spora dan Spora Aktinomisetes 12
7. Skematis dari langkah-langkah dalam proses SSF 15
8. Morfologi *Staphylococcus aureus* 18
9. Peremajaan Isolat Aktinomisetes (a) 18A13O1; (b) 18D36A1; (c) 18D36A2; (d) 19A07A1; (e) 19B19A1; dan (f) 19C38A1 29
10. Kultivasi (a) Pada Media ISP-2; dan (b) Media Kulit Udang 31
11. Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *S. aureus* 32
12. Hasil Uji KLT Ekstrak Isolat 19B19A1 menggunakan plat KLT (a). Pada Sinar UV 254 nm; (b). reagen serium sulfat; dan (c). reagen Dragendorff 33
13. Morfologi Isolat 19B19A1 secara makroskopi dan mikroskopi (a) Media 1% Koloid Kitin Agar (b) Mikroskop Axio Imager with ApoTome 2 Zeiss Z2 perbesaran 400 x; dan (c) Scanning Electron Microscopy (SEM) perbesaran 3500 x…. 34
14. Spektrum FTIR ekstrak kasar isolat unggul 35
15. Hasil Kultivasi Skala Besar Isolat unggul 19B19A1 (a) Pada 10 Wadah Gelap Steril; dan (b) Ekstrak Kasar yang Dihasilkan 37
16. Pemisahan Senyawa Bioaktif yang Berasal dari Ekstrak Kasar Isolat Unggul Menggunakan Kolom Kromatografi 38
17. KLT 4 Fraksi Hasil Pemurnian Senyawa Bioaktif yang Berasal dari Ekstrak Kasar Isolat Unggulan kondisi eluen n-heksana : EtOAc (10:1;v/v). 39
18. KLT 6 Fraksi Hasil Pemurnian Senyawa Bioaktif yang Berasal dari Fraksi II kondisi eluen n-heksana : EtOAc (10:1;v/v). 39

19. KLT Fraksi 30-39 Hasil Pemurnian Senyawa Bioaktif yang Berasal dari Fraksi III kondisi eluen n-heksana : EtOAc (10:1;v/v). 40
20. Kristal Murni Senyawa Bioaktif yang dihasilkan dari Isolat Unggulan 40
21. Hasil Uji Bioautografi 4 Fraksi Waktu Inkubasi 18 Jam 41
22. Hasil Uji Bioautografi 6 Fraksi Waktu Inkubasi 18 Jam 42
23. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Berdasarkan Nilai $OD_{635\ nm}$ 58

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antibakteri pada bakteri patogen merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang penting. Saat ini banyak obat yang resisten pada bakteri patogen seperti pada *Staphylococcus aureus* sehingga menimbulkan ancaman serius. Resisten methicillin pada bakteri patogen *Staphylococcus aureus* telah menjadi sumber utama infeksi *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terkait komunitas dan nosocomial. Untuk mengobati patogen ini, obat antibakteri seperti linezolid, synercid, dan daptomycin telah banyak digunakan; Namun, laporan menunjukkan bahwa strain bakteri juga telah mengembangkan resistensi terhadap obat ini (Al-Ansari *et al*., 2020).

Beberapa penelitian biodiversitas, salah satunya adalah Kalyani *et al*. (2012) mengisolasi lebih dari 20 spesies aktinomisetes dari sampel tanah dan di antara 20 aktinomisetes, tiga menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Valli *et al*. (2012) juga melakukan isolasi berbagai aktinomisetes dari lingkungan ekstrim dan aktinomisetes yang disaring menunjukkan aktivitas antibakteri (Al-Ansari *et al.*, 2020).

Selain itu terdapat studi bahwa, sejumlah besar antibiotik turunan aktinomisetes diisolasi dari mikroorganisme. Poin penting lainnya mengacu pada kondisi unik yang ada di lingkungan laut dalam. Kurun waktu ini, peneliti banyak mengeksplor sumber baru yaitu lautan untuk memperoleh senyawa bahan obat. Informasi terbaru dengan kuat menunjukkan bahwa aktinomisetes tersebar luas di lingkungan laut seperti spons, ikan, moluska, bakau, rumput laut, selain air laut

dan sedimen. Organisme ini menjadi penting tidak hanya karena persepsi taksonomi dan ekologinya, tetapi juga untuk penemuan senyawa bioaktif unik seperti antibiotik, antioksidan, sitotoksik, agen antitumor, agen imunosupresif, kardiovaskular, dan lainnya (Hassan and Abdul, 2017). Hal ini diduga bahwa aktinomisetes yang berasal dari laut memiliki karakteristik khusus dengan elemen struktur unik yang sebelumnya tidak ditemukan di aktinomisetes yang berasal dari daratan, karena variasi ekstrim dalam tekanan ekologi, termasuk persaingan untuk ruang, predasi, nutrisi yang tersedia, cahaya, konsentrasi oksigen, dan tekanan (Simeis and Stefano, 2021). Hal ini didukung oleh studi Cwala *et al*. (2011) yaitu mengisolasi empat aktinomisetes baru dari lingkungan akuatik untuk aktivitas antibakteri.

Untuk memproduksi senyawa bioaktif, aktinomisetes memerlukan kultivasi fermentasi yang cocok seperti pemanfaatan media yang spesifik. Dalam aktinomisetes, kitinase penting sebagai sumber nutrisi dan parasitisme. Fermentasi yang dapat dilakukan adalah *Submerged Fermentation* (SmF) dan *Solid State Fermentation* (SSF). SSF telah diterapkan untuk produksi metabolit sekunder, seperti antibiotik. Meskipun metode SSF bukanlah hal baru, teknologinya sederhana dan tepat, karena sumber daya yang tersedia secara lokal seperti limbah cangkang udang (Setiawan *et al*. 2021).

Biotransformasi limbah cangkang udang oleh mikroorganisme merupakan salah satu alternatif yang layak untuk dikembangkan lebih lanjut untuk mengelola limbah kulit udang. Pemanfaatan aktinomisetes dari laut sebagai pengurai limbah cangkang udang menjadi produk oligomer masih sangat terbatas. Widyastuti *et al*. (2022) melakukan teknik fermentasi solid state untuk produksi senyawa bioaktif dengan memanfaatkan aktinomisetes dari laut sebagai pengurai limbah cangkang udang menjadi produk oligomer. Limbah dari cangkang kulit udang dapat digunakan secara optimum serta mampu mengurangi pencemaran lingkungan. Selain itu, (Setiawan *et al*., 2021) melakukan fermentasi solid state dari spons laut yang berasosiasi dengan *P. carboxydivorans* kode isolat 18A13O1 pada media selektif cangkang udang, didapatkan laporan bahwa aktinomisetes yang berasal dari *sponge* dapat tumbuh dengan baik pada media selektif limbah cangkang

udang dalam proses fermentasi untuk menghasilkan senyawa bioaktif berupa antibakteri. Senyawa antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri dapat diuji aktivitasnya dengan salah satu uji yaitu uji kromatografi lapis tipis bioautografi.

Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian dilakukan adalah karakterisasi senyawa bioaktif dari isolat aktinomisetes yang berasal dari perairan Indonesia sebagai agen antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Isolat diperoleh dari deposit UPT-LTSIT Universitas Lampung dari dua perairan yaitu perairan Bali dan Gorontalo. Kultivasi dilakukan dengan metode *Submerged Fermentation* (SmF) pada media standar *International Streptomyces Project 2 medium* (ISP-2) dan *Solid State Fermentation* (SSF) pada media selektif kulit udang. Untuk mendapatkan senyawa bioaktif dilakukan dengan teknik ekstraksi dengan pelarut organik, lalu dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Hasil uji aktivitas senyawa bioaktif aktinomisetes dilakukan dengan teknik *High Throughput Screening Assay*, kemudian dilakukan pemurnian senyawa bioaktif dengan teknik kromatografi hingga mendapatkan fraksinasi organik murni. Fraksi tersebut diuji kembali dengan uji bioautografi yang digabungkan dengan kromatogram lapis tipis untuk memastikan kembali aktivitas senyawa bioaktif tersebut serta dilakukan karakterisasi ekstrak isolat dengan menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengkultivasi aktinomisetes pada media ISP-2 dan kulit udang.
2. Skrining isolat aktinomisetes yang berasal dari perairan Bali dan Gorontalo.
3. Menentukan kemampuan daya hambat (inhibisi) hasil ekstraksi senyawa bioaktif tersebut sebagai-antibakteri.
4. Mengkarakterisasi senyawa bioaktif dari isolat aktinomisetes unggul sebagai antibakteri.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah dapat memberikan informasi terkait senyawa bioaktif dari isolat aktinomisetes unggul yang memiliki kemampuan daya hambat (inhibisi) pada bakteri patogen.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Perairan Indonesia

Sebagai negara kepulauan terbesar di dunia, wilayah daratan Indonesia seluas 1,9 juta km^2 tersebar di sejumlah 17500 buah pulau yang disatukan oleh lautan sekitar 5,8 juta km^2. Panjang garis pantai yang mengelilingi daratan tersebut adalah sekitar 81.000 km, yang merupakan garis pantai terpanjang di daerah tropis (Puspitaningsih, 2012). Perairan dengan luas perairan 5,8 juta km^2 yang terdiri atas laut teritorial seluas 0,3 juta km, perairan Zona Ekonomi Ekskulsif (ZEE) dengan luas 2,7 juta km^2.

Gambar 1. Peta Kawasan Konservasi Perairan Indonesia (Direktorat Jenderal Pengelolaan Ruang Laut, 2020).

Perairan laut Indonesia secara garis besar dibagi dua, yaitu perairan dangkal dan perairan laut dalam. Pada perairan dangkal hingga kedalaman 40 m terdapat salah satu ekosistem yang sangat penting dalam kehidupan laut, baik perairan dangkal maupun laut dalam. Ekosistem terumbu karang merupakan perairan paling produktif di perairan laut tropis. Luas ekosistem terumbu karang di perairan Indonesia diperkirakan mencapai sekitar 85.707 km^2, yang berarti menyimpan kekayaan alam yang sangat besar.

2.2 Perairan Bali

Provinsi Bali secara geografis terletak di posisi samping 80 03' 40' - 80 50' 48'' LS dan 1440 24' 45'' - 1150 53' 16'' BT dan didefinisikan sebagai provinsi menurut undang-undang No. 64 dari tahun 1958. Wilayah provinsi Bali memiliki luas sekitar 5.632,86 km^2 termasuk pulau-pulau kecil yang dikelilingi oleh garis pantai sepanjang 570 km. Provinsi Bali memiliki sumber daya laut dan pesisir yang sangat potensial untuk dikelola dengan baik, Potensi yang bisa didapatkan dari pesisir dan laut terdiri dari adanya bahan aktif alami mangrove, ekosistem lamun dan ekosistem terumbu karang; perikanan, budidaya dan pariwisata (Lazuardi *et al*., 2016).

Kabupaten Buleleng meliputi wilayah seluas 136.588 hektar atau 24,25 dari luas provinsi Bali. Selain itu, Kabupaten Buleleng merupakan salah satu pemerintahan di Bali dengan panjang garis pantai terpanjang di antara instansi lainnya dengan panjang garis pantai 157,05 km (Pemerintahan Kabupaten Buleleng, 2021).

Gambar 2. Peta kabupaten Buleleng, Bali.

2.3 Perairan Gorontalo

Khusus untuk Provinsi Gorontalo, luas perairan Teluk Tomini kurang lebih 43.100 km^2, dengan garis pantai sepanjang 438,1 km di sepanjang Teluk Tomini. Teluk ini mempunyai peran penting bagi dunia karena letaknya yang persis berada di jantung segitiga karang dunia (*heart of the coral triangle*) (Bano & Khakhim, 2016) dan merupakan teluk terbesar di garis khatulistiwa dengan luas ±59.500 km^2 atau ± 6 juta hektar. Dengan potensi sumber daya alam yang sangat tinggi, Teluk Tomini merupakan salah satu kawasan utama yang perlu dikembangkan dan dikelola, dimana perairan alami memiliki sistem yang sangat subur untuk dijadikan habitat, baik untuk berbagai populasi biota laut seperti lamun, mangrove dan terumbu karang. Populasi spons juga dapat dimanfaatkan manusia untuk tujuan pengobatan seperti antibakteri, antijamur, antioksidan, dan sebagai habitat bakteri untuk melindungi diri dari predator. Selain itu banyak populasi bunga karang juga terdapat di Teluk Tomini (Megawati *et al*., 2019).

Gambar 3. Peta teluk Tomini, Gorontalo.

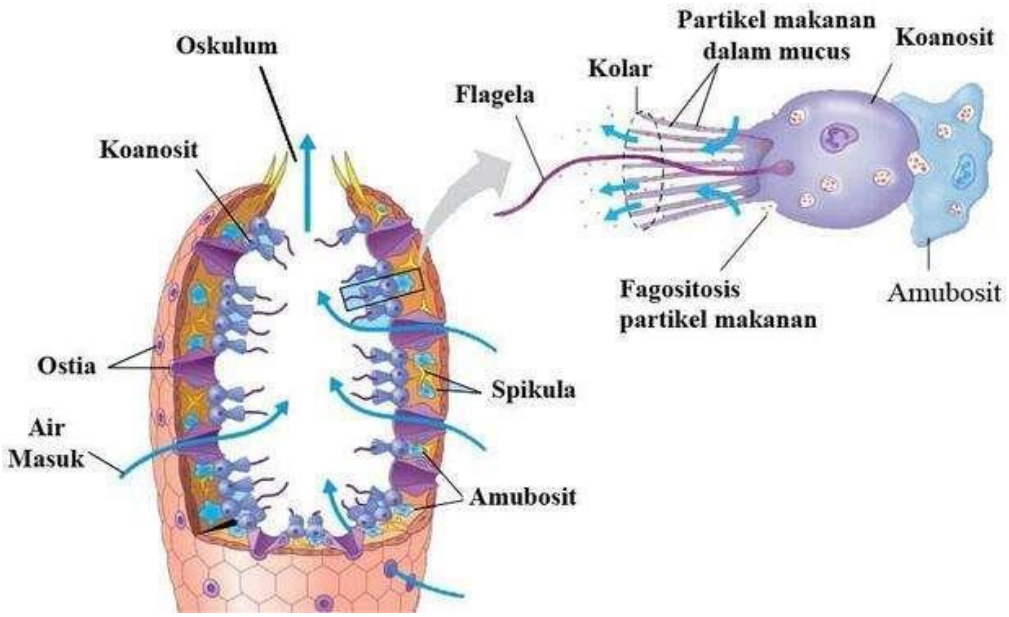
2.4 Krustasea

Krustasea merupakan kelompok biota laut yang banyak dijumpai di perairan dan memiliki nilai ekonomis, serta peran yang cukup penting di ekosistem terumbu karang dengan kontribusi sekitar 20% dari semua spesies invertebrata (Stella *et al*., 2011). Krustasea hampir secara eksklusif diwakili oleh ordo Decapoda, karena ordo tersebut merupakan kelompok yang sering diamati, karena ukurannya yang relatif besar dan memiliki warna-warna yang cerah (Kramer *et al*., 2014).

Krustasea merupakan fauna yang habitat dan penyebarannya terdapat di air tawar, payau dan laut, maka jenis-jenisnya sangat beragam dan dapat hidup di berbagai kolom di setiap perairan. Contohnya adalah sebagian krustasea yang dijumpai hidup di perairan laut terutama di dalam ekosistem terumbu karang. Beberapa jenis krustasea yang umum hidup dalam ekosistem tersebut, antara lain adalah dari kelompok Kepiting batu (Xanthidae, Tetraliidae, Trapeziidae), Lobster (Udang karang), Udang pistol (Alpheidae), dan Kelomang (Hermit crab) (Pratiwi, 2017).

2.5 *Sponge*

Bentuk kehidupan laut sangat bervariasi, termasuk *sponge*, karang, ascidian, gorgonia, pena laut, alga, jamur dan mikroorganisme terkait laut yang dianggap sebagai sumber penting untuk penemuan metabolit sekunder yang beragam secara struktural dan bioaktif (Abdelaleem *et al*., 2020). *Sponge* merupakan organisme laut invertebrata yang berasal dari filum *porifera* yang dicirikan memiliki banyak pori-pori di sepanjang tubuhnya. *Sponge* termasuk hewan berpori dengan sifat filter *feeder*, merupakan habitat mikroorganisme untuk bersarang dengan peran sebagai sumber makanan dan hidup bersimbion baik secara inter maupun intraseluler. Banyaknya *sponge* yang hidup pada terumbu karang menyebabkan morfologi spons bersimbion dengan mikroorganisme seperti bakteri (Marzuki *et al*., 2015).



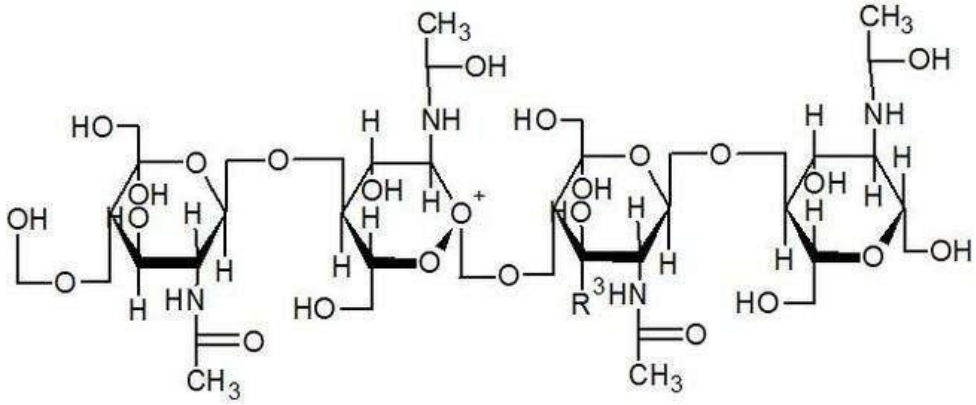
Gambar 4. Struktur organ *sponge* (Reece *et al.*, 2014).

Porifera salah satu takson paling beragam yang memiliki lebih dari 9000 spesies yang masih ada dari invertebrata *sessile*. Filum Porifera terdiri dari kelas *Demospongiae, Calcarea, Homoscleromorpha*, dan *Hexactinellida*. Sponge membentuk kelompok monofiletik dengan dua *clade*: *Demospongiae* +

Hexactinellida dan *Calcarea* + *Homoscleromorpha*. Spons adalah hewan air, kebanyakan laut, hewan multisel yang menetap, dengan penyaringan makan dan respirasi. Bentuk tubuh spons sangat beragam; berbentuk seperti film, *encrusting*, kental atau bulat, tabung, bercabang, *flabellate*, dan lain sebagainya. Ukuran tubuh spons bervariasi dari 3-10 mm sampai 1,5-2 m. Sponge memiliki sistem organ khusus; mereka tidak memiliki usus, otot, gonad, sistem saraf, atau sistem pernapasan yang berbeda; namun, spons memiliki sistem kanal dan ruang yang kompleks untuk pemompaan air sistem akuifer (Ereskovsky and Andrey, 2021).

2.6 Kitin

Kitin adalah biopolimer alami kedua yang paling banyak ditemukan setelah selulosa di bumi dan banyak ditemukan terutama di eksoskeleton dan struktur internal invertebrata. Kitin merupakan amino-polisakarida linier yang terdiri dari N-acetylglucosamine (2-acetamido-2-deoxy-β-D-glucopyranose) yang dihubungkan dengan β (1→4) ikatan glikosidik (Piorkowska, 2019). Struktur kitin digambarkan pada **Gambar 5.** Secara umum, kitin ditemukan pada invertebrata, seperti cangkang krustasea atau kutikula serangga, tetapi juga terdapat di sebagian besar jamur, beberapa selubung jamur, ganggang hijau, dinding sel, dan ragi, kitin diperkirakan diproduksi setiap tahun hampir sebanyak selulosa (Dutta *et al*., 2004)



Gambar 5. Struktur Kitin (Hendri dan Aspita, 2013).

Secara umum, cangkang krustasea terdiri dari 30-40% protein, 30-50% kalsium karbonat dan fosfat dan 20-30% kitin seperti yang dilaporkan oleh J. Kumirska *et al*. (2010) tetapi persentase ini bervariasi tergantung pada sumber, atau bahkan spesies, dari mana kitin diisolasi, misalnya, crangon crangon Limbah udang terdiri dari 10–38% protein, 31–44% mineral dan 24-46% kitin, menurut M. Bajaj *et al*. (2011). Polimer ini telah menjadi sangat menarik sebagai biomaterial fungsional baru yang berpotensi tinggi di berbagai bidang.

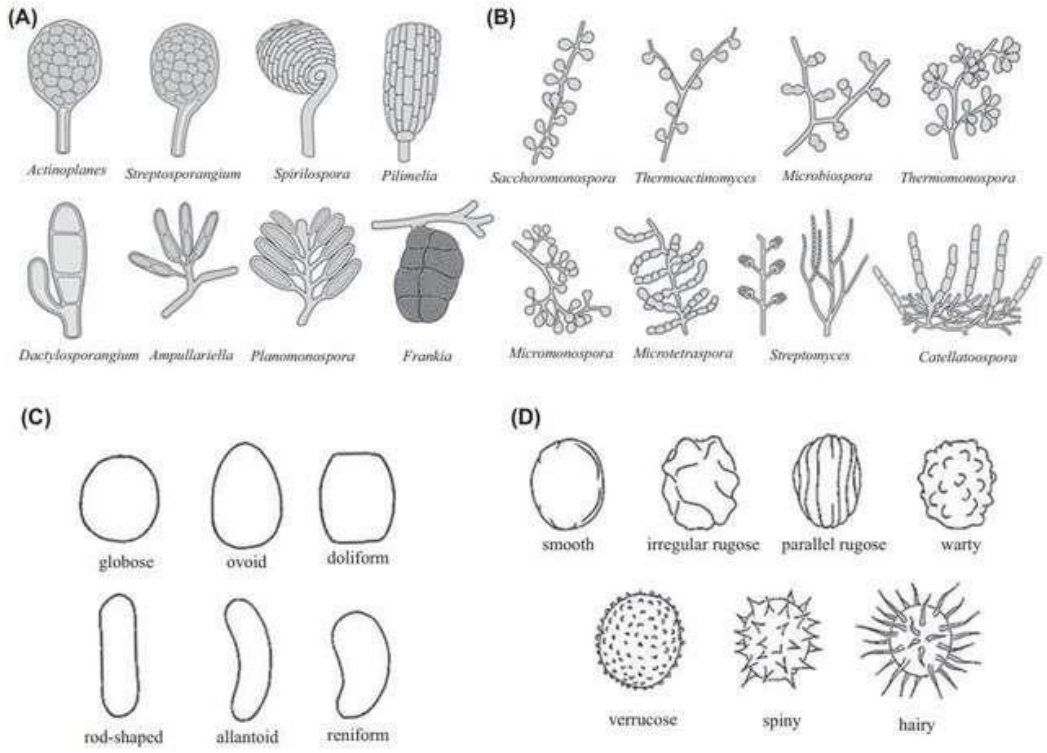
2.7 Aktinomisetes

Aktinomisetes adalah mikroorganisme yang termasuk dalam ordo Actinomycetales dan filum Actinobacteria. Aktinomisetes adalah salah satu unit taksonomi terbesar dalam domain bakteri. Filum ini juga beradaptasi dengan berbagai lingkungan, seperti tanah, air (bahkan asin), dan udara. Namun demikian, bagian utama dari organisme ini lebih disukai ditemukan di tanah alkalin dengan sejumlah besar bahan organik (De Simeis *et al*.,2021).

Aktinomisetes digambarkan dengan bentuk yang radial dan memiliki cabang-cabang mirip seperti jamur. Aktinomisetes dianggap sebagai bakteri namun memiliki kemampuan untuk membentuk hifa yang bercabang-cabang seperti jamur ketika tumbuh. Mikroorganisme ini tergolong intermediet dalam karakternya, yaitu antara karakter mirip bakteri dan mirip jamur. Aktinomisetes tergolong dalam prokariotik dengan sel-sel yang memanjang membentuk filamen. Mikroorganisme ini didominasi oleh sifat pertumbuhannya yang aerobik, heterotropik, saprofit dan tidak motil dan mampu bertahan ketika kondisi lingkungan mengancam atau tidak memungkinkan mikroorganisme lain untuk tumbuh (Kumar *et al*., 2003).

Koloni Aktinomisetes biasanya memiliki bentuk konsistensi yang seperti menempel pada substrat yang padat. Aktinomisetes memiliki ciri khas berdasarkan bentuk rantai spora dan spora sesuai pada **Gambar 6.** Beberapa Genus dalam Aktinomisetes ini memiliki permukaan yang seperti bubuk dan menjadi lebih berpigmen (memiliki pigmentasi) ketika spora bagian aerial (bagian

atas) terbentuk. Adapun kemampuan pigmentasi atau kemampuan untuk memproduksi variasi pigmen dari Aktinomisetes dapat dijadikan ciri karakteristiknya. Terdapat tiga tipe pigmen untuk karakteristik Aktinomisetes, antara lain: antosianin yang memberikan pigmentasi merah kebiruan, karotenoid yang memberikan pigmentasi merah-oranye-kuning, dan melanin yang memberikan pigmentasi hitam dan coklat (Kumar *et al*, 2003).



Gambar 6. Bentuk Rantai Spora dan Spora Aktinomisetes (Li et al, 2016).

2.8 Aktinomisetes Sebagai Penghasil Senyawa Bioaktif

Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang terkandung dalam tubuh hewan maupun tumbuhan. Senyawa ini memiliki berbagai manfaat bagi kehidupan manusia, diantaranya dapat dijadikan sebagai sumber antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, dan antikanker. Aktinomisetes adalah mikroorganisme dari

Kingdom *Eubacteria* (Kelas *Actinobacteria*) yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif sebagai sumber obat potensial (Solanki *et al*. 2008). Dalam studi alternatif penemuan antibiotik baru, aktinomisetes endofit yang muncul dari jaringan internal ganggang tanaman dan mensintesis jenis obat baru dari medis dan infeksi (Rajivgandhi *et al*., 2016). Antibiotik bervariasi dari aktinomisetes lain dengan memanfaatkan nutrisi, bagian gula, polimer karbohidrat, asam amino dan peptida dari tanaman dan alga dengan konsentrasi yang berbeda.

Alnumycin, munumbicins A to D (Antunes *et al*., 2014), *coronamycins* dan *antrakuinon, lupinacidins A to B* (Castillo *et al*., 2002) adalah beberapa senyawa alami yang dilaporkan berasal dari *endophytic* aktinomisetes laut. Senyawa-senyawa yang berasal dari *endophytic* aktinomisetes laut memiliki kemampuan penghambatan yang sangat baik dan berinteraksi dengan struktur sel termasuk dinding sel, *reactive oxygen species* (ROS) dan beberapa jalur metabolisme dan menyebabkan permeabilitas. Lebih lanjut, senyawa ini menunjukkan berbagai aplikasi biomedis termasuk sitotoksik, antimikroba, antimalaria, antikanker, imunosupresan, antiinflamasi, anthelmintik, herbisida, enzim dan lainnya (Rajivgandhi *et al*., 2018).

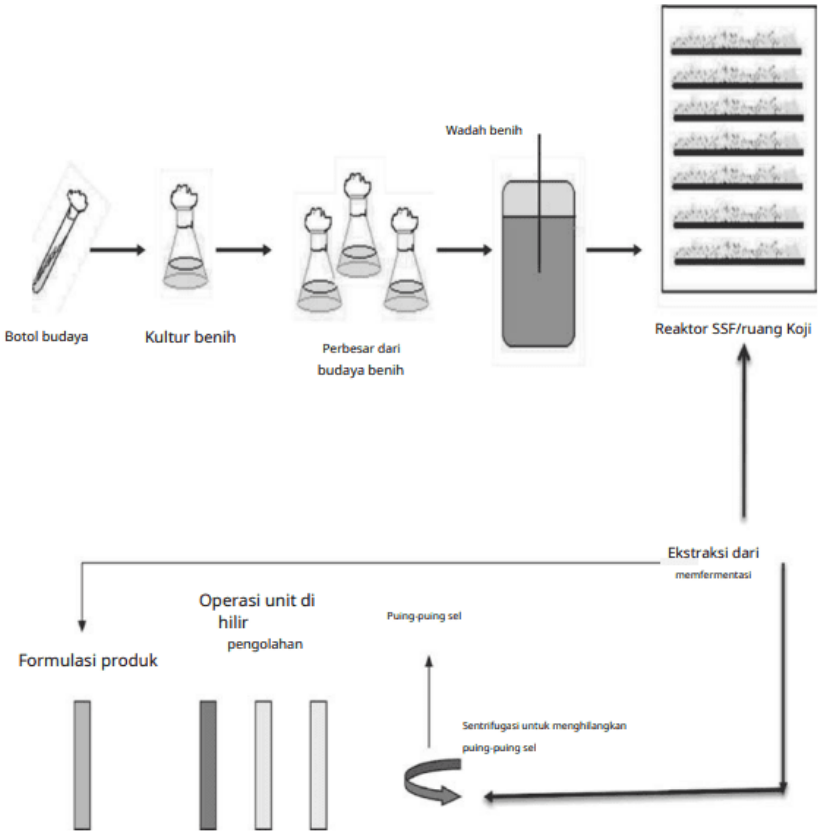
Selain itu, dari hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Chasanah *et al.* (2012) menyatakan bahwa salah satu aktinomisetes genus *Streptomyces sp* yang dikultivasi dengan variasi waktu dan media tertentu mampu menghasilkan ekstrak dengan bioaktivitas anti bakteri *V. parahaemolyticus* terbaik. Selain itu, senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak *Streptomyces sp*. menunjukkan bahwa senyawa aktif antibakteri dalam ekstrak tersebut termasuk dalam golongan alkaloid.

2.9 *Submerged Fermentation* (SmF)

Fermentasi terendam atau lebih dikenal dengan *Submerged Fermentation* (SmF) adalah proses yang melibatkan pembiakan actinobacteria dalam media nutrisi cair yang menghasilkan produksi produk seperti enzim, antibiotik, atau produk lainnya. Prosesnya melibatkan menumbuhkan spesifik mikroorganisme seperti bakteri, jamur, dan actinobacteria di dalam labu tertutup yang berisi media fermentasi (Balagurunathan *et al*., 2020). *International Streptomyces Project 2 medium* (ISP-2) adalah media standar yang biasanya digunakan untuk menumbuhkan *Streptomyces* bersama dengan berbagai strain terkait akar tanaman lainnya. Media ini mengandung ekstrak malt dan ekstrak ragi dan menggunakan glukosa sebagai sumber karbon. Komposisi yang tepat akan bervariasi tergantung organisme apa yang akan ditumbuhkan.

2.10 *Solid State Fermentation* (SSF)

Fermentasi solid-state (SSF) didefinisikan sebagai proses fermentasi, yang melibatkan matriks padat yang mengandung cukup air untuk mendukung aktivitas mikroba; tanpa menambahkan air. Matriks padat dapat menjadi sumber nutrisi atau hanya matriks pendukung yang diresapi dengan semua nutrisi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan mikroba (Singhania *et al*. 2009). SSF menyerupai habitat alami mikroorganisme dan telah terbukti menjadi alat yang berguna dalam produksi produk bernilai tambah. Proses SSF **Gambar 7** dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor, dan tergantung pada sifat substrat dan mikroorganisme yang digunakan, mereka dapat bervariasi dari proses ke proses. Faktor-faktor ini dapat secara luas dibagi menjadi faktor biologis, fisikokimia, dan lingkungan.



Gambar 7. Skematis dari langkah-langkah dalam proses SSF.

Proses SSF memiliki keunggulan seperti produktivitas fermentasi yang lebih tinggi; konsentrasi produk akhir yang lebih tinggi; stabilitas produk yang lebih tinggi; represi katabolik yang lebih rendah; budidaya mikroorganisme khusus untuk substrat yang tidak larut dalam air atau budidaya campuran berbagai jamur; dan yang tak kalah pentingnya, permintaan sterilitas yang lebih rendah karena aktivitas air yang rendah yang digunakan di SSF (Gottumukkala *et al*., 2011).

2.11 *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Fourier Transformed Infrared (FTIR) merupakan salah satu alat atau instrumen yang dapat digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi, mengidentifikasi senyawa dan menganalisis campuran dari sampel yang dianalisis tanpa merusak sampel. FTIR juga dapat digunakan untuk mendeteksi gugus fungsi. Spektroskopi FTIR

dapat menganalisis adanya campuran dalam sampel tanpa merusak sampel yang akan dianalisisnya. Radiasi inframerah terletak pada spektrum elektromagnetik antara daerah visibel dan daerah microwave (gelombang mikro). Penggunaannya paling banyak untuk kimia organik pada batas panjang gelombang antara 4000 cm^{-1} dan 400 cm^{-1}. Spektrum vibrasi tampak berupa pita. Ada dua tipe vibrasi molekuler yaitu *stretching* dan *bending*. Hanya vibrasi yang menghasilkan perubahan secara ritmik pada momen dipol yang diobservasi dalam IR (Silverstein, 2005).

Pada dasarnya spektrum IR yang diperoleh dari spektrometer FTIR terletak pada daerah IR tengah 2,5-15μm antara 4000 dan 666 cm^{-1}. Energi transisi yang sesuai dengan perubahan keadaan energi vibrasi untuk banyak gugus fungsi terletak di wilayah IR tengah (4000-400 cm^{-1}) dan oleh karena itu munculnya pita serapan di wilayah ini dapat digunakan untuk menentukan apakah ada gugus fungsi tertentu di dalam molekul. Biasanya, ada empat wilayah jenis ikatan yang dapat dianalisis dari spektrum FTIR diantaranya ikatan tunggal (O-H, C-H, dan N-H) dapat dideteksi pada bilangan gelombang yang lebih tinggi (2500-4000 cm^{-1}). Selain itu, ikatan rangkap tiga dan ikatan rangkap dapat dideteksi di daerah bilangan gelombang tengah 2000-2500 cm^{-1}dan 1500-2000 cm^{-1} (Mohamed *et al*., 2017).

Tabel 1. Tabel Serapan FTIR (Mohamed *et al.*, 2017)

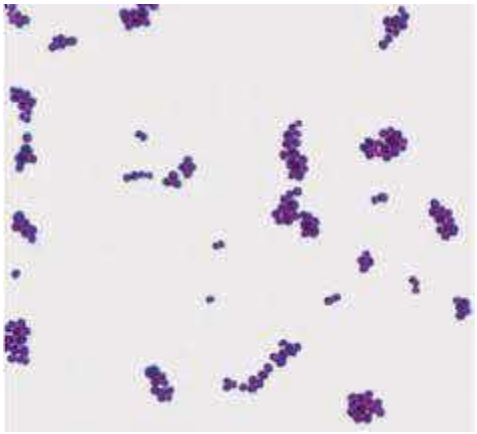
Gugus Fungsi	**Model Vibrasi**	**Intensitas**	**Bilangan Gelombang (cm^{-1})**
N-H	Ulur	Medium	3500-3100
C-H	Ulur	Lemah	3000-2850
N-H	Tekuk	Lemah-Medium	1640-1550
C-N	Ulur	Lemah-Medium	1350-1000
C=C (*aromatic*)	Ulur	Lemah-Medium	1600-1475
C-N	Tekuk	Lemah	650-1000

2.12 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri berbentuk kokus dan bersifat gram positif, tersebar luas di alam dan ada yang hidup sebagai flora normal pada manusia yang terdapat di aksila, daerah inguinal dan perineal, dan lubang hidung bagian anterior. Sekitar 25-30 % manusia membawa Staphylococcus aureus di dalam rongga hidung dan kulitnya (Soedarto, 2014).
Menurut Tortora, (2004) Staphylococcus aureus diklasifikasikan sebagai berikut:

Domain *: Bacteria*
Kingdom *: Eubacteria*
Phylum *: Firmicutes*
Class *: Bacilli*
Ordo *: Bacillales*
Family *: Staphylococcaceae*
Genus *: Staphylococcus*
Species *: Staphylococcus aureus*

Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus berukuran garis tengah sekitar 1 µm yang pada pewarnaan bersifat gram positif, jika dilihat dibawah mikroskop berbentuk seperti kelompok anggur digambarkan secara morfologi pada **Gambar 8**. *S. aureus* yang patogen bersifat invasif, menyebabkan hemolisis, membentuk koagulase, dan mampu memfermentasi manitol, Staphylococcus aureus tidak aktif bergerak (nonmotil), tidak membentuk spora, bersifat katalase positif, dan menghasilkan bahan metabolit yang dapat diklasifikasikan dalam tiga bentuk, yaitu metabolit non toksin, eksotoksin, dan enterotoksin (Soedarto, 2014).



Gambar 8. Morfologi *Staphylococcus aureus* (Jawetz, 2013).

2.13 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan. Mikroorganisme dapat menyebabkan bahaya karena kemampuan menginfeksi dan menimbulkan penyakit serta merusak bahan pangan. Antibakteri termasuk kedalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri hanya dapat digunakan jika mempunyai sifat toksik selektif, artinya dapat membunuh bakteri yang menyebabkan penyakit tetapi tidak beracun bagi penderitanya. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri 10 diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat keutuhan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein.

Aktivitas senyawa antibakteri dipengaruhi oleh pH, suhu stabilitas senyawa tersebut, jumlah bakteri yang ada, lamanya inkubasi, dan aktivitas metabolisme bakteri. Berdasarkan aktivitasnya zat antibakteri dibedakan menjadi dua jenis, yaitu bakteriostatik dan bakteriosida. Bakteriostatik adalah zat antibakteri yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri (menghambat perbanyakan populasi bakteri), namun tidak mematikan. Bakterisida adalah zat antibakteri yang memiliki aktivitas membunuh bakteri. Namun ada beberapa zat antibakteri yang

bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakterisida pada konsentrasi tinggi (Kusuma, 2017).

Senyawa biologis antibakteri diisolasi menggunakan berbagai organisme laut, termasuk bakteri, jamur, rumput laut, karang, teripang, spons, dan lainnya. Antibakteri tersebut termasuk dalam kelompok kimia: peptida, terpenoid, diasilgliserol, steroid, polisakarida , poliketida, alkaloid. Batzelladine M adalah alkaloid guanidine polisiklik yang diekstraksi dari spons Jamaika *Monanchora unguifera* dapat menghambat aktivitas bakteri *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*) dan *Mycobacterium intracellulare* dengan nilai dengan MIC masing-masing 5 dan 10 µg/mL. Lynamicins A-D yang diisolasi dari aktinomisetes laut, NPS12745, memiliki aktivitas inhibisi antibakteri dengan nilai MIC berkisar antara 1,8 dan 9,5 µg/mL (Thawabteh *et al.*, 2023).

2.14 Kromatografi

Kromatografi adalah suatu teknik pemisahan campuran berdasarkan perbedaan distribusi dari komponen-komponen dalam fasa gerak dan fasa diam. Fasa gerak dapat berupa gas atau cairan, sedangkan fasa diam dapat berupa cairan atau padatan. Teknik ini memiliki kemampuan untuk memisahkan suatu campuran senyawa menjadi komponen-komponen tertentu sehingga dapat dilakukan identifikasi berdasarkan komponen-komponen individualnya.

Pada kromatografi campuran dipisahkan berdasarkan perbedaan senyawa tertentu. Perbedaan yang dapat dimanfaatkan antara lain kelarutan dalam berbagai pelarut dan sifat polar. Kromatografi biasanya terdiri dari fase diam dan fase gerak. Fase gerak mengangkut komponen campuran melalui fase diam, dan fase diam mengikat komponen-komponen tersebut dengan berbagai afinitas (Bresnick, 2004).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah salah satu jenis pemisahan fisikokimia. Komponen-komponen KLT terdiri dari lapisan yang berperan untuk memisahkan campuran senyawa. Lapisan ini terdiri dari bagian fase diam yang biasanya ditempatkan pada plat gelas, logam, atau lapisan yang cocok. Ketika suatu senyawa ingin dipisahkan, senyawa tersebut dalam bentuk larutan lalu ditotolkan hingga berupa bercak atau pita. Setelah itu, plat atau lapisan ditaruh di dalam bejana (*Chamber*) lalu ditutup rapat. *Chamber* tersebut berisi larutan yang berperan sebagai fasa gerak. Maka, senyawa akan mengalami proses pemisahaan komponen.

2.15 KLT-Bioautografi

Metode KLT-bioautografi digunakan untuk mempelajari senyawa aktif dari tanaman dan memberikan informasi tentang aktivitas dan lokasi aktivitas antimikroba secara langsung pada penyerap KLT. Metode salah satu metode yang cukup efektif karena didasarkan pada penyaringan fitokimia dari ekstrak yang dapat mendeteksi molekul atau senyawa aktif secara biologis (Balouiri *et al*., 2016).

Salah satu jenis metode dari KLT-Bioautografi adalah menggunakan difusi agar. Dalam metode ini, media yang diinokulasi dengan mikroorganisme patogen digunakan sebagai pembawa, dan pelat lapisan tipis yang diserap dengan senyawa menghadap ke bawah dan bersentuhan dengan permukaan media. Senyawa ditempatkan dalam kontak dengan permukaan media selama waktu tertentu untuk mendifusikan senyawa yang berada pada pelat. Kemudian, dilakukan pengangkatan pelat lapisan tipis dan media dibiakkan semalaman pada suhu sekitar 37◦C untuk melakukan proses bioautografi (Wang *et al.,* 2021).

Dalam studi yang telah dilakukan Ljoljić Bilić *et al* (2022) bahwa uji bioautografi digabungkan dengan kromatografi lapis tipis pada fraksinasi ekstrak dapat mengidentifikasi senyawa turunan asam galat dan glikosida flavonol yang

diidentifikasi sebagai senyawa paling penting untuk diamati pada aktivitas antimikroba *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

2.16 *High Throughput Screening Assay* (HTS *Assay*)

High Throughput Screening Assay (HTS *Assay*) stabil pada tingkat molekuler dan seluler. Metode ini menggabungkan eksperimen otomatis dan mikro-kuantitatif dengan analisis data skala besar. Langkah-langkah otomatis termasuk pengambilan sampel, pengenceran sampel ke kisaran yang sesuai untuk deteksi, transfer sampel dan agen kromogenik, pencampuran sampel, pencucian sel, pengembangan reaksi kromogenik atau terkait enzim, deteksi warna atau fluoresensi, analisis data, dan pengumpulan strain yang ditingkatkan (Zeng *et al*., 2020).

Dibandingkan dengan metode *screening* tradisional, HTS memiliki keuntungan yang signifikan, termasuk: (i) operasi otomatis yang lebih efisien – peralatan canggih telah meningkatkan otomatisasi HTS, yang mencegah potensi kontaminasi dan kesalahan manusia; (ii) lebih sedikit sumber daya manusia yang dibutuhkan pembentukan sistem operasi otomatis dan mode budidaya dan analisis menggunakan pelat mikro dan FACS telah secara signifikan mengurangi biaya tenaga kerja; (iii) lebih sensitif dan akurat – metode pengujian baru telah menghasilkan penyaringan yang cepat dan akurat dengan mendeteksi perubahan yang terkait dengan kandungan metabolit target; dan (iv) volume sampel yang lebih rendah diperlukan kuantifikasi yang andal hanya memerlukan beberapa mikroliter (dalam pelat mikro) atau bahkan nanoliter (dalam tetesan), yang menyebabkan penurunan signifikan dalam biaya media kultur dan reagen (Zeng *et al*., 2020).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Oktober 2022 sampai Juni 2023 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Analisis *Light Microscopy*, *Scanning Electron Microscopy* (SEM), dan *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FTIR) dilakukan di UPT LTSIT Universitas Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas diantaranya gelas kimia, pipet tetes, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, botol kaca, *cutter*, *loop ose*, *cover* glass, oven, *cotton bud*, lampu spiritus, *hot plate*, spatula logam, karet gelang, spidol, *autoclave* Tomy SX-700, neraca analitik Wigen Houser, Rotary Evaporator Buchii/R210, Laminar air flow, Incubator Memmert-Germany/INC-02, Mikroskop Axio Imager *with* ApoTome 2 Zeiss Z2, corong pisah, Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan fase diam alumuni silica gel DC kielsel 60 F254, lampu UV Kohler/SN402006, serta kolom kromatografi, *Scanning Electron Microscopy* (SEM) Merk EVO MA10, *Fourier Transform Infrared* (FTIR) (Cary 630).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit udang, akuades, *malt extract*, glukosa, *yeast extract*, HCl pekat teknis, NaOH teknis, NaCl teknis, agar *swallow*, alkohol teknis, dimetil sulfoksida (DMSO),

chloramphenicol, Metanol (MeOH) *pro analysis*, etil asetat (EtOAc) *pro analysis*, *Tryptic Soy Broth* (TSB), koloid kitin, *Artificial Sea Water*, malt, glukosa, *yeast extract*, *Mueller Hinton Agar* (MHA), silika gel 60 Kromatografi Kolom Terbuka (0,063-0,00 mm, Merck KgaA, Darmstadt, Jerman), *n*-heksana teknis, reagen visualisasi KLT meliputi serium sulfat ($Ce(SO_4)_2$) (Ce(IV) dan H_2SO_4 dalam akuades), dan dragendorff (Larutan bismut nitrat dengan air dan asam asetat glasial; Larutan 2: larutan KI dengan asam asetat glasial) dengan asam asetat glasial).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Biomaterial

Sampel organisme laut diperoleh dari dua perairan yaitu perairan Teluk Tomini, Gorontalo (0˚25011.9”N123˚08031.8”E) dan perairan Buleleng Bali (8˚07′20.9″ LS 114˚34′03.8″ BT). Pada perairan Teluk Tomini, pengambilan spons dilakukan secara acak dengan teknik scuba diving pada kedalaman 5-30 meter pada bulan September 2019, oleh tim Peneliti Universitas Osaka dan Universitas Lampung (Setiawan *et al.*, 2022) sedangkan perairan Buleleng dilakukan pada tahun 2018 oleh penyelam SCUBA dan dilakukan pengambilan spons dan tunikata pada kedalaman laut 5−25 m. Saat ini sampel dari masing-masing perairan sudah menjadi deposit UPT LTSIT Universitas Lampung (Setiawan *et al.*, 2021). Sampel yang digunakan berupa isolat yang berasal dari perairan Buleleng, Bali yaitu dengan kode isolat 18A13O1, 18D36A1 dan18D36A2 serta isolat yang berasal dari perairan Teluk Tomini, Gorontalo dengan kode isolat 19A07A1, 19B19A1 dan 19C38A1. Keseluruhan sampel yang digunakan merupakan deposit UPT LTSIT Universitas Lampung. Mikroorganisme bakteri yang digunakan adalah bakteri *S. aureus* patogen klinis yang berasal dari Dinas Kesehatan kota Bandar Lampung, Bandar Lampung, Indonesia.

3.3.2 Kultivasi dan Ekstraksi Aktinomisetes Pada Media Pertumbuhan

Kultivasi dilakukan pada 2 jenis media yang meliputi media standar *International Streptomycetes Project* (ISP-2) dan media selektif kulit udang sebagai sumber nutrisi aktinomisetes penghasil senyawa bioaktif hingga mendapatkan ekstrak kasar.

3.3.2.1 *Submerged Fermentation* (SmF)

Fermentasi SmF dilakukan pada media *International Streptomycetes Project* (ISP-2). Pembuatan media (ISP-2) mengacu pada Fauziana *et al* (2012). Media ISP-2 terdiri dari 0,4% yeast extract, 1 % malt extract, 0,4% glukosa dilarutkan dalam 30 ppt *Artificial Sea Water* steril lalu disterilkan selama 15 menit, temperatur 121˚C dengan tekanan 1 atm.

Pada fermentasi secara SmF, ditumbuhkan isolat aktinomisetes pada 20 mL media ISP-2. Setelah itu, inokulum diinkubasi selama 7 hari. Kultur primer kemudian dituang dan diinokulasi ke dalam media ISP-2 di Erlenmeyer 2000 ml dengan volume inokulum primer (rasio 1:5;v/v). Kemudian diinkubasi selama 14 hari. Setelah selesai diinkubasi, ditambahkan EtOAc dalam jumlah yang sama (rasio 1:1; v/v) sebagai pelarut pada senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan, dimaserasi selama 24 jam dan disaring untuk memperoleh filtrat serta aktinomisetes. Filtrat yang diperoleh kemudian dipisahkan dengan partisi. Etil asetat dikumpulkan dan dipekatkan dengan penguapan putar pelarut (*rotary evaporator*).

3.3.2.2 *Solid State Fermentation* (SSF)

Fermentasi *solid-state* dilakukan dengan mengacu pada metode Setiawan *et al*. (2022). Pertama, isolat aktinomisetes diinokulasi pada 30 mL di wadah botol kaca menggunakan 1% koloid kitin cair dan diinkubasi selama 7 hari. Selanjutnya inokulum dituang ke dalam 150 g limbah cangkang udang steril dalam labu Erlenmeyer 2000 mL dan diinkubasi selama 14 hari. Cangkang udang yang terdegradasi diekstraksi menggunakan EtOAc dengan metode maserasi selama 24 jam. Setelah itu, EtOAc disaring kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada tekanan 98 mbar, temperatur 40 ^{o}C.

3.3.3 Skrining Aktivitas Antibakteri

Metode skrining *throughput* tinggi (*microdilution plate*) digunakan untuk menentukan aktivitas antibakteri menggunakan *96-well plate*. Nilai absorbansi kemudian diukur menggunakan pembaca pelat Hospitex pada Nilai densitas optik (OD) sebesar 630 nm. Bakteri *S. aureus* dikultur pada media 3% (w/v) *Tryptic Soy Broth* (TSB) Agar. Persiapan sampel enam isolat aktinomisetes dimasukkan ke dalam *microtube* dan diuapkan. Kemudian microtube ditimbang agar dapat dihitung pengenceran dengan penambahan DMSO 2%.

Setelah disiapkan sampel yang akan diuji, dilakukan uji skrining untuk mendapatkan sampel hasil isolat unggul dari 6 sampel isolat aktinomisetes yang diskrining menggunakan metode Widyastuti *et al*. (2022). Semua ekstrak dibuat untuk 2 mg/mL larutan stok yang sebelumnya sudah dicek kekeruhan sesuai dengan standar Mc. Farland (OD630nm= 0,08–0,1). *chloramphenicol* digunakan sebagai kontrol positif, dimana larutan 2% DMSO digunakan sebagai kontrol negatif, dan sumur tanpa bakteri digunakan sebagai kontrol kontaminasi. Setiap sumur berisi 145µL media TSB, 25µL suspensi bakteri, dan 50µL larutan ekstrak. *Plate* diinkubasi selama 18 jam pada temperatur kamar. % inhibisi diukur dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{GC-GT}{GC} \text{ x } 100\%$$

Catatan,

GC = kontrol pertumbuhan berupa nilai absorban blanko.

GT = perlakuan pertumbuhan berupa nilai absorban sampel.

Isolat unggul yang didapatkan dari hasil skrining kemudian dianalisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan pelat silika gel 60 F254 menggunakan eluen n-heksana : EtOAc (10:1:v/v) diamati dengan sinar uv 254 nm dan direaksikan dengan reagen serium sulfat dan reagen spesifik dragendorff untuk mengindikasikan jenis senyawa bioaktif yang dihasilkan.

3.3.4 Identifikasi Morfologi Isolat Unggul

Identifikasi morfologi spora dianalisis menggunakan mikroskop dengan metode *coverslip* 45° dan pengamatan lebih lanjut menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) yang mengacu pada Widysatuti *et al*. (2022). Pertama, *cover glass* steril ditanam pada sudut kemiringan 45^{o} dalam cawan petri dengan media 1% koloid kitin agar dan dikultur selama 7 hari. *Cover slip* diangkat menggunakan pinset dan ditempatkan pada slide kaca yang bersih. *Cover slip* diamati di bawah Mikroskop Axio Imager *with* ApoTome 2 Zeiss Z2 serta dilakukan pengamatan lanjutan menggunakan SEM miselium dan ornamen spora.

3.3.5 Karakterisasi Senyawa Bioaktif Isolat Unggul Menggunakan *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Karakterisasi senyawa bioaktif dilakukan dengan metode FTIR untuk melihat gugus fungsi. Gugus fungsi ditentukan dengan menggunakan panjang gelombang spektrum dengan resolusi 4 cm^{-1} dan waktu pemindaian adalah 64 detik, spektrum membutuhkan waktu sekitar 2 menit untuk menyelesaikan keseluruhan siklus pemindaian yang akan direkam. Jangkauan inframerah adalah dibagi menjadi tiga

distrik bilangan gelombang yang jauh-IR (400 cm^{-1}), IR tengah (400–4000 cm^{-1}), dan tutup IR (4000– 13000 cm^{-1}) (Nandiyanto *et al,* 2019).

3.3.6 Kultivasi (*Scale up*) pada Isolat Unggul

Kultivasi (*scale up*) dilakukan sepuluh kali lipat lebih banyak pada media terbaik berdasarkan hasil kultivasi pada dua media tumbuh ketika dilakukan skrining guna untuk memperbanyak hasil ekstrak kasar isolat unggul yang akan dilakukan pada metode selanjutnya.

3.3.7 Pemurnian Senyawa Bioaktif

Ekstrak yang berasal dari ekstrak kasar isolat unggul dimurnikan hingga mendapatkan senyawa bioaktif menggunakan metode kolom kromatografi. Mula-mula kolom kromatografi disiapkan dalam kondisi kering, dan kapas diletakkan pada kolom tersebut. Kemudian pelarut n-heksana diteteskan dengan pipet tetes ke dalam kolom melalui dinding kolom untuk memadatkan kapas. Kapas bertindak sebagai penyaring. Selanjutnya, disiapkan fase diam berupa silika gel 60 yang telah ditambahkan pelarut organik. Silika gel 60 kemudian ditambahkan ke dalam kolom dan dipadatkan. Ketika ketinggian fase diam kolom telah stabil dan padat, ekstrak kasar dari isolat unggul yang dilarutkan dalam pelarut organik dialirkan melalui bagian atas kolom menggunakan pipet tetes. Eluen ditambahkan dengan perbandingan yang berbeda (v/v) untuk membentuk gradien. Ketika menambahkan eluen keadaan keran kolom terbuka serta kolom kromatografi dengan laju aliran yang konstan. Hasil fraksinasi dikumpulkan dalam botol vial dengan tinggi yang sama. Lalu diberikan penomoran untuk masing-masing fraksi (Supardan, 2022). Tahapan selanjutnya dilakukan pengamatan komponen-komponen senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis serta dilakukan uji KLT-bioautografi untuk mencari fraksi yang dapat berperan sebagai agen anti-bakteri.

3.3.8 Uji KLT-Bioautografi Metode Difusi Agar

Fraksi yang telah didapatkan dari proses pemurnian senyawa kemudian diuji dengan uji bioautografi KLT menggunakan metode difusi agar sebagai agen antibakteri. Mula-mula fraksi ditotolkan pada pelat silika gel 60 F254 dengan kondisi pelarut yang sesuai. Fraksi tersebut selanjutnya dielusi menggunakan eluen n-heksana : EtOAc (10:1) (v/v). Kemudian disiapkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk membiakan bakteri *S. aureus* selama 18-24 jam, Selanjutnya dibuat inokulum bakteri pada media 3% TSB hingga kekeruhan mencapai 0,5 McFarland dengan masa inkubasi inokulum bakteri selama 2 sampai 4 jam. Media MHA dibuat dan dituangkan ke dalam cawan petri sampai media MHA berwujud padatan. Selanjutnya, inokulum bakteri digoreskan pada media MHA secara aseptis dan merata. Pelat silika gel 60 F254 yang telah ditotol fraksi dan dielusi kemudian diletakan pada media MHA dengan posisi plat menempel pada media MHA. Kemudian dilakukan proses difusi dengan disimpan di dalam *refrigerator* selama 1 jam. Pelat kemudian diambil dari cawan petri dan diinkubasi selama 18 jam. Uji positif ditandai dengan munculnya totolan *spot* sesuai dengan pola KLT.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh simpulan sebagai berikut :

1. Berdasarkan proses kultivasi, aktinomisetes dapat tumbuh baik pada media standar ISP-2 maupun pada media selektif kulit udang.
2. Melalui proses skrining, isolat aktinomisetes dengan kode isolat 19B19A1 yang berasal dari perairan Gorontalo merupakan isolat unggulan.
3. Berdasarkan kemampuan daya hambat (inhibisi) ekstrak senyawa bioaktif yang berasal dari isolat kode 19B19A1 mampu berperan sebagai agen anti-bakteri dengan persen inhibisi mencapai 35.7%.
4. Berdasarkan karakterisasi yaitu karakterisasi FTIR didapatkan bahwa isolat unggulan terindikasi sebagai senyawa alkaloid.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, penulis memberikan beberapa saran sebagai berikut:

1. Pada proses kultivasi skala besar (*scale up*) dibutuhkan wadah yang lebih besar agar proses kultivasi dapat dilakukan dalam satu wadah yang sama. Hal ini disebabkan jika wadah yang digunakan berbeda ada kemungkinan proses pertumbuhan aktinomisetes akan berbeda.
2. Dalam proses pertumbuhan aktinomisetes baik peremajaan dan kultivasi harus dilakukan dalam keadaan steril untuk menghindari terjadinya kontaminasi ataupun kemungkinan tidak terjadi proses pertumbuhan aktinomisetes.

3. Perlu dilakukan identifikasi morfologi isolat kode 19B19A1 lebih lanjut dengan filogenetik.
4. Perlu dilakukan karakterisasi lebih lanjut menggunakan (*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*) LCMS/MS dan (*Nuclear Magnetic Resonance*) NMR untuk mengetahui struktur senyawa yang dihasilkan dari isolat 19B19A1.

DAFTAR PUSTAKA

Abdelaleem, E. R., Samy, M. N., Desoukey, S. Y., Liu M., Quinn R. J., and Abdelmohsen, U. R. 2020. Marine natural products from sponges (Porifera) of the order Dictyoceratida (2013 to 2019); a promising source for drug discovery. RSC Adv., **10**, 34959.

Al-Ansari, M., Kalaiyarasi, M., Almalki, M. A., and Vijayaraghavan, P. 2020. Optimization of medium components for the production of antimicrobial and anticancer secondary metabolites from Streptomyces sp. AS11 isolated from the marine environment. *Journal of King Saud University – Science*. **32**. 1993–1998.

Antunes TC, Borba MP, Spadari CC, Antunes AL, Frazzon APG. 2014. Screening of actinomycetes with activity against clinical isolates of gram positive cocci with multi resistant profile. *J Adv Sci Res*. **5**(1): 13-17.

Balagurunathan, R., Radhakrishnan, M., Shanmugasundaram, T., Gopikrishnan, V., Jerrine, J. 2020. Production of Bioproducts from Actinobacteria. *Protocols in Actinobacterial Research*, 113-128

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of pharmaceutical analysis, **6**(2), 71-79.

Bresnick, S. 2004. Intisari Kimia Organik. *Hipokrates*. Jakarta

Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H. 2002. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by Streptomyces NRRL 30562, endophytic on Kennedia nigrisca. *Microbiology*. **148**: 2675- 2685.

Chasanah, E., Noor, N. M., Risjani, Y., & Dewi, A. S. (2017). Aktivitas Antibakteri Dan Antioksidan Ekstrak Streptomyces sp. dan Exserohilum rostratum yang Dikultivasi Pada Tiga Jenis Medium Pertumbuhan. *J. Pascapanen dan Bioteknol. Kelaut. dan Perikan*, **7** (1), 39.

Cwala, Z., Igbinosa, E.O., Okoh, A.I., 2011. Assessment of antibiotics production potential in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. **5** (2), 118–124.

De Simeis, D. and Serra, S. 2021. Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production. *Antibiotics* **10**(5):483.

Direktorat Jenderal Pengelolaan Ruang Laut. 2020. https://kkp.go.id/djprl/artikel/22288-peta-kawasan-konservasi-perairan-tahun-2019. Diakses pada 30 september 2022 pukul 02.48.

Mabhiza, D., Chitemerere, T., and Mukanganyama, S. 2016. Antibacterial Properties of Alkaloid Extracts from Callistemon citrinus and Vernonia adoensis against Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Medicinal Chemistry*, **2016**.

Dutta, J. Dutta, V.S. Tripathi. 2004. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications, *J. Sci. Ind. Res.* **63**. 20–31.

Ereskovsky, A. and Andrey L. 2021. *Invertebrate Histology*: Chapter 2 Porifera. John Wiley & Sons, Inc. New York City.

Fauziana S. P., Herasari D., dan Martasih F. 2012. Penentuan Kondisi Optimum Pertumbuhan Actinomycetes Isolat ANL4 2B-3 Untuk Produksi Enzim Protease. *Prosiding SNSMAIP* **III**. 509-514

Gamaleldin N.M., Bahr H.S., Mostafa Y.A., McAllister B.F., El Zawily A., Ngwa C.J., Pradel G., Hassan H.M., Abdelmohsen U.R., Alkhalifah D.H.M., Hozzein W.N. Metabolomic Profiling, In Vitro Antimalarial Investigation and In Silico Modeling of the Marine Actinobacterium Strain *Rhodococcus* sp. UR111 Associated with the Soft Coral *Nephthea* sp. *Antibiotics*. **2022**. *11*, 1631.

Gottumukkala L. D., Rajasree K., Singhania R. R., Soccol C. R., and Pandey A. 2011. Solid-State Fermentation: Current Trends and Future Prospects. *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, Third Edition. 403-416.

Hassan S. S. u., and Abdul L. S. 2017. Marine actinobacteria as a drug treasure house. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **87**. 46–57.

Hendri, J., dan Aspita L. 2013. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Bandar Lampung.

Jawetz, Melnick, Adelberg. 2013. *Mikrobiologi kedokteran*. Rev 25th ed. EGC. Jakarta.

Je, J. Y., and Kim, S. K. 2012. Chitosan as potential marine nutraceutical. *Advances in food and nutrition research*, **65**, 121-135.

Kalyani, A.L.T., Ramya Sravani, K.M., Annapurana, J., 2012. Isolation and characterization of antibiotic producing actinomycetes from marine soils samples. *Int. J. Curr. Pharmaceut. Res*. **4** (2), 109–112.

Kramer, M.J., D.R. Bellwood and O. Bellwood. 2014b. Benthic crustacea on coral reefs: a aquantitative survey. *Mar Ecol Prog Ser*, **511**: 105-116.

Kumar, A., Bohra, C., Singh, M.L.K. 2003. *Environment, pollution and management.* A.P.H Publishing Corporation. New Delhi.

Kumar, N., Singh, R.K., Mishra, S.K., Singh, A.K., Pachouri, U.C., 2010. Isolation and screening of soil actinomycetes as source of antibiotics active against bacteria. *Int. J. Microbiol. Res.* **2** (2), 12–16.

Kusuma, Ginanjar Adi. 2017. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Buah Majapahit Terhadap Jumlah Leukosit Dan Eritrosit Ikan Lele (Clarias Batrachus) Yang Terinfeksi Bakteri Aeromonas Hydrophila.* Undergraduate Thesis, Universitas Muhammadiyah Gresik.

Lazuardi, M.E., Welly, M., Sanjaya, W., Prasetya, D., & Hendrawan, G. 2016. Kondisi biofisik dan sosial ekonomi Pesisir Bali-2015. Denpasar: Pemerintah Provinsi Bali dan The Nature Conservancy.

Li, Q., Chen, X., Jiang, Y. and Jiang, C. 2016. *Morphological Identification of Actinobacteria. In: Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications*. IntechOpen. London. 59-86.

Ljoljić Bilić, V.; Gašić, U.M.; Milojković-Opsenica, D.; Rimac, H.; Vuković Rodriguez, J.; Vlainić, J.; Brlek-Gorski, D.; Kosalec, I. 2022. Antibacterial Fractions from *Erodium cicutarium* Exposed—Clinical Strains of *Staphylococcus aureus* in Focus. *Antibiotics*, **11**, 492.

Marzuki, I., Noor, A., Djide, N.M., La Nafie, N. 2015. The potensi biodegradation hydrocarbons of petroleum sludge Waste by cell biomassa sponge *Callyspongia sp*. *Journal Marina Chimica Acta*. **16** (2): 11-20.

Megawati, Meryany A, dan I Nengah S. 2019. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri yang Bersimbiosis dengan Spons. *Natural Science: Journal of Science and Technology*. **8** (3): 177—181.

Mohamed, M.A., Jaafar, J., Ismail, A.F., Othman, M.H.D., and Rahman M.A., 2017. Chapter 1 - Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Membrane Characterization*. Pages 3-29.

Nandiyanto, A.B., Oktiani, R., and Ragadhita, R. 2019. How to Read and Interpret FTIR Spectroscope of Organic Material. *Indonesian Journal of Science and Technology*. **4**(1): 97-118.

Parajuli, D.; Sharma, S.; Oli, H.B.; Bohara, D.S.; Bhattarai, D.P.; Tiwari, A.P.; Yadav, A.P. 2022. Comparative Study of Corrosion Inhibition Efficacy of Alkaloid Extract of *Artemesia vulgaris* and *Solanum tuberosum* in Mild Steel Samples in 1 M Sulphuric Acid. *Electrochem*. **3**, 416-433.

Pavia, D.L. 2008. *Introduction to spectroscopy Statitic, 4th Edition*. Brooks Cole. USA.

Pemerintahan Kabupaten Buleleng. 2021. https://bulelengkab.go.id/informasi/detail/profil/68_geografis-dan-iklim. Diakses pada 30 september 2022 pukul 02.15.

Piorkowska, E. 2019. Overview of biobased polymers. *Thermal Properties of Bio-based Polymers*, 1-35.

Rajivgandhi G, Vijayan R, Kannan M, Santhanakrishnan M, Manoharan N. 2016. Molecular characterization and antibacterial effect of endophyticactinomycetes Nocardiopsis sp. GRG1 (KT235640) from brown algae against MDR strains of uropathogens. *Bioactive Materials* **1**(2): 140-150.

Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Maruthupandy, M., Saravanakumar, S., Manoharan, N., and Viji R. 2018. Antibacterial Effect of Endophytic Actinomycetes from Marine Algae against Multi Drug Resistant Gram Negative Bacteria. *Examines Mar Biol Oceanogr*. **1**(4): 1-8.

Reece, Jane B., Wasserman, Steven A., Urry, Lisa A., Minorsky, Peter V., Cain, Michael L., Jackson, Robert B. 2014. *Campbell Biology. Tenth Edition*. Pearson Eduation Inc. Boston.

Setiawan A, Setiawan F, Juliasih NLGR, Widyastuti W, Laila A, Setiawan WA, Djailani FM, Mulyono M, Hendri J, Arai M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Fermentation*, **8**:280.

Setiawan, A., Widyastuti W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai M. and Hendri J. 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using Pseudonocardia carboxydivorans 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*. **7**, 247. 1-10.

Silverstein, Robert M. 2005. *Spectrometric Identification of Organics Compounds*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.

Simeis, D. D. and Stefano S. 2021. Actinomycetes: A Never-Ending Source of Bioactive Compounds—An Overview on Antibiotics Production. *Antibiotics*. **10**. (483). 1-32.

Singhania, R.R., A.K. Patel, C.R. Soccol, and A. Pandey. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* **44**:13–8.

Soedarto. 2014. *Mikrobiologi Kedokteran: Medical Microbiology*. Sagung Seto. Jakarta

Solanki, R., M. Khanna & R. Lal. 2008. Bioactive compounds form marine Actinomycetes. *Indian Journal of Microbiology* **48**: 410--431.

Stella, J.S., M.S. Pratchett, P.A. Hutching, and G.P. Jones, 2011. Coral associated invertebrates: diversity, ecological importance and vulnerability to disturbance. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev*. **49**: 43-104.

Sulistyani, N., & Narwanti, I. (2015). TLC-bioautography profile of ethyl acetate extract of 5 bacteria isolated from *Ficus carica L rhizosphere*. *International Journal of Public Health Science*, **4**, (2), 81-87.

Thawabteh AM, Swaileh Z, Ammar M, Jaghama W, Yousef M, Karaman R, A. Bufo S, Scrano L. 2023. Antifungal and Antibacterial Activities of Isolated Marine Compounds. *Toxins.* **15**(2):93.

Tortora, U., 2004. *Staphylococcus dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Binarupa Aksara. Jakarta.

Valli, S., Suvathi Sugasini, S., Aysha, O.S., Nirmala, P., Vinot Kumar, P., Reena, A., 2012. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific J. Trop. Biomed*. **9**, 416–473.

Wang C., Du W., Lu H., Lan J., Liang K., and Cao S. 2021. A Review: Halogenated Compounds from Marine Actinomycetes. *Molecules*. **26**(9):2754.

Wang, M.; Zhang, Y.; Wang, R.; Wang, Z.; Yang, B.; Kuang, H. An Evolving Technology That Integrates Classical Methods with Continuous Technological Developments: Thin-Layer Chromatography Bioautography. *Molecules* **2021**, *26*, 4647.

Widyastuti, W., Setiawan, F., Al Afandy, C., Irawan, A., Laila, A., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Arai, M., Hendri, J., and Setiawan A. 2022. Antifungal Agent Chitooligosaccharides Derived from Solid-State Fermentation of Shrimp Shell Waste by Pseudonocardia antitumoralis 18D36-A1. *Fermentation*. **8**, 353. 1-11.

Zeng, W., Guo, L., Xu, S., Chen, J. and Jingwen Z. 2020. High-Throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology. *Trends in Biotechnology*. **38** (8): 888-906.