

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKROORGANISME DARI PRODUK  
*SOLUBLE LIQUID* (SL) DAN UJI AKTIVITAS METABOLITNYA  
SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Vibrio parahaemolyticus***

**(Skripsi)**

**Oleh**

**YASMIN FAHIRA  
NPM 2017011045**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2024**

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKROORGANISME DARI PRODUK *SOLUBLE LIQUID* (SL) DAN UJI AKTIVITAS METABOLITNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Vibrio parahaemolyticus*

Oleh

YASMIN FAHIRA

Penyakit *vibriosis* yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio* sp. menjadi masalah kesehatan utama dalam industri perikanan dan budidaya perairan yang sering kali menyebabkan kematian massal pada berbagai jenis ikan. Penelitian ini dilakukan untuk memperoleh senyawa bioaktif dari ekstrak bakteri produk pupuk cair *Soluble Liquid* (SL).

Bakteri diisolasi dari pupuk cair SL menggunakan media *Tryptose Soy Agar* (TSA) dan *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA). Isolat terpilih selanjutnya diidentifikasi makroskopik dan mikroskopik, serta dikultivasi pada media cair *Nutrient Broth* (NB) dan diinkubasi selama tiga hari. Kultur diekstraksi dengan menggunakan etil asetat (EtOAc). Ekstrak kasar diskriminasi aktivitas antibakterinya terhadap *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan metode difusi ring sumuran. Isolat potensial dikultivasi skala besar menggunakan media cair NB. Ekstrak kasar difraksinasi dengan kromatografi kolom dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap *V. parahaemolyticus*. Fraksi aktif dikarakterisasi menggunakan LC-MS/MS. Hasil diperoleh isolat bakteri yang terpilih diduga adalah genus *Lactobacillus* sp. Skrining antibakteri menunjukkan isolat YSL-1 memiliki daya hambat paling besar terhadap *V. parahaemolyticus*.

Hasil analisis data LC-MS/MS sampel YSL-1K2F1 terdeteksi sebanyak 12 puncak dengan total 5 puncak yang memiliki kelimpahan tinggi. Analisis LC-MS/MS pada waktu retensi 17,97 menit dengan puncak dasar 441.2988 m/z teridentifikasi sebagai senyawa turunan *Docosahexaenoic Acid* (DHA) dalam fraksi YSL-1K2F1 yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *V. parahaemolyticus*.

Kata kunci: *Docosahexaenoic acid*, *lactobacillus* sp., *soluble liquid*, dan *vibrio parahaemolyticus*.

## ABSTRACT

### ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF MICROORGANISMS FROM SOLUBLE LIQUID (SL) PRODUCTS AND TESTING THEIR METABOLITE ACTIVITY AS ANTIBACTERIAL AGAINST *Vibrio parahaemolyticus*

By

YASMIN FAHIRA

Vibriosis disease caused by the bacteria *Vibrio* sp. It is a major health problem in the fishing and aquaculture industry which often causes mass deaths in various types of fish. This research was conducted to obtain bioactive compounds from bacterial extracts from Soluble Liquid (SL) liquid fertilizer products. Bacteria were isolated from SL liquid fertilizer using Tryptose Soy Agar (TSA) and de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) media. The selected isolates were then identified macroscopically and microscopically, and cultivated in Nutrient Broth (NB) liquid media and incubated for three days. Cultures were extracted using ethyl acetate (EtOAc). The crude extract was screened for its antibacterial activity against *Vibrio parahaemolyticus* using the ring well diffusion method. Potential isolates were cultivated on a large scale using NB liquid media. The crude extract was fractionated by column chromatography and tested for bacterial activity against *V. parahaemolyticus*. The active fraction was further characterized using LC-MS/MS. The results obtained by the selected bacterial isolate are thought to be the genus *Lactobacillus* sp. Antibacterial screening showed that YSL-1 isolate had the greatest inhibitory effect against *V. parahaemolyticus*. The results of LC-MS/MS data analysis of the YSL-1K2F1 sample detected 12 peaks with a total of 5 peaks having high abundance. LC-MS/MS analysis at a retention time of 17.97 minutes with a base peak of 441.2988 m/z indicated a compound derived from Docosahexaenoic Acid (DHA) in the YSL-1K2F1 fraction which had antibacterial activity against *V. parahaemolyticus*.

Keywords: Docosahexaenoic acid, *lactobacillus* sp., soluble liquid, and *vibrio parahaemolyticus*.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI MIKROORGANISME DARI PRODUK  
*SOLUBLE LIQUID* (SL) DAN UJI AKTIVITAS METABOLITNYA  
SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP *Vibrio parahaemolyticus***

**Oleh**

**Yasmin Fahira**

**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  
2024**

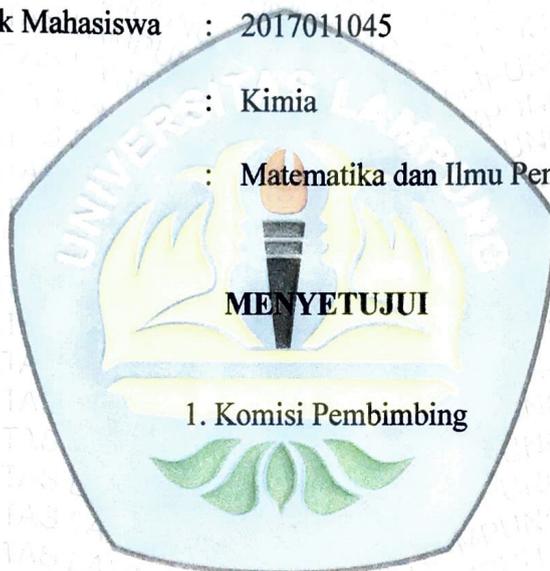
Judul : ISOLASI DAN KARAKTERISASI  
MIKROORGANISME DARI PRODUK  
*SOLUBLE LIQUID (SL)* DAN UJI  
AKTIVITAS METABOLITNYA SEBAGAI  
ANTIBAKTERI TERHADAP *VIBRIO*  
*PARAHAEMOLYTICUS*

Nama : **Yasmin Fahira**

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011045

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



1. Komisi Pembimbing

  
**Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197308252000031001

  
**Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197412111998022001

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

  
**Dr. Mita Rilyanti, M.Si.**  
NIP. 197205302000032001

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

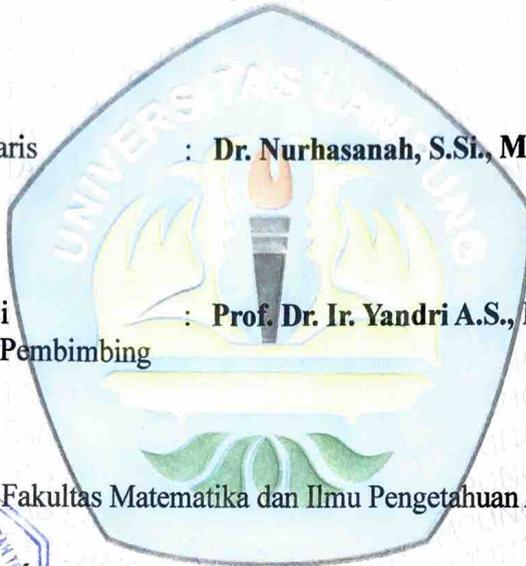
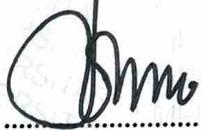
Ketua : Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.



Sekretaris : Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si.

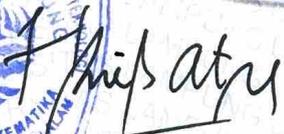


Penguji Selain Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Yandri A.S., M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Ujian Skripsi: 18 Juli 2024

**LEMBAR PERNYATAAN**  
**KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yasmin Fahira  
Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011045  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme dari Produk Soluble Liquid (SL) dan Uji Aktivitas Metabolitnya Sebagai Antibakteri Terhadap *Vibrio Parahaemolyticus***” adalah benar karya sendiri meliputi topik penelitian, perolehan hasil penelitian, maupun pengolahan datanya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagaimana semestinya.

Bandar Lampung, 18 Juli 2024

Yang menyatakan,



Yasmin Fahira  
NPM. 2017011045

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis bernama lengkap Yasmin Fahira, lahir di Bekasi pada tanggal 18 Desember 2002 yang merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis lahir dari pasangan suami istri yaitu Bapak Edy Setiawan dan Ibu Erlina Widiaty, penulis memiliki satu orang adik yang bernama Salwa Atika. Penulis saat ini bertempat tinggal di Bekasi, Jawa Barat.

Penulis telah menyelesaikan pendidikan mulai dari TK Al-Lana pada tahun 2008, SDIT El-Hurriyah lulus pada tahun 2014, SMPIT Nurul Fajri lulus pada tahun 2017, SMA Negeri 1 Cikarang Barat lulus pada tahun 2020. Pada tahun 2020 penulis diterima sebagai mahasiswa di S1 Jurusan Kimia, fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama belajar di perkuliahan, penulis juga aktif dalam berorganisasi. Organisasi yang pernah diikuti yaitu Unit Kegiatan Mahasiswa-Universitas (UKM-U) Sains dan Teknologi (SAINTEK) sebagai anggota Departemen Hubungan Masyarakat pada tahun 2021 dan Badan Eksekutif Mahasiswa Fakultas MIPA (BEM-FMIPA) sebagai Staff Ahli Dinas Sains dan Pengabdian Masyarakat (SPM). Pada tahun 2022 penulis mengikuti Pertukaran Pelajar di Universitas Gadjah Mada (UGM) selama satu semester melalui Platform Merdeka Mengajar (PMM) dari Kemendikburistek. Penulis telah melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) pada tahun 2023 di Pekon Padang Tambak, Lampung Barat. Penulis juga telah melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Laboratorium Mikrobiologi Balai Pengujian Mutu Barang Direktorat Standardisasi dan Pengendalian Mutu Kementerian Perdagangan.

## PERSEMBAHAN

Dengan mengucapkan *alhamdulillahirobbil'alamin* puji syukur kepada Allah *subhanahu wa ta'ala* atas limpahan rahmat dan karunia-Nya yang selalu menyertai setiap langkahku, sehingga terciptalah sebuah karya yang kupersembahkan sebagai wujud bakti dan tanggung jawabku kepada:

Ayah Edy dan Ibu Erlina yang telah mengandung, melahirkan, membesarkan, mendidik, memberikan cinta dan kasih sayang, mendoakan, menyemangati, serta senantiasa mendukung dan menemani setiap langkahku. Semoga Allah SWT hadiahkan *Jannah-Nya* untukmu, *Aamiin yaa Robbal'alamin*.

Adik Salwa Atika yang telah mendukung dan mendoakan dalam segala hal. Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan keberkahan, keberhasilan, dan kebahagiaan untuk *rumahku*.

Pembimbing penelitianku, Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S., M.S., serta seluruh Dosen Jurusan Kimia yang telah membimbing, mendidik, dan memberikan banyak ilmu kepadaku selama menjalani proses pendidikan sarjana ini.

Serta,  
Almamaterku tercinta, Universitas Lampung.

## MOTTO

*“Once you make a decision, put your trust in Allah. Surely Allah loves those who trust in Him”*

(Q.S. Ali'imran: 159)

*“Surely Allah's Promise is true. So do not let the life of this world deceive you”*

(Q.S. Luqman: 33)

*“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light”*

(Albus Dumbledore)

*“Selalu ada yang pertama kali dalam segala sesuatu, termasuk gagal”*

(NKCTHI)

## SANWACANA

Pertama-tama dengan mengucap rasa syukur Alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT yang telah memberikan limpahan rahmat serta karunia-Nya dan tidak lupa iringan shalawat senantiasa kita sanjung agungkan kepada junjungan dan baginda besar kita Rasulullah Muhammad SAW, semoga kita sebagai umatnya akan mendapatkan syafaatnya di yaumul akhir kelak. Alhamdulillah penulis dapat menyelesaikan penelitian ini yang berjudul “**Isolasi dan Karakterisasi Mikroorganisme Dari Produk *Soluble Liquid* (SL) dan Uji Aktivitas Metabolitnya Sebagai Antibakteri Terhadap *Vibrio Parahaemolyticus*”** dengan baik.

Penulis menyadari skripsi ini dapat tersusun dan diselesaikan dengan adanya doa, bantuan, dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya.
2. Orangtuaku, Ayah Edy Setiawan dan Ibu Erlina Widiaty yang senantiasa selalu mendoakan, membimbing, mendukung, memberikan kasih sayang yang melimpah, serta menjadi penyemangat utama bagi penulis.
3. Adikku, Salwa Atika yang selalu memberikan dukungan bagi penulis.
4. Asnawi's *Family* dan Zarkasi's *Family* yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan bagi penulis.
5. Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing I, terima kasih banyak atas bimbingan, saran, motivasi, dan bentuk lainnya yang telah diberikan kepada penulis dalam menyusun skripsi ini. Semoga Allah SWT selalu memberikan keberkahan dan kesuksesan untuk Bapak.

6. Ibu Dr. Nurhasanah, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing Akademik sekaligus Pembimbing II, terima kasih banyak atas arahan, dukungan, bimbingan, saran, serta kritik selama masa perkuliahan dan penyusunan skripsi ini. Semoga Allah SWT selalu memberikan keberkahan dan kesuksesan untuk Ibu.
7. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri, A.S, M.S., selaku Dosen Pembahas, terima kasih banyak atas saran, masukan, nasihat, serta dukungan kepada penulis dalam menyusun skripsi ini.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah membantu dalam segala hal terkait administrasi dan menyetujui laporan skripsi ini.
9. Bapak dan Ibu Dosen di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang tidak dapat disebutkan satu per-satu yang telah membimbing dan memberikan banyak ilmu kepada penulis selama perkuliahan. Semoga selalu diberikan kesehatan dan kemudahan dalam menjalani kehidupan.
10. Sahabat “Pulang-Pergi” (Anggun, Elsa, Geo, Mitha, Mutiara, Salwa, Sarah, dan Tasya) yang selalu menjadi tempat berteduh dalam keadaan *ups and downs* selama perkuliahan. Terima kasih sudah menjadi bagian kenangan yang baik bagi penulis. Semoga hal-hal yang baik selalu menyertai kita semua, *i'll be missing you so bad guys*.
11. Teman-teman seperjuangan “SBR’20” (Carlos, Febrina, Laura, Sekar, dan Vivi) yang selalu memberikan motivasi bagi penulis dan membantu dalam segala hal untuk penulis selama menyelesaikan penelitian ini.
12. Kakak mentor, Fendi Setiawan yang selalu menjadi tempat berdiskusi, berkeluh kesah, hingga bertengkar selama penelitian. Terima kasih atas ilmu dan bimbingan yang diberikan selama penelitian di laboratorium, *Hopefully everything will be easier by Allah SWT for you, see you when i see you, Kak!*
13. LTSIT *Gang* (Mbak Oci, Mbak Ais, Mbak Laras, JHR’20, ADS’20, NGR’20, SWR’20), yang selalu memberikan warna di laboratorium sehingga penulis tidak merasa jenuh saat penelitian. Semoga kalian sukses kedepannya!

14. Teman-teman se-perantauan “FTIR” (Dian, Geo, Mutiara, Najla, dan Putri) yang selalu menjadi tempat untuk bermain, belajar, dan berkeluh kesah bagi penulis selama masa akhir di perkuliahan. Terima kasih untuk segala dukungan dan doa untuk penulis, *see you on top!*.
15. Sahabat-sahabatku, (Ameng, Ody, Ina, Salsa, Ody, Inez, Ichika, Vian, Egy) terima kasih untuk dukungan, doa, hingga makian untuk penulis. Semoga kita selalu saling terhubung dan berhubung. *Finally, i'm back!*.
16. Teman-teman angkatan 2020, dan seluruh pihak yang tidak dapat disebutkan satu per-satu, terima kasih atas pertemuan yang singkat, bantuan, serta dukungannya. Semoga kalian diberikan kebahagiaan di setiap langkah.
17. MDF “*the guy I met in the final semester*”, Terima kasih atas kehadirannya, doa yang baik, dukungan terus-menerus, dan hal-hal kecil yang tidak bisa didefinisikan dalam kata-kata bagi penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini. Semoga segala sesuatu yang diharapkan dapat tercapai dan dapat melampauinya. *May the force be with you, to infinity and beyond!*.
18. *Last but not least*, Yasmin Fahira. Terima kasih sudah bisa bertahan selama penelitian dan penulisan skripsi ini. Apresiasi sebesar-besarnya karena kamu bisa menyelesaikan yang telah kamu mulai. *Thank you for always being authentically you.*

Demikian yang dapat penulis sampaikan, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan serta kesalahan dalam penyusunan skripsi ini. Penulis berharap skripsi ini mampu dijadikan sebagai referensi yang bermanfaat. Semoga Allah SWT selalu memberkahi kita semua. Amiin.

Bandar Lampung, 18 Juli 2024

Penulis,

Yasmin Fahira  
2017011045

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR .....</b>	<b>xiv</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian .....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>5</b>
2.1 Komposisi Produk <i>Soluble Liquid</i> (SL) .....	5
2.1.1 Tanaman Obat.....	5
2.1.2 Minyak Nabati .....	6
2.1.3 Minyak Hewani .....	7
2.1.4 Air Kelapa .....	9
2.2 Isolasi Bakteri.....	10
2.3 Kultivasi .....	11
2.4 Ekstraksi Senyawa Metabolit .....	11
2.5 Bakteri Uji .....	12
2.5.1 Aktivitas <i>Vibrio parahaemolyticus</i> .....	12
2.5.2 Bakteri Pengendali <i>Vibrio</i> .....	13
2.6 Kromatografi .....	14
2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	15
2.6.2 Kromatografi Kolom .....	16
2.7 Karakterisasi Struktur Senyawa .....	17
2.7.1 <i>Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i> (LC-MS/MS) .....	18
<b>III. METODE PENELITIAN.....</b>	<b>20</b>
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	20
3.2 Alat dan Bahan.....	20
3.3 Prosedur Kerja.....	21
3.3.1 Pembuatan Media.....	21
3.3.2 Isolasi Bakteri dari <i>Soluble Liquid</i> .....	22
3.3.3 Identifikasi Morfologi Bakteri .....	23
3.3.4 Kultivasi Bakteri .....	23
3.3.5 Ekstraksi Senyawa Metabolit.....	24
3.3.6 Kromatografi Lapis Tipis .....	24
3.3.7 Uji Skrining Aktivitas Antibakteri .....	25
3.3.8 Kultivasi Bakteri ( <i>Scale Up</i> ) dan Ekstraksi .....	25

3.3.9	Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom.....	26
3.3.10	Karakterisasi Senyawa .....	26
<b>IV.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>27</b>
4.1	Isolat Bakteri dari <i>Soluble Liquid</i> .....	27
4.2	Kultur Bakteri dan Ekstrak Senyawa Metabolit .....	30
4.3	Kromatografi Lapis Tipis .....	32
4.4	Aktivitas Antibakteri .....	33
4.5	<i>Scale Up</i> dan Ekstrak Produk Isolat YSL-1 .....	34
4.6	Fraksi Kromatografi Kolom.....	35
4.7	Karakteristik Senyawa .....	39
<b>V.</b>	<b>SIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
5.1	Simpulan .....	43
5.2	Saran.....	43
	<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
	<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>54</b>
1.	Kultur Isolat Bakteri.....	55
2.	Ekstraksi Partisi Kultur : EtOAc (1:1 v/v) .....	56
3.	Pemurnian Kromatografi Kolom.....	56
4.	Perhitungan Rendemen Biomassa Ekstrak Kasar .....	57
5.	Hasil Analisis LC-MS/MS $t_R$ 17,97 menit dalam <i>Software SIRIUS</i> dan <i>database Chemspider</i> .....	58

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Pengamatan Morfologi Bakteri YSL-1, YSL-2, dan YSL-3.....	29
2. Rendemen Biomassa Ekstrak Kasar yang Dihasilkan Oleh Setiap Isolat Bakteri. .....	31
3. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	33
4. Aktivitas Antibakteri Fraksi YSL-1K1F1, YSL-1K1F2, dan YSL-1K1F3 terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> .....	38
5. Interpretasi Puncak Utama Kromatogram YSL-1K2F1.....	40

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Senyawa Kurkumin.....	6
2. Struktur Asam Linoleat. ....	7
3. Struktur Asam Oleat. ....	8
4. Struktur Asam Laurat. ....	10
5. Metode (a) Cawan Tuang (b) Cawan Gores.....	10
6. Pewarnaan Gram <i>Vibrio parahaemolyticus</i> . ....	12
7. Bakteri <i>Bacillus subtilis</i> . ....	14
8. Hasil KLT Fase Gerak Kloroform:Metanol. ....	16
9. Kromatografi Kolom.....	17
10. Hasil LC-MS/MS. ....	18
11. Spektrogram Massa Isolat pada Retensi 7,49 menit. ....	18
12. Pengamatan Makroskopik (a) Media TSA dan (b) Media MRSA. ....	28
13. Isolat Bakteri SL (a) YSL-1, (b) YSL-2, dan (c) YSL-3.....	28
14. Pengamatan Bakteri (a) Media TSA, (b) Mikroskop Perbesaran 400x, dan (c) SEM Perbesaran 15000x. ....	29
15. Kultivasi Bakteri (a) Sebelum Inkubasi dan (b) Setelah Inkubasi. ....	31
16. Hasil KLT Ekstrak Kasar Eluen <i>n</i> -Heksana : Etil Asetat (7:3) di Bawah Sinar UV 254 nm. ....	32
17. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kasar terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> . ....	33
18. Kultivasi Isolat YSL-1 dalam <i>Nutrient Broth</i> . ....	35
19. KLT Ekstrak Kasar YSL-1 dengan Eluen <i>n</i> -Heksana : Etil asetat (a) UV 254 nm; (b) Serium(IV)sulfat; (c) <i>Dragendorff</i> ; dan (d) Ninhidrin. ....	36

20. KLT Hasil Fraksinasi Ekstrak Kasar YSL-1 (a) Sinar UV 254 nm dan (b) Serium(IV)sulfat.....	37
21. Aktivitas Antibakteri Fraksi YSL-1K1F1, YSL-1K1F2, dan YSL-1K1F3 terhadap <i>V. parahaemolyticus</i> .....	37
22. Hasil KLT Fraksinasi YSL-1K2F1 (a) Sinar UV 254 nm dan (b) Serium(IV)sulfat.....	38
23. Hasil KLT YSL-1K2F1 (a) UV 254 nm; (b) Serium(IV)sulfat; (c) <i>Dragendorff</i> ; dan (d) <i>Ninhidrin</i> .....	39
24. <i>Total Ion Chromatogram</i> (TIC) Sampel YSL-1K2F1.....	39
25. Puncak MS Sampel YSL-1K2F1 $t_R$ 17,97 menit. ....	41
26. Perkiraan Struktur Senyawa $t_R$ 17,97 menit Sampel YSL-1K2F1.....	41
27. Struktur <i>Docosahexaenoic Acid</i> (DHA).....	42

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Bakteri *Vibrio* (*Vibriobacteria*) adalah sekelompok bakteri yang dapat menyebabkan penyakit pada manusia dan hewan, terutama ketika sudah kontaminasi pada makanan atau air. *Vibrio* termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram-negatif yang ditemukan di lingkungan air laut dan air tawar. Beberapa jenis *Vibrio*, seperti *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus*, dapat menyebabkan penyakit serius pada manusia seperti gastroenteritis dan kolera, serta infeksi kulit dan jaringan lunak seperti selulitis dan *necrotizing fasciitis* (Baker *et al.*, 2018). Kasus di Indonesia, *V. cholerae* dan *V. parahaemolyticus* merupakan jenis *Vibrio* yang sering terdeteksi dalam infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh konsumsi makanan laut mentah atau kurang matang. *V. cholerae* juga menjadi penyebab utama wabah kolera di beberapa wilayah di Indonesia. Selain itu, kasus infeksi kulit yang disebabkan oleh *V. vulnificus* juga telah dilaporkan di Indonesia.

Berdasarkan data Kementerian Kesehatan Indonesia, menunjukkan bahwa kasus kolera di Indonesia mencapai 41.882 kasus pada tahun 2018, sedangkan pada tahun 2019 kasus infeksi saluran pencernaan lainnya yang disebabkan oleh *Vibrio* mencapai 342 kasus (Kemenkes, 2019). Selain menyebabkan penyakit kolera pada manusia, *Vibrio* dapat menjangkit hewan. Pada hewan, *Vibrio* umumnya menjangkit spesies udang yang biasa disebut dengan penyakit *Vibriosis* (Chandrakala and Priya, 2017). *Vibriosis* udang adalah penyakit bakteri mematikan yang disebabkan oleh spesies *Vibrio* dan dapat mempengaruhi berbagai spesies udang. Udang yang terjangkit *vibriosis* umumnya dipengaruhi oleh *Vibrio* dengan spesies *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V.*

*campbellii*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, dan *V. splendidus* (Chatterjee and Haldar, 2012; Kumar and Roy, 2017).

Pada udang, infeksi *Vibrio* terlibat dalam beberapa penyakit seperti *shell disease*, *tail necrosis*, *red disease*, *luminous vibriosis*, *loose shell syndrome*, *acute hepatopancreatic necrosis disease* atau *early death syndrome*, *vibrio septicemia*, *septic hepatopancreatic necrosis disease*, dan *white gut disease* (de Souza Valente and Wan, 2021). Flegel (2012) menyebutkan bahwa 60% dari perkiraan kehilangan produksi udang disebabkan oleh virus *white spot syndrome*, sementara 20% oleh infeksi bakteri (terutama oleh *Vibrio spp*). Udang yang terjangkit bakteri *Vibrio sp.* menunjukkan beberapa gejala, meliputi gejala nafsu makan berkurang, berenang menyamping, bergerak mendekati gelembung udara, kemerahan pada kaki renang dan *uropod* serta terjadi nekrosis dan melanisasi pada bagian tubuh (Pariakan dan Rahim, 2021). Lagan`a *et al.* (2011) dalam Yano *et al.* (2014), menyebutkan *vibriosis* udang dan penyakit terkait menyebabkan kerugian ekonomi yang tinggi dalam budidaya udang. Beberapa dekade terakhir, berbagai antibiotik dan antimikroba telah digunakan untuk mengendalikan *vibriosis*. Menurut El-Saadony *et al.* (2021), penyakit pada hewan laut dapat diatasi oleh probiotik yang dapat memberikan manfaat kesehatan bagi ikan dan udang jika diberikan dalam dosis suplemen yang sesuai.

Berdasarkan penelitian Hoseinifar *et al.* (2018), Abdel-Tawwab *et al.* (2020), Mohammadi *et al.* (2021), Ringø *et al.* (2020), dan Ringø (2020), berbagai spesies mikroba probiotik Gram-positif dan Gram-negatif seperti spesies *Bacillus*, spesies *Vibrio*, bakteri asam laktat, dan beberapa spesies bakteri lainnya telah digunakan sebagai probiotik pada budidaya udang. Mikroorganisme probiotik dapat dimanfaatkan sebagai obat terhadap penyakit *vibriosis* melalui proses isolasi mikroba. Mikroba yang diisolasi umumnya berupa bakteri, virus, dan juga jamur yang memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Vibrio*. Pengendali *Vibrio* berbasis mikroba dilakukan dengan didasari dari penggunaan antibiotik berlebihan dalam pengendalian *Vibrio* yang dapat menyebabkan resistensi antibiotik dan dapat menimbulkan dampak yang buruk pada lingkungan. Pemanfaatan mikroba dalam pengendalian bakteri *Vibrio* yang telah dilakukan oleh beberapa peneliti

dibuktikan bersifat lebih aman dan ramah lingkungan dibandingkan dengan penggunaan antibiotik atau bahan kimia, serta dapat menurunkan jumlah *Vibrio* dalam produk perikanan dan mengurangi infeksi pada manusia (Xu *et al.*, 2021).

Penelitian tentang kemampuan mikroba sebagai pengendali bakteri patogen telah banyak dilakukan dalam beberapa tahun terakhir. Biomassa pengendali bakteri patogen dapat diperoleh dari ekosistem daratan dan perairan. Salah satu pemanfaatan biomassa daratan yaitu limbah sampah organik. Limbah sampah organik dapat dimanfaatkan sebagai pembuatan pupuk organik cair. Bahri dkk. (2023) memanfaatkan limbah sampah organik dan larutan biang menjadi pupuk organik cair dengan teknik *Soluble Liquid* (SL). Menurut Nur dkk. (2016), dalam pupuk organik cair diketahui terdapat sekitar 80 genus mikroorganisme yang beragam, terdapat lima jenis utama yaitu bakteri fotosintetik, *Lactobacillus* sp., *Streptomyces* sp., ragi, dan *Actinomycetes*. Beragam jenis pengendali *Vibrio* telah diisolasi seperti bakteri dan jamur. Asmat *et al.* (2016), mengisolasi bakteri probiotik yang dapat digunakan sebagai pengendali *Vibrio* pada udang vaname. Bakteri yang dihasilkan dapat menghambat pertumbuhan *Vibrio* dan meningkatkan kesehatan pada udang. Selain itu, ditemukan bahwa bakteri probiotik *Pseudomonas stutzeri* juga dapat digunakan sebagai agen pengendali *Vibrio* pada udang *Litopenaeus vaname* (Feng *et al.*, 2017). Bakteri lainnya juga dilaporkan dapat meningkatkan kelangsungan hidup pada udang, meliputi *Arthobacter* sp., *Bacillus* sp., dan *Lactobacillus* sp. terhadap *V. harveyi* dan *V. parahaemolyticus* (Li *et al.*, 2008; Sha *et al.*, 2016).

Berdasarkan pemaparan tersebut, pada penelitian ini dilakukan isolasi bakteri yang berasal dari produk pupuk organik cair SL yang telah dibuat oleh Bahri dkk. (2023) dan telah digunakan sebagai penyubur tanaman dan cairan pengendali *Vibrio* pada udang. Produk tersebut terdiri dari bahan organik meliputi sampah organik, tanaman obat, minyak nabati, minyak hewani, dan air kelapa. Mengacu pada komposisi yang terkandung dalam SL, dapat dipastikan adanya berbagai mikroorganisme di dalamnya. SL memiliki karakteristik cairan yang dapat larut dalam air, maka dari itu sampel ini dapat diisolasi dengan metode pengenceran dan dapat diidentifikasi pada bakteri terpilih melalui identifikasi makroskopis dan

mikroskopis. Bakteri yang terpilih selanjutnya diperbanyak melalui proses kultivasi dan diekstraksi untuk mendapatkan ekstrak kasar yang digunakan dalam uji antibakteri terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Kemudian, dilakukan pengamatan zona hambat pada uji antibakteri dengan metode difusi agar, pemisahan senyawa dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), fraksinasi dengan kromatografi kolom, serta karakterisasi senyawa menggunakan *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

## 1.2 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka penelitian ini dilakukan dengan tujuan sebagai berikut:

1. Memperoleh karakteristik morfologi isolat bakteri terpilih pada produk *Soluble Liquid* (SL).
2. Memperoleh data aktivitas antibakteri dari ekstrak isolat terpilih terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*.
3. Memperoleh hasil karakteristik senyawa bioaktif pengendali *V. parahaemolyticus*.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan kontribusi dalam perkembangan ilmu pengetahuan, di antaranya yaitu produk *Soluble Liquid* (SL) dapat menjadi salah satu sumber mikroba aktif yang mampu bertindak sebagai antibakteri terhadap bakteri *V. parahaemolyticus* dan menghasilkan senyawa yang dapat menurunkan aktivitas *Vibrio* pada udang.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Komposisi Produk *Soluble Liquid* (SL)

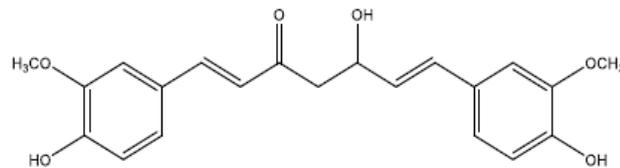
Pupuk cair organik berasal dari pupuk padat yang mengalami perendaman. Umumnya, pupuk cair organik melewati proses bioremediasi, yang bertujuan memperbaiki kondisi pencemaran dalam limbah dengan melibatkan beragam organisme. Organisme dalam pupuk cair dapat mengubah zat-zat berbahaya menjadi zat yang aman bagi lingkungan sekitar, yang dikenal sebagai bakteri indigen (Suryani dkk., 2022).

Produk *Soluble Liquid* (SL) merupakan limbah sampah organik yang diolah menjadi pupuk organik cair dengan metode SL. Pupuk organik cair dibuat dengan komposisi dasar sampah organik dan larutan biang yang dibuat dari rempah tanaman obat, minyak nabati, minyak hewani, dan air kelapa. Produk SL dibuat melewati proses pencacahan sampah organik untuk menghasilkan lindi yang dicampurkan dengan larutan biang. Pupuk organik cair SL yang dihasilkan digunakan sebagai aplikasi pada tanaman dan sebagai agen pengendali *Vibrio* (Bahri dkk., 2023).

#### 2.1.1 Tanaman Obat

Tanaman obat atau tumbuhan obat telah digunakan sebagai sumber pengobatan sejak ribuan tahun yang lalu dan masih menjadi bagian penting dalam pengobatan tradisional di banyak negara. Beberapa jenis tanaman obat terkenal yang telah lama digunakan di Asia termasuk kunyit (*Curcuma longa*), jahe (*Zingiber*

*officinale*), dan kemangi (*Ocimum basilicum*) (Sultana and Anwar, 2019). Kunyit mengandung senyawa yang memiliki sifat antiinflamasi, antivirus, dan antioksidan yang kuat. Jahe mengandung senyawa yang memiliki sifat antiinflamasi dan analgesik, serta dapat membantu meredakan masalah pencernaan. Kemangi mengandung senyawa yang memiliki sifat antijamur, antibakteri, dan antiinflamasi (Mishra and Palanivelu, 2017). Struktur dasar senyawa kurkumin dapat dilihat pada Gambar 1.



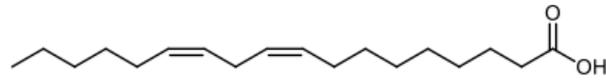
**Gambar 1.** Struktur Senyawa Kurkumin (Lestari dkk., 2020).

Beberapa jenis tanaman obat lainnya yang juga dikenal karena khasiatnya sebagai obat meliputi daun sirsak (*Annona muricata*), temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*), kencur (*Kaempferia galanga*), dan jarak pagar (*Jatropha curcas*). Temulawak dan kencur mengandung senyawa yang memiliki sifat antioksidan dan antiinflamasi (Nafisa and Rizwani, 2016). Adapun beberapa tanaman obat seperti bawang putih (*Allium sativum*), lidah buaya (*Aloe vera*), dan kemangi yang memiliki potensi dalam mengatasi infeksi mikroba yang resisten terhadap obat-obatan (Olasehinde *et al.*, 2020).

### 2.1.2 Minyak Nabati

Minyak nabati adalah minyak yang diperoleh dari biji-bijian, buah-buahan atau kacang-kacangan (Gupta and Sharma, 2018). Salah satu penggunaan minyak nabati adalah sebagai bahan baku dalam produksi SL. Minyak nabati memiliki potensi besar sebagai sumber bahan baku untuk produk SL karena kandungan asam lemaknya yang tinggi. Minyak nabati yang banyak digunakan antara lain minyak kelapa, minyak kedelai, dan minyak kelapa sawit (Chen and Chen, 2016). Minyak nabati mengandung berbagai asam lemak seperti asam linoleat, lenolenat,

dan arakidonat. Struktur dasar senyawa asam linoleat dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Struktur Asam Linoleat (Yuhana, 2019).

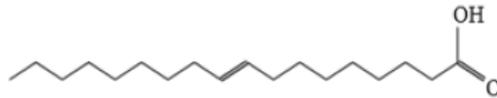
Menurut penelitian yang dilakukan oleh Bhati *et al.* (2017), minyak nabati yang digunakan dalam produksi SL harus memiliki sifat polaritas dan viskositas yang sesuai agar dapat terdispersi secara merata dalam air. Oleh karena itu, minyak nabati yang digunakan dalam produksi SL umumnya telah melalui proses modifikasi seperti hidrogenasi atau esterifikasi untuk menghasilkan sifat polaritas dan viskositas yang sesuai. Selain itu, kandungan asam lemak dalam minyak nabati juga dapat mempengaruhi sifat fisik dan kimiawi dari produk SL yang dihasilkan.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zakaria *et al.* (2018), minyak nabati yang kaya akan asam lemak jenuh cenderung menghasilkan produk SL dengan sifat viskositas yang tinggi dan waktu pengeringan yang lama, sedangkan minyak nabati yang kaya akan asam lemak tak jenuh cenderung menghasilkan produk SL dengan sifat viskositas yang rendah dan waktu pengeringan yang singkat. Proses produksi produk SL juga dapat dilakukan melalui proses elektrokoagulasi yang mampu menghilangkan limbah organik dari cairan limbah Pabrik Kelapa Sawit (PKS) (Maulida and Arifin, 2018). Produk SL yang dibuat dari campuran minyak nabati dan urea memiliki nilai positif selain bersifat ramah lingkungan dan mudah disimpan, produk dengan campuran minyak nabati memiliki kandungan nutrisi yang lengkap dan mudah diserap oleh tanaman.

### 2.1.3 Minyak Hewani

Minyak hewani adalah minyak yang berasal dari hewan, seperti sapi, babi, domba, ayam, dan ikan. Menurut Iswari dkk. (2018), minyak hewani memiliki

kandungan asam lemak jenuh yang tinggi, seperti asam palmitat dan stearat. Minyak hewani juga mengandung asam lemak tak jenuh, seperti asam oleat dan linoleat. Selain dikonsumsi secara langsung, minyak hewani juga dapat digunakan dalam berbagai industri, seperti industri makanan, kosmetik dan farmasi, dan juga industri pertanian. Struktur dasar senyawa asam oleat dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Struktur Asam Oleat (Maisaroh dkk., 2016).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putri dan Hapsari (2019), dalam industri makanan, minyak hewani dapat meningkatkan rasa dan aroma pada produk makanan, serta meningkatkan tekstur dan daya simpan. Namun, pemilihan jenis minyak hewani yang tepat perlu diperhatikan agar dapat menghasilkan produk makanan yang berkualitas dan sehat. Minyak hewani juga berguna dalam industri kosmetik dan farmasi, minyak hewani berguna sebagai bahan baku dalam pembuatan krim, sabun, dan obat-obatan. Minyak hewani seperti minyak ikan dapat mengandung asam lemak omega-3 yang bermanfaat untuk kesehatan kulit dan rambut. Selain itu, minyak hewani juga dapat berfungsi sebagai agen pelarut bagi bahan aktif dalam produk kosmetik dan farmasi (Handayani dkk., 2020).

Produksi SL umumnya memerlukan minyak hewani yang dapat digunakan sebagai pelarut bagi bahan aktif dalam produk. Merujuk hasil yang dilakukan oleh Wijayanti dkk. (2019), minyak hewani dapat digunakan sebagai pelarut bagi bahan aktif seperti vitamin A dan vitamin E dalam produk SL. Selain itu, minyak hewani juga dapat membantu meningkatkan stabilitas oksidatif dari produk SL karena kandungan asam lemak jenuhnya yang stabil terhadap oksidasi.

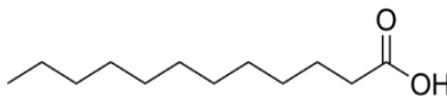
#### 2.1.4 Air Kelapa

Air kelapa adalah cairan yang dihasilkan dari buah kelapa hijau (*Cocos nucifera L.*) yang masih muda dan belum matang secara sempurna. Air kelapa memiliki rasa manis dan segar serta kandungan nutrisi yang beragam seperti elektrolit, gula, protein, mineral, dan vitamin (Adawiyah dkk., 2021). Senyawa fenolik ditemukan dalam kelapa melibatkan katekin dan berbagai jenis asam fenolik, termasuk asam protokatekuat, asam klorogenat, asam vanilat, asam galat, dan asam ellagic (Leliana *et al.*, 2022). Menurut Leliana *et al.* (2022), buah kelapa memiliki aktivitas antioksidan yang tinggi. Salah satu manfaatnya yaitu dapat mengurangi hipertensi. Air kelapa telah digunakan secara luas sebagai minuman untuk mengatasi dehidrasi, meningkatkan kesehatan kulit dan rambut, serta mengurangi kadar kolesterol dalam tubuh (Adawiyah dkk., 2021).

Menurut Tjahjadi *et al.* (2016), air kelapa dapat digunakan sebagai pelarut dalam produksi SL karena memiliki sifat polaritas yang tinggi dan mudah terdispersi dalam air. Selain itu, air kelapa juga memiliki kandungan gula alami yang dapat berfungsi sebagai agen pengemulsi dalam produksi SL. Penelitian lain yang dilakukan oleh Sari *et al.* (2020), menunjukkan bahwa air kelapa yang telah melalui proses fermentasi dapat meningkatkan kualitas dan stabilitas SL yang dihasilkan. Proses fermentasi dapat menghasilkan senyawa seperti asam laktat dan asetat yang dapat meningkatkan viskositas dan kestabilan SL.

Penggunaan air kelapa dalam produksi SL juga dapat memberikan manfaat tambahan seperti meningkatkan sifat antioksidan dan antiinflamasi dari produk tersebut. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Huang *et al.* (2021), air kelapa yang telah diolah menjadi ekstrak dapat meningkatkan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi pada produk SL yang dihasilkan. Produk SL yang dihasilkan dari air kelapa memiliki karakteristik yang mirip dengan produk SL yang dihasilkan dari bahan baku minyak nabati. Hal ini dikarenakan air kelapa mengandung asam lemak yang dapat menghasilkan surfaktan alami yang berperan sebagai pelarut dalam pembuatan produk SL. Selain itu, air kelapa juga mengandung senyawa aktif seperti asam laurat dan kaprat yang dapat meningkatkan stabilitas oksidatif

dari produk SL (Rachmawati dkk., 2019). Struktur dasar senyawa kurkuma laurat dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Struktur Asam Laurat (Ulfi, 2021).

## 2.2 Isolasi Bakteri

Mikroorganisme dalam lingkungan alami menggambarkan populasi yang beragam, termasuk mikroorganisme yang ada di dalam tanah, air, udara, makanan, serta yang bersimbiosis dengan hewan dan tumbuhan. Suatu jenis mikroorganisme dapat diketahui melalui aspek-aspek seperti karakteristik kultur, morfologi, fisiologi, serta sifat-sifatnya, dengan dilakukannya suatu teknik yang disebut isolasi (Sabbathini dan Pujiyanto, 2017). Menurut (Singleton and Sainsbury, 2006), isolasi bakteri merupakan suatu proses yang melibatkan pengambilan bakteri dari sumbernya, lalu menumbuhkannya dalam medium buatan untuk memperoleh populasi bakteri yang terpisah dan murni. Metode isolasi yang umum digunakan yaitu dengan metode cawan gores dan metode cawan tuang.

Metode-metode tersebut didasarkan pada prinsip pengenceran dengan tujuan untuk memperoleh populasi mikroba tunggal, sehingga setiap koloni dapat diidentifikasi sebagai spesies individu (Sabbathini dan Pujiyanto, 2017). Adapun media kultur isolasi yang umum digunakan untuk bakteri yaitu media *Nutrient Agar* (NA) (Napitupulu *et al.*, 2019). Metode cawan tuang dan cawan gores dalam media agar dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Metode (a) Cawan Tuang (Cooper, 2020) (b) Cawan Gores (Tankeshwar, 2023).

### 2.3 Kultivasi

Kultivasi merupakan tahap penting dalam laboratorium di mana mikroorganisme bakteri diperbanyak dan dibudayakan dalam lingkungan yang terkendali, seperti media pertumbuhan yang tepat. Tujuan utama dari proses kultivasi yaitu untuk menghasilkan senyawa kimia yang dihasilkan selama pertumbuhan bakteri, yang disebut dengan metabolit sekunder (Madigan *et al.*, 2017). Menurut Prescott *et al.* (2020), media pertumbuhan yang digunakan dalam kultivasi memiliki peran kunci dalam mendukung pertumbuhan dan perkembangan bakteri. Media *Nutrient Broth* (NB) mengandung sumber karbon dan nitrogen termasuk media yang umum digunakan untuk kultivasi. Media NB dirancang dengan menggunakan sumber karbon dan nitrogen untuk memastikan pemenuhan kebutuhan nutrisi bakteri. Komposisi yang terkandung di dalamnya meliputi *beef extract* sebagai sumber karbon dan pepton sebagai sumber nitrogen (Wahyuningsih dan Zulaikha, 2019).

Pada penelitian ini dilakukan kultivasi isolat bakteri yang diperoleh dari produk *soluble liquid* pada media NB selama 72 jam dalam keadaan aseptik pada suhu 37°C. Media NB dipilih karena memiliki kandungan karbon dan pepton yang dapat memenuhi kebutuhan nutrisi bakteri. Menurut Sari dkk. (2017), media NB terbukti baik untuk pertumbuhan bakteri dalam proses kultivasi.

### 2.4 Ekstraksi Senyawa Metabolit

Ekstraksi adalah metode yang digunakan untuk mengisolasi komponen khusus dalam sebuah campuran dengan memanfaatkan pelarut tertentu. Ekstraksi umumnya digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa tertentu dari sumber alam atau campuran kompleks. Prinsip dasar ekstraksi didasari oleh perbedaan tingkat kelarutan pada suatu senyawa dalam pelarut jenis tertentu. Oleh karena itu, dengan penggunaan pelarut yang tepat, melalui proses ekstraksi dapat menghasilkan senyawa yang diinginkan dari campuran (Smith *and* Brown, 2018). Hal-hal yang diperhatikan dalam pemilihan pelarut diantaranya adalah selektivitas, toksisitas, kepolaran, kemudahan untuk diuapkan, dan harga pelarut (Akbar, 2010). Etil asetat adalah salah satu pelarut yang umum digunakan dalam

ekstraksi cair, terutama dalam ekstraksi senyawa organik dari sampel hasil kultivasi. Etil asetat biasa digunakan karena memiliki kelarutan yang baik untuk senyawa organik polar maupun non polar (Putri dkk., 2013).

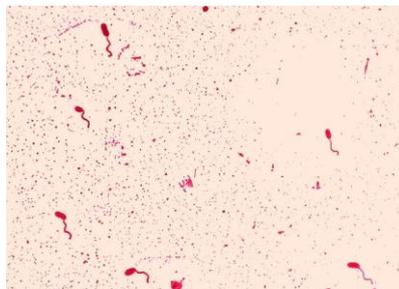
Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi partisi menggunakan pelarut etil asetat. Metode ini menjadi pilihan yang baik karena kelarutan yang baik untuk senyawa organik, kemudahan penggunaan, dan kemampuan pemisahan yang efisien, sehingga dapat memisahkan berbagai senyawa metabolit sekunder dari sampel yang kompleks (Bouarab-Chibane, 2020).

## 2.5 Bakteri Uji

Bakteri uji adalah suatu mikroorganisme yang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dan pertumbuhan bakteri. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian berfokus pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus*.

### 2.5.1 Aktivitas *Vibrio parahaemolyticus*

*Vibrio* merupakan bakteri akuatik yang dapat ditemukan di sungai, muara sungai, kolam, dan laut. Salah satu jenis bakteri dari marga *Vibrio* yang hidup di laut dan termasuk bakteri patogen yang berbahaya bagi kesehatan manusia adalah *Vibrio parahaemolyticus*. Bakteri ini adalah jenis bakteri yang hidupnya di laut, memiliki daya tahan terhadap salinitas cukup tinggi. Oleh sebab itu, bakteri patogen ini dapat mencemari pangan hasil laut (Liston, 1989). Hasil pewarnaan gram bakteri *V. parahaemolyticus* secara mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Pewarnaan Gram *Vibrio parahaemolyticus* (Boucher, 2016).

*Vibrio* merupakan genus bakteri Gram-negatif berbentuk batang yang sering ditemukan di lingkungan air seperti laut, sungai, dan rawa-rawa. Beberapa spesies *Vibrio* di antaranya dapat menyebabkan infeksi pada manusia dan hewan. Aktivitas *Vibrio* dapat diukur melalui berbagai metode seperti pengamatan pertumbuhan bakteri, produksi enzim, dan analisis genetik. Aktivitas *Vibrio* dapat meningkat di perairan yang tercemar oleh limbah organik dan mikroba patogen lainnya. Hal ini berdampak pada meningkatnya potensi penularan penyakit melalui kontak dengan air atau konsumsi ikan yang tercemar. Selain itu, peningkatan suhu air dan kadar garam juga dapat meningkatkan aktivitas *Vibrio* (Diah dkk., 2016).

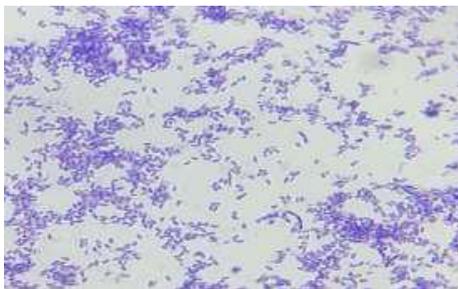
*Vibrio* dapat tumbuh dan berkembang biak pada suhu yang tinggi dan membutuhkan oksigen untuk metabolismenya. *Vibrio* juga dikenal sebagai penyebab utama dari berbagai jenis penyakit pada ikan dan hewan laut. *Vibrio parahaemolyticus* adalah salah satu spesies *Vibrio* yang paling sering ditemukan di perairan laut di Indonesia. Bakteri ini dianggap sebagai patogen utama yang menyebabkan keracunan makanan di seluruh dunia. *V. parahaemolyticus* menghasilkan berbagai macam toksin yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia yang memakan makanan laut yang terkontaminasi oleh bakteri *Vibrio* (Azmi *et al.*, 2018).

### **2.5.2 Bakteri Pengendali *Vibrio***

Pengendalian bakteri memiliki peran penting dalam industri dan produksi pangan, obat-obatan, kosmetika, dan lain-lain. Pengendalian bakteri bertujuan pada pengendalian mikroorganisme antara lain mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme yang sering sebagai bakteri kontaminan, mencegah pembusukan dan perusakan bahan oleh mikroorganisme (Lestari, 2018).

Pengendali *Vibrio* adalah substansi atau suatu agen yang digunakan untuk mengontrol pertumbuhan dan penyebaran bakteri *Vibrio*. Pengendali *Vibrio* biasanya digunakan dalam industri perikanan dan akuakultur untuk mencegah dan

mengendalikan infeksi *Vibrio* pada ikan dan udang. Beberapa jenis pengendali *Vibrio* yang umum digunakan meliputi probiotik, antibakteri, dan senyawa kimia seperti formalin (FAO, 2019). Hasil pewarnaan gram bakteri *Bacillus subtilis* secara mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Bakteri *Bacillus subtilis* (Purwaningsih dan Destik, 2021).

Prayitno *et al.* (2019), mengemukakan bahwa bakteri golongan *Bacillus* dan *Vibrio* yang bersifat Gram-positif dapat dijadikan sebagai bakteri pengendali *Vibrio* dalam menghambat pertumbuhan *Vibrio harveyi* yang ditemukan pada sedimen perairan dan rumput laut di Pantai Tuban, Jawa Timur.

## 2.6 Kromatografi

Kromatografi didasari pada prinsip partisi diferensial antara fase diam (padatan atau cairan yang didukung pada padatan) dan fase gerak (cair atau gas). Fase diam yang digunakan dari lapisan tipis adsorben, seperti silika gel, alumina, atau selulosa pada substrat inert. Faktor yang efektif dalam proses pemisahan ini meliputi karakterisasi molekuler yang berkaitan dengan absorpsi, partisi, dan afinitas atau perbedaan berat molekulnya. Tujuan penerapan kromatografi adalah untuk mencapai pemisahan yang sempurna dalam selang waktu yang sesuai. Berbagai metode pada kromatografi, melingkupi kromatografi kolom, Kromatografi Lapis Tipis (KLT), kromatografi kertas, kromatografi penukar ion, kromatografi permeasi gel, Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT), dan kromatografi gas (Coskun, 2016). Pemisahan komponen senyawa pada penelitian ini menggunakan teknik dan kromatografi kolom dan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

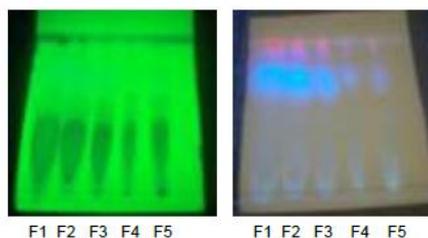
### 2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara tepat dan sederhana.

Pemisahan yang terjadi pada KLT berdasarkan pada adsorpsi, partisi atau kombinasi kedua efek, tergantung pada jenis lempeng, fase diam dan gerak yang digunakan. Pada umumnya, KLT lebih banyak digunakan untuk tujuan identifikasi karena cara ini sederhana dan mudah, serta memberikan pilihan fase gerak yang lebih beragam. Kegunaan dari KLT adalah untuk analisis kuantitatif dan isolasi skala preparan. Lempeng kaca atau aluminium digunakan sebagai penunjang fase diam. Fase gerak akan merayap sepanjang fase diam dan akan terbentuk kromatogram, yang dikenal juga sebagai kromatografi kolom terbuka (Hujjatusnaini dkk., 2021).

Dalam pemisahan senyawa metabolit sekunder, diperlukan penggunaan fase diam seperti silika gel atau  $C_{18}$  yang memiliki karakteristik yang berbeda-beda dalam hal pelarutnya. Ketika menganalisis dengan menggunakan  $SiO_2$ , pelarut yang digunakan bersifat non polar seperti *n*-Heksana, sedangkan analisis dengan menggunakan plat  $C_{18}$ , pelarut yang digunakan bersifat polar seperti metanol. Pada metode KLT, pelarut bergerak ke atas piring tipis secara kapiler, dengan kecepatan elusi dari setiap komponen senyawa. Hal tersebut bergantung pada polaritasnya, jenis fase diam yang digunakan, serta sifat polaritas dari pelarut yang berperan sebagai fase gerak (Rachmadi, 2022).

Anwar dkk. (2017) telah berhasil melakukan pemisahan KLT dengan fase gerak kloroform:metanol dengan perbandingan 6:5. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan fase gerak tersebut memungkinkan untuk mendeteksi kandungan metabolit seperti senyawa fenolik, flavonoid, dan komponen lainnya dalam ekstrak uji. Selain itu, metode KLT ini juga memungkinkan untuk menentukan ekstrak terbaik dari beberapa ekstrak yang diuji. Hasil KLT fase gerak kloroform:metanol dapat dilihat pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Hasil KLT Fase Gerak Kloroform:Metanol (Anwar dkk., 2017).

KLT memiliki peran penting dalam menetapkan metode pemisahan untuk menganalisis berbagai sampel. Keunggulan utama KLT adalah kemampuannya untuk analisis tanpa memerlukan peralatan analitik yang kompleks dan mahal. Selain itu, metode ini memungkinkan analisis beberapa sampel secara simultan dan menawarkan berbagai pilihan metode deteksi, seperti menggunakan sinar UV atau reaksi kimia yang menghasilkan titik-titik atau bercak berwarna. Identifikasi pola bercak setelah KLT dapat diketahui melalui nilai *Retention Factor* ( $R_f$ ) yang dapat dihitung menggunakan persamaan berikut:

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

Nilai  $R_f$  dihitung dari titik pusat dan mencakup kisaran nilai antara 0 hingga 1,00 atau dapat juga dinyatakan dalam bentuk persentase, yang artinya mencakup seluruh skala dari 0 hingga 100 (Kalász *et al.*, 2020).

### 2.6.2 Kromatografi Kolom

Pemisahan dengan kromatografi kolom didasarkan pada mekanisme adsorpsi dan partisi. Proses adsorpsi melibatkan beberapa interaksi yakni ikatan hidrogen, gaya van der Waals, gaya dipol-dipol, interaksi ionik, dan filtrasi atau permiasi antara senyawa-senyawa dalam campuran dengan fase diam. Senyawa yang dapat berinteraksi dengan fase diam akan teretensi, sedangkan senyawa yang tidak dapat berinteraksi dengan fase diam akan bergerak mengikuti fase gerak dan elusi terlebih dahulu. Hasil pemisahan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi ketika keluar dari kolom (Leba, 2017). Kromatografi kolom biasanya digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa dalam jumlah relatif banyak, tergantung

pada diameter dan panjang kolom yang digunakan. Hal yang mempengaruhi keberhasilan pemisahan dengan menggunakan kromatografi kolom adalah pemilihan adsorben dan eluen atau pelarut, dimensi kolom yang digunakan serta kecepatan elusi yang dilakukan (Hujjatusnaini dkk., 2021). Pemisahan campuran senyawa menggunakan instrumen kromatografi kolom dapat dilihat pada Gambar 9.



**Gambar 9.** Kromatografi Kolom (Sinhyu, 2018).

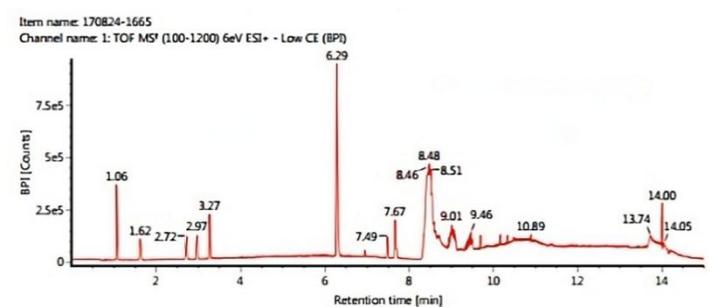
Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Agustini dkk. (2017), dalam fraksinasi dengan kromatografi kolom dapat menggunakan fase gerak diklorometan:etil asetat dengan perbandingan 1:1 dan fase diam silika gel G<sub>60</sub>. Hasil yang didapatkan dengan menggunakan fase gerak dan diam tersebut, fraksi yang didapatkan dapat memberikan zona hambat yang besar dan berpotensi sebagai antibakteri.

## **2.7 Karakterisasi Struktur Senyawa**

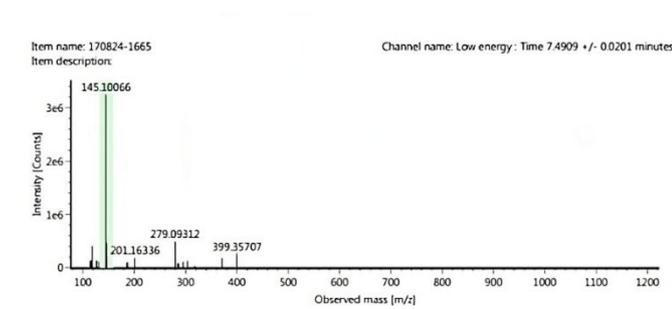
Karakterisasi struktur senyawa umumnya dilakukan dengan tujuan mengidentifikasi komponen serta menentukan struktur molekul yang terdapat dalam suatu sampel. Salah satu karakterisasi yang dapat menentukan struktur senyawa adalah karakterisasi menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS).

### 2.7.1 Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS/MS)

Menurut Mukherjee (2019), *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS) adalah teknik analitik yang kuat yang digunakan untuk pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi senyawa yang tidak diketahui dan diketahui serta untuk menjelaskan struktur dan sifat kimia dari molekul yang berbeda. Metode analisis ini sangat berguna untuk menganalisis molekul kecil dan menawarkan sensitivitas dan selektivitas yang lebih tinggi dalam analisis jejak zat yang mengandung banyak komponen. Prinsip LC-MS/MS didasarkan pada penggunaan dua spektrometer massa bersama-sama untuk menganalisis campuran sampel. Metode ini menggunakan dua penganalisis massa yang disusun secara berurutan dengan sel kolision (*collision cell*) di antara keduanya. Penganalisis massa digunakan untuk memilih rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ) tertentu. Penganalisis massa pertama menganalisis rasio  $m/z$  dari ion induk, kemudian pada sel kolision ion induk bertabrakan dengan molekul gas dan terfragmentasi menjadi ion yang lebih kecil dan diperoleh rasio  $m/z$  pada penganalisa masa kedua sebagai ion produk (Harmita dkk., 2019). Salah satu contoh hasil LC-MS/MS dapat dilihat pada Gambar 10 dan Gambar 11.



**Gambar 10.** Hasil LC-MS/MS (Fauzia dkk., 2018).



**Gambar 11.** Spektrogram Massa Isolat pada Retensi 7,49 menit (Fauzia dkk., 2018).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Fauzia dkk. (2018), LC-MS/MS digunakan untuk mengidentifikasi perkiraan jenis serta struktur senyawa yang terdapat pada suatu sampel yang ditunjukkan pada Gambar 10 dan Gambar 11. Berdasarkan kromatogram, diketahui terdapat 7 puncak dengan intensitas yang tinggi. Salah satu puncak memiliki waktu retensi 7,49 menit yang menunjukkan adanya keberadaan senyawa steroid. Spektrogram dengan waktu retensi tersebut, terdeteksi ion molekuler dengan massa sebesar 399 m/z, yang mengidentifikasi berat molekul sekitar 398 g/mol. Menurut hasil yang didapatkan, dapat disimpulkan kromatogram LC-MS/MS dapat mengidentifikasi suatu senyawa isolat, di mana senyawa yang dihasilkan adalah senyawa golongan steroid yaitu *Brassicasterol*.

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Mei 2024. Analisis instrumen *Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal POLRI, Bogor., dan *Scanning Electron Microscope* (SEM) di UPT LTSIT Universitas Lampung.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah gelas kimia, pipet tetes, tabung reaksi, Erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, vial, *Eppendorf tube*, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, *cutter*, jarum ose, oven, plastik tahan panas, lampu spiritus, *hot plate*, spatula logam, *vortex*, autoklaf Tomy SX-700, neraca analitik *Wiggen Houser*, kaca objek, *magnetik stirer*, *aluminium foil*, *rotary evaporator* Buchii/R-210, *laminar air flow* ESCO, *waterbath* Julabo SW200, inkubator Memmert-Germany/INC-02, mikroskop *Axioo Zeiss Imager A1*, perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang terdiri dari plat silika *aluminium silica gel F254* (Merck), lampu UV SN402006, kromatografi kolom, *ring* sumuran, *Scanning Electron Microscope* (SEM) EVO with 10 kV *electron high voltage*, Carl Zeiss EVO MA 10, Oberkochen, Germany., dan *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS/MS) ACQUITY UPLC® *H-Class System* (Waters, Beverly, MA, USA), ACQUITY UPLC® HSS

C18 column (1.8  $\mu\text{m}$  2.1  $\times$  100 mm) (Waters, Beverly, MA, USA), dan Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (Waters, Beverly, MA, USA).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk *Soluble Liquid* (SL), akuades, *Nutrient Agar* (NA) (HIMEDIA), *Tryptose Soy Agar* (TSA) (OXOID), *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) (Merck), etanol 70%, *Nutrient Broth* (NB) (HIMEDIA), Etil asetat (EtOAc), *n*-Heksana, metanol, *Mueller Hinton Agar* (MHA) (HIMEDIA), bakteri *Vibrio parahaemolyticus* (UPT LTSIT Unila), *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose* (TCBS) (Merck), iodin, safranin fuchsin, kristal violet, minyak emersi, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi Serium(IV)sulfat, pereaksi Ninhidrin, silika gel, kloramfenikol, metanol 12,5%, *plastic wrap*, tisu, kapas, dan kasa.

### 3.3 Prosedur Kerja

Adapun prosedur kerja yang dilakukan dalam penelitian ini sebagai berikut.

#### 3.3.1 Pembuatan Media

*Tryptose Soy Agar* (TSA) digunakan sebagai media untuk isolasi dan peremajaan bakteri. TSA sebanyak 4,5 g dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan memadat (Maryani dkk., 2021).

*de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA) digunakan sebagai media selektif untuk isolasi bakteri. MRSA sebanyak 6,82 g dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 20 mL dan dibiarkan memadat (Pratiwi dkk., 2022).

*Nutrient Broth* (NB) digunakan sebagai media pertumbuhan untuk kultivasi bakteri. NB sebanyak 150 g dilarutkan dengan 1000 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilisasi dalam

autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah steril, NB disimpan dalam oven dan siap untuk digunakan (Sari dkk., 2017).

*Mueller Hinton Agar* (MHA) digunakan sebagai media padat untuk uji antibakteri. MHA sebanyak 3,8 g dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL dan dibiarkan memadat (Suryatman dan Achmad, 2022).

*Mueller Hinton Broth* (MHB) digunakan sebagai media inokulum untuk uji antibakteri. MHB sebanyak 2,1 g dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Setelah steril, NB disimpan dalam oven dan siap untuk digunakan (Setyaningsih dkk., 2012).

*Thiosulfate Citrate Bile Salt* (TCBS) digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri selektif bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. TCBS sebanyak 4,45 g dilarutkan dengan 100 mL akuades dan dihomogenkan hingga media larut sempurna, selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 15 mL dan dibiarkan memadat (Suryatman dan Achmad, 2022).

### **3.3.2 Isolasi Bakteri dari Soluble Liquid**

Produk pupuk cair *Soluble Liquid* (SL) diperoleh dari Bahri dkk. (2023). Isolasi bakteri dari sampel produk SL dilakukan dengan metode cawan sebar (*spread plate*) menggunakan variasi media *Tryptose Soy Agar* (TSA) dan *de Man Rogosa Sharpe Agar* (MRSA). 1 mL sampel produk *soluble liquid* dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL akuades, sehingga diperoleh pengenceran  $10^{-1}$ . Selanjutnya dilakukan pengenceran berseri hingga pengenceran  $10^{-7}$ . Sebanyak 1 mL sampel dari pengenceran  $10^{-7}$  diambil dan dituang pada masing-masing media TSA dan MRSA yang telah memadat. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 27 °C. Koloni yang didapatkan dari hasil isolasi selanjutnya dilakukan

penggoresan kembali pada media TSA. Setelah mendapatkan isolat yang diinginkan, isolat dikarakterisasi secara makroskopik dan mikroskopik (Ratih dkk., 2021).

### **3.3.3 Identifikasi Morfologi Bakteri**

Identifikasi morfologi meliputi identifikasi makroskopik dan mikroskopik. Identifikasi makroskopik dilakukan dengan pengamatan visual isolat yang tumbuh pada media agar. Pengamatan ini meliputi warna, bentuk, tepian, dan elevasi yang terlihat pada koloni bakteri yang ditumbuhkan (Kurnia dkk., 2020). Identifikasi mikroskopik dilakukan dengan teknik pewarnaan gram. Isolat terpilih dari media agar diambil satu ose dan diulas pada kaca objek, lalu difiksasi di atas api bunsen. Preparat yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan larutan kristal ungu dan didiamkan selama satu menit. Selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan larutan iodin dan didiamkan selama dua menit. Kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Ditetesi dengan etanol 70% hingga warna ungu sebelumnya hilang. Preparat ditetesi dengan safranin sebanyak tiga tetes dan didiamkan selama satu menit. Selanjutnya dicuci dengan akuades dan dikeringkan. Preparat ditetesi dengan minyak emersi. Kemudian diamati dengan mikroskop, hasil akhir akan terlihat sebagai uji Gram-positif jika sel berwarna ungu dan Gram-negatif jika sel berwarna merah (Remijawa dkk., 2020).

### **3.3.4 Kultivasi Bakteri**

Kultivasi bakteri dilakukan dalam media *Nutrient Broth* (NB) sebanyak 150 mL dalam Erlenmeyer 1000 mL. Isolat bakteri yang murni dari hasil regenerasi diinokulasi ke dalam media NB. Kemudian diinkubasi dengan *Incubator Shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 72 jam (Sari dkk., 2017). Hasil kultur bakteri selanjutnya ditampung dan dipersiapkan untuk dilakukan ekstraksi senyawa metabolit.

### 3.3.5 Ekstraksi Senyawa Metabolit

Hasil kultivasi yang didapatkan selanjutnya diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah dan pelarut etil asetat (EtOAc). Proses ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 1:1 v/v dan diaduk selama 5 menit. Setelah itu dibiarkan hingga terbentuk dua lapisan, yakni EtOAc di bagian atas dan air di bagian bawah. Lapisan EtOAc dipindahkan ke dalam wadah baru, sementara itu lapisan air yang berada di bawah ditambahkan kembali dengan etil asetat 1:1 v/v sebagai pengulangan. Lapisan EtOAc selanjutnya diuapkan dengan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kasar EtOAc (Jasmiadi dkk., 2023). Ekstrak kasar yang didapatkan digunakan untuk uji kromatografi lapis tipis dan uji skrining aktivitas antibakteri terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*.

### 3.3.6 Kromatografi Lapis Tipis

Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mencari eluen terbaik dari beberapa eluen yang akan digunakan untuk mengetahui pola kromatogram yang dihasilkan dari pemisahan senyawa yang terdapat pada sampel. KLT digunakan untuk mengamati pola kromatogram yang timbul dari pemisahan senyawa dalam sampel. Ekstrak kasar kemudian dianalisis dengan KLT, menggunakan plat silika gel 60 F<sub>254</sub>. Sebagai pelarut, digunakan campuran *n*-Heksana dan etil asetat (EtOAc) dengan perbandingan 7:3. Selanjutnya noda pada KLT dapat diamati di bawah sinar UV 254 nm. Langkah berikutnya adalah visualisasi tambahan dengan menggunakan reagen serium sulfat, reagen *Dragendorff*, dan pereaksi ninhidrin untuk menampilkan noda hasil KLT. Serium sulfat digunakan untuk mendeteksi senyawa organik biasanya menandakan adanya senyawa dengan gugus hidroksil (OH) dalam sampel dengan munculnya noda berwarna coklat kehitaman. *Dragendorff* digunakan untuk mendeteksi senyawa dengan gugus amina yang terbentuknya noda berwarna oranye dalam KLT. Pereaksi ninhidrin digunakan untuk mendeteksi adanya peptida dengan munculnya noda gelap. Terakhir, plat KLT diamati dan nilai R<sub>f</sub> digunakan untuk menilai tingkat kepolaran masing-masing komponen (Rachmadi, 2022).

### 3.3.7 Uji Skrining Aktivitas Antibakteri

Uji skrining aktivitas antibakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak kasar senyawa metabolit sebagai antibakteri. Bahan uji yang digunakan adalah bakteri *V. parahaemolyticus*. Kultur murni bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan regenerasi dalam media *Thiosulfate Citrate Bile Salt* (TCBS), sebanyak 100 µL suspensi bakteri dimasukkan ke dalam cawan petri dan dituangkan media TCBS. Biakan *V. parahaemolyticus* yang telah diinkubasi selanjutnya disubkultur pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 12 jam. Selanjutnya bakteri diinokulasikan ke dalam media 5 mL *Mueller Hinton Broth* (MHB) untuk inokulum sebagai bahan pengujian (Suryatman dan Achmad, 2022).

Proses pengujian ekstrak kasar dilakukan menggunakan media MHA dengan metode difusi agar *ring* sumuran terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Media MHA padat ditambahkan dengan inokulum bakteri *V. parahaemolyticus* dengan cara dioleskan menggunakan *cottonbud* ke permukaan media MHA hingga merata. Media MHA selanjutnya dimasukkan *ring* sumuran 5 mm. Pengujian antibakteri dilakukan menggunakan masing-masing sebanyak 100 µL ekstrak kasar, kloramfenikol sebagai kontrol positif, dan metanol 12,5% sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Kemudian diinkubasi pada suhu 30 °C selama 15–18 jam. Lalu dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk di sekitar sumur (Setyaningsih dkk., 2012).

### 3.3.8 Kultivasi Bakteri (*Scale Up*) dan Ekstraksi

Isolat unggul yang diperoleh dari hasil uji skrining selanjutnya dilakukan kultivasi skala besar. Kultivasi skala besar menggunakan media *Nutrient Broth* (NB) untuk menumbuhkan bakteri yang memiliki potensi biomassa unggul. Kultivasi dilakukan dengan menggunakan Erlenmeyer 1000 mL yang diisi sebanyak 1/6 bagian. Inokulum bakteri dimasukkan ke dalam media NB. Kultur kemudian diinkubasi selama tiga hari pada suhu 37°C dalam kondisi statis (Suwariani, 2016). Hasil inkubasi proses kultur selanjutnya diekstraksi dengan etil asetat (EtOAc). Ekstrak yang dihasilkan dipartisi dan digabungkan. Filtrat kemudian

dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak kasar EtOAc (Jasmiadi dkk., 2023).

### **3.3.9 Fraksinasi dengan Kromatografi Kolom**

Ekstrak yang diperoleh dari hasil kultur skala besar dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan jenis dan rasio elusi yang berbeda dalam menentukan jenis pelarut dan rasio yang sesuai untuk fraksinasi kromatografi kolom. Fraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel ( $\text{SiO}_2$ ) yang dihidrasi dengan pelarut *n*-Heksana. Elusi dimulai dengan 100% pelarut *n*-Heksana, *n*-Heksana : Etil asetat (9:1), *n*-Heksana : Etil asetat (7:3) dan diakhiri dengan metanol. Hasil fraksinasi kemudian diolah dalam KLT menggunakan eluen yang sesuai. Fraksi dengan aktivitas tertinggi dimurnikan hingga muncul noda tunggal pada KLT. Senyawa murni (noda tunggal) yang diperoleh dapat dilanjutkan ke tahap karakterisasi (Prasetya, 2022).

### **3.3.10 Karakterisasi Senyawa**

Ekstrak dengan aktivitas hambatan pada bakteri *V. parahaemolyticus* selanjutnya dianalisis menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS).

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Adapun simpulan dari penelitian yang telah dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Telah diperoleh karakteristik morfologi isolat bakteri dari produk pupuk cair *Soluble Liquid (SL)* secara makroskopik berwarna krem, berbentuk bulat, tepian rata, dan memiliki elevasi cembung, sedangkan secara mikroskopik berwarna ungu dan berbentuk batang yang diduga sebagai bakteri *Lactobacillus sp.*
2. Skrining antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak kasar isolat YSL-1 memiliki aktivitas antibakteri sebesar 8 mm dan ekstrak fraksi YSL-1K1F3 memiliki aktivitas antibakteri 12 mm terhadap *V. parahemolyticus*.
3. Hasil analisis LC-MS/MS sampel YSL-1K2F1 pada waktu retensi 17,97 menit dengan puncak dasar 441.2988 m/z memiliki perkiraan molekul  $C_{28}H_{40}O_4$  dan perkiraan senyawa 2-[(4E, 7E, 10Z, 13E, 16E, 19E)-docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoyl]-4-hydroxycyclopentane-1-carboxylic acid yang terindikasi sebagai senyawa turunan *Docosahexaenoic Acid (DHA)*.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh, isolat *Lactobacillus sp.* (YSL-1) dapat dilanjutkan uji bakteri asam laktat, analisis filogenetik dan molekuler, serta dilakukan pengamatan senyawa metabolit yang dihasilkan berdasarkan interval waktu pengamatan selama kultivasi bakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, N., Riaz, S., Mazhar, S., Essa, R., Maryam, M., Saleem, Y., Quratulain, S., Ishrat, P., Bakhtawar, B., Saira, A., and Abidi, S. H. I. 2023. Microbial production of docosahexaenoic acid (DHA): biosynthetic pathways, physical parameter optimization, and health benefits. *Archives Microbiology*. **205**(9): 321.
- Abdel-Tawwab, M., Khalil, R. H., Nour, A.M., Elkhayat, B.K., Khalifa, E., and Abdel-Latif, H. M. R. 2020. Effects of *bacillus subtilis*-fermented rice bran on water quality, performance, antioxidants/oxidants, and immunity biomarkers of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) reared at different salinities with zero water exchange. *Journal Application*. **34**(1): 1-26.
- Adawiyah, A., Indah, A., Fadhil, R., Ferdian, S., dan Virdha, S. 2021. Pengaruh penggunaan sabut kelapa terhadap pengelolaan limbah cair rumah makan. Prosiding SEMNAS BIO. **1**(2): 1355-1359.
- Agustini, N. W. S., Kusmiati., dan Handayani, D. 2017. Aktivitas Antibakteri dan Identifikasi Senyawa Kimia Asam Lemak dari Mikroalga *Lyngbbya* sp. *Biopropal Industri*. **8**(2): 99-107.
- Ahmad, Islamudin., Muhammad, Arifuddin., and Laode, Rijai. 2016. The effect of extraction methods of bawang dayak (*Eleutherine Palmifolial*. MERR) against TLC profiles and sunscreen activities. *International Journal of PharmTech Research*. **9**(9): 428-436.
- Akbar, H. R. 2010. Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dandang Gendis (*Clinacanthus nutans*) Berpotensi sebagai Antioksidan. (Skripsi). Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Anwar, H. U., Andarwulan, N., dan Yuliana, N. D. 2017. Identifikasi komponen antibakteri pada ekstrak buah takokak menggunakan kromatografi lapis tipis. *Jurnal Mutu Pangan*. **4**(2): 59-64.
- Asmat, A., Mohsin, M., Khan, S. A., and Choudhary, M. I. 2016. Isolation of potential probiotics from the gut of *labeo rohita* and their antagonistic

effect against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio harveyi*. *Microbial Pathogenesis*. **97**: 38-43.

Astuti, P., Pratoko, D. K., Rollando, R., Nugroho, G. W., Wahyuono, S., Hertiani, T., dan Nurrochmad, A. 2021. Bioactivities of a major compound from *Arthrinium rasikravindrae* an endophytic fungus of *Coleus amboinicus* Lour. *Fabad Journal of Pharmaceutical Sciences*. **46**(1): 23-30.

Aýun, Q., Muthiáh, S. N., dan Sukmalara, D. 2023. Potensi bakteri asam laktat (BAL) dari jus tempe sebagai kandidat probiotik. *Jurnal Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi*. **8**(2): 171-177.

Azmi, M. A. F., Hasan, H. A., and Arifin, K. M. 2018. The distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Indonesian coastal waters. *AAFL Bioflux*. **11**(5): 1547-1556.

Badaring, D.R., M. Fiqriansyah, W., dan Arsad, B. 2020. *Identifikasi Morfologi Mikroba pada Ruangan Water Closet Jurusan Biologi Universitas Negeri Makassar*. Prosiding Seminar Nasional Biologi FMIPA UNM. Program Studi Biologi, Universitas Negeri Makassar. Makassar.

Bahri, S., Hendri, J., Laila, A., Satria, H. dan Ambarwati, Y. 2023. Konversi sampah organik di lingkungan Fmipa universitas lampung menjadi pupuk organik cair dengan teknik *soluble liquid*. *Jurnal Abdi Insani*. **10**(3): 1786-1792.

Baker, A. C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., and Martinez-Urtaza, J. 2018. *Vibrio* Spp. Infections. *Nature Reviews Disease Primers*. **4**(1): 1-19.

Bhati, R., Bhargava, R., and Gaur, R. 2017. Production and evaluation of soluble liquid fertilizer from hydrolyzed chicken feather keratin. *Journal of Plant Nutrition*. **40**(10): 1453-1463.

Bouarab-Chibane, L. 2020. Isolation and characterization of bioactive compounds from *Origanum glandulosum* Desf. using conventional and ultrasound-assisted extraction: their antioxidant and antibacterial activity. *Industrial Crops and Products*. **152**: 112497.

Boucher, L. 2016. *Vibrio parahaemolyticus* Gram Stain. Tyrrell Conway. University of Oklahoma. United States.

Cimermancic, P., Medema, M. H., Claesen, J., Kurita, K., Brown, L. C. W., Mavrommatis, K., and Fischbach, M. A. 2014. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell*. **158**(2): 412-421.

- Chandrakala, N. and Priya, S., 2017. Vibriosis In Shrimp Aquaculture A Review. *International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology*. **3**(2): 27-33.
- Chatterjee, S., and Haldar, S. 2012. *Vibrio* Related Diseases In Aquaculture and Development of Rapid and Accurate Identification Methods. *Journal Marine Science Research Development*. **1**: 1-7.
- Chen, Z., and Chen, Q. 2016. Review on the application of vegetable oils and their derivatives as cutting fluids in machining processes. *Journal of Materials Processing Technology*. **229**: 330-340.
- Cooper, C. R. 2020. *Determination of bacterial numbers*. Microbiology Laboratory. 1-8.
- Coskun, Ozlem. 2016. Separation techniques: chromatography. *Invited Review Biochemistry*. **3**(2) : 156-160.
- Darmawan, B. A., dan Elviantari, A. 2024. Isolasi Bakteri dari Insang Lobster Air Laut dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *SATONDA: Journal of Tropical Bioresources and Biotechnology*. **1**(1): 1-7.
- De S. V. C., and Wan, A.H.L. 2021. *Vibrio* and Major Commercially Important Vibriosis Diseases In Decapod Crustaceans. *Journal of Invertebrate Pathology*. **181**: 1-34.
- Dey, M. C., Basu, S., and Sinhababu, A. 2016. Detection of amino acids on TLC plates by a novel spray reagent. *Analytical Chemistry Letters*. **6**(6): 886-893.
- Diah, W., Pringgenies, D., dan Setyawan, E. 2016. Analisis potensi pencemaran dan penyebaran bakteri *Vibrio sp.* di perairan kota tegal. *Jurnal Kelautan Tropis*. **19**(2): 111-120.
- El-Saadony, M.T., Alagawany, M., Patra, A.K., Kar, I., Tiwari, R., Dawood, M.A.O., and Abdel-Latif, H. M. R. 2021. The functionality of probiotics in aquaculture: an overview. *Fish and Shellfish Immunology*. **117**. 36–52.
- FAO. 2019. *FAO Yearbook. Fishery and aquaculture statistic 2012*. Food and Agriculture Organization of the United Nation. Roma. Italy.
- Fauzia, D. V., Dewi, K., dan Enny, F. 2018. Isolasi dan pengujian bakteri dari senyawa steroid diperoleh dari daun anting-anting (*Acalypha indica L.*). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **21**(2): 64-69.
- Feng, S., Liu, H., Liu, Y., Zhang, Y., and Guo, C. 2017. Effect of *Pseudomonas stutzeri* as a probiotic on the growth performance and immunity of *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture*. **475**: 1-8.

- Flegel, T. W. 2012. Historic Emergence, Impact and Current Status of Shrimp Pathogens In Asia. *Journal of Invertebrate Pathology*. **110**. 166–173.
- Forestryana D., dan Arnida. 2020. Phytochemical screenings and thin layer chromatography analysis of ethanol extract jeruju leaf (*Hydrolea spinosa L.*). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*. **11**(2): 113-124.
- Gupta, R. and Sharma, A. 2018. Vegetable oils: nutritional and therapeutic values. *in: gupta, r. (ed.) nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity*. Amsterdam: Elsevier. 137-154.
- Handayani, D., Fithriani, A., dan Rosiana, A. 2020. Ekstraksi minyak ikan tuna (*Thunnus Sp.*) menggunakan pelarut etanol dan *n*-heksana serta aktivitasnya sebagai bahan kosmetik. *Jurnal Teknologi Kimia dan Industri*. **9**(2): 92-98.
- Harmita, A. A. K., Yahdiana, H., dan Supandi. 2019. *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. ISFI Penerbitan. Jakarta.
- Hasan, O. D. S., Madihahrahma, N. R., Mulyono, M., dan Gunadi, B. 2023. Aplikasi probiotik dosis berbeda dalam pakan terhadap pertumbuhan bakteri dalam usus ikan nila srikandi (*Oreochromis aureus X niloticus*). *Jurnal Penyuluhan Perikanan dan Kelautan*. **17**(1): 15-25.
- Hidayatulloh, A., Gumilar, J., dan Harlia, E. 2019. Potensi senyawa metabolit yang dihasilkan *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 sebagai bahan biopreservasi dan anti bakteri pada bahan pangan asal hewan. *Jitp*. **7**(2): 1-6.
- Hidayati, N., Agustini, N. W. S., Apriastini, M., dan Diaudin, D. P. A. 2022. Bioactive compounds from microalgae spirulina platensis as antibacterial candidates against pathogen bacteria. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **25**(2): 41-48.
- Hoseinifar, S.H., Sun, Y.-Z., Wang, A., and Zhou, Z., 2018. probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology*. **9**: 1-18.
- Huang, Q., Wu, Q., Wu, T., Chen, L., and Chen, F. 2021. Effect of coconut water extract on the quality of soluble liquid with *Lactobacillus rhamnosus G*. *Journal of Food Quality*. **56**(4): 1597-1607.
- Huber, D. C., Steixner, S., Wurm, A., and Nogler, M. 2021. Antibacterial and anti-biofilm activity of omega-3 polyunsaturated fatty acids against periprosthetic joint infections-isolated multi-drug resistant strains. *Biomedicines*. **9**(4): 1-15.
- Hujjatusnaini, N., Bunga, I., Emeilia, A., Ratih, W., dan Ardiansyah. 2021. *Buku referensi ekstraksi*. IAIN Palangkaraya. Palangkaraya.
- Iswari, R. S., Amelia, R., dan Zulfiani, D. 2018. Kajian kualitas minyak hewani hasil ekstraksi dari limbah padat rumah potong hewan sapi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **6**(3): 70-79.

- Jarboe, L. R., Royce, L. A., and Liu, P. 2013. Understanding biocatalyst inhibition by carboxylic acids. *Front Microbiol.* **4**(272): 1-8.
- Jasmiadi., Musdalifah., Agus, S. P., dan Niken, A. L. 2023. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri dari bakteri endofit bunga kecombrang (*Etilingera elatior Jack.*) asal kabupaten polewali mandar terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Novem Medika Farmasi.* **1**(3): 31-41.
- Ji, L., Zhang, Y., Song, W., Cai, L., Wang, Y., and Guo, J. 2020. Analysis on antibacterial activities and volatile compounds of maillard reaction products derived from squid skin. *In E3S Web of Conferences.* **145**(01028): 1-6.
- Kalász, H., Báthori, M., and Valkó, K. L. 2020. Basis and pharmaceutical applications of thin-layer chromatography. *handbook of analytical separations.* **10**(8): 523-585.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2019. *Info Datin Situasi Kesehatan DASAR 2018*. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta.
- Kumar, V., and Roy, S. 2017. Aquaculture drugs: sources, active ingredients, pharmaceutic preparations and methods of administration. *Journal Aquaculture Research Development.* **8**. 510.
- Kurnia, M., Hermansyah, A., dan Dewi, H. 2020. Isolasi dan identifikasi bakteri asam laktat dari makanan tradisional suku rejang di Provinsi Bengkulu: "Lemea". *ALOTROP.* **4**(1): 25-32.
- Lagan`a, P., Caruso, G., Minutoli, E., Zacccone, R., and Delia, S. 2011. Susceptibility to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Photobacterium damsela* sp. piscicida strains isolated from italian aquaculture farms. *New Microbiol.* **34**. 53-63.
- Leba, M. A. U. 2017. *Buku Ajar: Ekstraksi dan real kromatografi*. Deepublish. Yogyakarta.
- Leliana, L., Setyaningsih, W., Palma, M., Supriyadi, and Santoso, U. 2022. Antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of coconut (*cocos nucifera*) fruit by-products. *Agronomy.* **12**(5): 1-14.
- Leliana, L., Setyaningsih, W., Palma, M., Supriyadi, S., and Santoso, U. 2022. Optimization of ultrasound-assisted extraction from young coconut mesocarp in the rapid extraction of phenolic compounds and antioxidant activity. *Agronomi.* **12**(11): 1-12.
- Lestari, A., Cepi, K., Yusuf, N. N., Sutikno., dan Mahatmanti, F. W. 2020. Kajian fotostabilitas senyawa kurkumin dengan penambahan ion logam Cu<sup>2+</sup> pada irradiasi sinar UV. *Al-Kimiya.* **7**(2) : 55-61.
- Lestari, P. 2018. Perbedaan Angka Kuman Udara Sebelum dan Sesudah Penyinaran Lampu Ultraviolet 90 Watt di Laboratorium Bakteriologi Jurusan

- Analisis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Yogyakarta. (Skripsi). Politeknik Kesehatan Yogyakarta. Yogyakarta.
- Li, J., Beiping, T., Kangsen, M., Qinhui, A., Wenbing, Z., Zhiguo, L., and Wei, X. 2008. Immune responses and resistance against *Vibrio parahaemolyticus* induced by probiotic bacterium *Arthrobacter* XE-7 in pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of the World Aquaculture*. **39**(4): 477-489.
- Liebert, M. A. 1989. Final report on the safety assessment of ethyl acetate and butyl acetate. *Journal of the American College of Toxicology*. **8**(4): 681-706.
- Liston, J. 1989. *Microbial hazard of seafood consumption food technology*. Anaheim. California.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., and Stahl, D. A. 2017. *Brock biology of microorganisms 15th ed*. Pearson. Boston.
- Maisaroh., Indra, B. S., dan Bayu, R. 2016. Sintesis asam 9,10-Dihidroksi stearat (DHSA) melalui hidrolisa epoksida dari oksidasi asam oleat dengan asam performat. *Reaktor*. **16**(2) : 57-64.
- Maryani, M., Monalisa, S. S. dan Panjaitan, R. S. 2021. Efektivitas ekstrak daun ketapang (*Terminalia catappa*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* pada uji *in vitro*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **10**(2): 196-208.
- Maulida, I. N., and Arifin, A. 2018. Production of soluble liquid fertilizer from palm oil mill effluent (POME) by electrokinetic coagulation process. *In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. IOP Publishing. **115**(1): 012040.
- Mishra, S., and Palanivelu, K. 2017. Therapeutic potential of medicinal plants: a review of their biological activities. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. **11**(1): 1.
- Mohammadi, G., Rafiee, G., Tavabe, K. R., Abdel-Latif, H. M. R., and Dawood, M. A. O. 2021. The enrichment of diet with beneficial bacteria (single- or multi- strain) in biofloc system enhanced the water quality, growth performance, immune responses, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 539. 736640.
- Mukherjee, P. K. 2019. LC–MS: A rapid technique for understanding the plant metabolite analysis. *Quality Control and Evaluation of Herbal Drugs; Elsevier*. 459-479.
- Mulyadi, M., Wuryanti, W., dan Sarjono, P. R. 2017. Konsentrasi hambat minimum (KHM) kadar sampel alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*: **20**(3): 130-135.

- Nafisa, A., and Rizwani, G. H. 2016. Medicinal plants used in the treatment of diabetes mellitus: an overview. *Jurnal Pendidikan Sains Indonesia*. **5**(2): 8-12.
- Nandi, A., Dan, S. K., Banerjee, G., Ghosh, P., Ghosh, K., Ringø, E., and Ray, A. K. 2017. Probiotic potential of autochthonous bacteria isolated from the gastrointestinal tract of four freshwater teleosts. *Probiotics And Antimicrobial Proteins*. **9**(1): 12-21.
- Napitupulu, H. G., Rumengan, I. F., Wullur, S., Ginting, E. L., Rimper, J. R. T. S. L. and Toloh, B. H. 2019. *Bacillus* sp. sebagai agensia pengurai dalam pemeliharaan *Brachionus rotundiformis* yang menggunakan ikan mentah sebagai sumber nutrisi. *Jurnal Ilmiah Platax*. **7**(1): 158-169.
- Nur, T., Noor, A. R. dan Elma, M. 2016. Pembuatan pupuk organik cair dari sampah organik rumah tangga dengan bioaktivator EM4 (*effective microorganisms*). *Konversi*. **5**(2): 5-12.
- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., dan Hidayatulloh, A. 2020. Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*. **1**(2): 41-46.
- Ogawa, T., Hirose, K., Yusuf, Y., Kawamoto, J., and Kurihara, T. 2020. Bioconversion from docosaehexaenoic acid to eicosapentaenoic acid in the marine bacterium *Shewanella livingstonensis* Ac10. *Frontiers in Microbiology*. **11**(541117): 1-12.
- Olasehinde, T. A., Olanrewaju, I. O., and Oyefuga, O. H. 2020. Medicinal plants and their potential therapeutic efficacy against drug-resistant microbial infections. *Biomolecules*. **10**(11): 1489.
- Pariakan, A. dan Rahim, M. 2021. karakteristik kualitas air dan keberadaan bakteri *Vibrio* sp. pada wilayah tambak udang tradisional di pesisir wundulako dan pomala kolaka. *Journal of Fisheries and Marine Research*. **5**(3): 547-556.
- Prasetya, I. 2022. Isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif *Actinomycetes* sedimen mangrove serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Pratiwi, S. T., Sayu, P. Y. P., Elizabeth, N. L. R., dan Panca, A. 2022. Perbandingan efektivitas bakteriosin *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 dengan nisin pada pertumbuhan *Salmonella typhi* ATCC 6539. *Medika Kartika*. **5**(2): 162-174.
- Prayitno, H., Daryono, B. S., and Meryandini, A. 2019. Identification of *Vibrio spp.* and *Bacillus spp.* from tuban coastal waters for biocontrol agents of *Vibrio harveyi*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. **305**(1): 012032.

- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. 2020. *Microbiology*. McGraw-Hill Education.
- Purwaningsih, D., dan Destik, W. 2021. Uji aktivitas antibakteri hasil fermentasi bakteri endofit umbi talas (*Colocasia esculenta L*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. **3**(5): 750-759.
- Putri, A. D., dan Hapsari, A. A. 2019. Kualitas biskuit pada penambahan minyak hewani dengan variasi jenis minyak. *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. **12**(1).
- Putri, W. S., Warditiani, N. K., dan Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining fitokimia ekstrak etil asetat kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Jurnal Farmasi Udayana*. **2**(4): 56-60.
- Rachmadi, L. 2022. Karakterisasi senyawa bioaktif mikroba endofit yang berasosiasi pada tumbuhan mangrove sebagai antibiofilm terhadap bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* resisten. (Skripsi). Universitas Lampung. Bandar Lampung.
- Rachmawati, I. A., Yusriani, Y., dan Setyaningsih, D. 2019. Karakteristik produk soluble liquid dari minyak kelapa dan air kelapa. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. **29**(1): 43-51.
- Ratih., Saida., dan Nontji, M. 2021. Pertumbuhan rhizobakteri asal rhizosfer tanaman jagung (*Zea mays L.*) pada berbagai media organik cair. *AGROTEKMAS*. **2**(2): 1-10.
- Remijawa, E. S., Rupidara, A. D., Ngginak, J., dan Radjasa, O. K. 2020. Isolasi dan seleksi bakteri penghasil enzim ekstraseluler pada tanah mangrove di pantai noelbaki. *Jurnal Enggano*. **5**(2): 164-180.
- Ringø, E. 2020. Probiotics in shellfish aquaculture. *Aquaculture Fisher*. **5**(1): 1-27.
- Ringø, E., Van Doan, H., Lee, S. H., Soltani, M., Hoseinifar, S. H., Harikrishnan, R. and Song, S. K. 2020. Probiotics, lactic acid bacteria and bacilli: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. **129**(1): 116-136.
- Sabbathini, G. C. dan Pujiyanto, S. 2017. Isolasi dan identifikasi bakteri genus *Sphingomonas* dari daun padi (*Oryza sativa*) di area persawahan cibinong. *Jurnal Akademika Biologi*. **6**(1): 59-64.
- Safrida, Y. D., Yulvizar, C., Devira, C. N., dan Metode, B. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri berpotensi probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger sp.*). *Depik Jurnal*. **1**(3): 200–203.
- Sari, R. P., Permanasari, A. A., and Suharjono. 2020. The effect of fermentation on the quality of soluble liquid produced from coconut water. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. **851**(1): 012045.

- Sari, W. L. P., Putra, D. P., dan Handayani, D. 2017. Senyawa antibiotik dari *Bacillus* sp1 (HA1) yang bersimbiosis pada spon laut *Haliclona fascigera*. *Jurnal Sains Farmasi & Klinis*. **3**(2): 128-133.
- Satyajit, D. S., and Nahar, L. 2006. *Natural Products Isolation*. Methods in Biotechnology. Humana Press. New Jersey.
- Setyaningsih, I., Desniar, dan Evi, P. 2012. Antimikroba dari *Chaetoceros gracilis* yang dikultivasi dengan lama penyinaran berbeda. *Jurnal Administrasi Kesehatan Indonesia*. **3**(2): 180-189.
- Sha, Y., Wang, L., Liu, M., Jiang, K., Xin, F., and Wang, B. 2016. Effects of lactic acid bacteria and the corresponding supernatant on the survival, growth performance, immune response and disease resistance of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*. **452**: 28–36.
- Singleton, P., and Sainsbury, D. 2006. *Dictionary of microbiology and molecular biology third edition*. John Wiley and Sons Ltd. 424.
- Sinhyu. 2018. *Kromatografi Kolom*. Getty Images. [www.istockphoto.com](http://www.istockphoto.com). Diakses pada 12 Agustus 2023.
- Smith, J. K., and Brown, A. B. 2018. Principles of liquid-liquid extraction: in liquid extraction. *IntechOpen*. 1-24.
- Sultana, B., and Anwar, F. 2019. Medicinal plants: past history and future perspective. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **9**(4): 217-219.
- Suryani, Y., Darniwa, A.V. dan Cahyanto, T. 2022. *Pemanfaatan Kulit Kopi Fermentasi sebagai Pupuk Cair Organik*. Bimedia Pustaka Utama. Bandung.
- Suryatman, A., dan Achmad, N. 2022. Uji daya hambat ekstrak alga coklat (*Sargassum* sp) terhadap pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi* secara *in-vitro*. *Lutjanus*. **27**(1): 6-12.
- Suwariani. 2016. *Hidrolisis Bungkil Biji Jarak Pagar Menjadi Hidrolisat Cair dan Aplikasinya sebagai Medium Produksi Lipase Oleh Aspergillus niger 6516 dengan Sistem Submerged Fermentation*. (Tesis). Program Studi Bioteknologi. Universitas Gadjah Mada. Yogyakarta.
- Tankeshwar, A. 2023. *Nutrient agar: composition, preparation, uses*. Culture Media. [www.microbeonline.com](http://www.microbeonline.com). Diakses pada 11 Agustus 2023.
- Tjahjadi, M., Wijaya, W., and Lestari, D. 2016. Coconut water as a solvent for soluble liquid production. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*. **8**(9): 157-160.
- Trisiswanti, T., Arista, A. M., Rizqita, E. A., Sugimin, S., and Oxi, R. Y. 2022. Comparison of cultured *S. aureus* and *E. coli* dna concentrations on growth

media of luria bertani and nutrient broth. *In Proceeding Series of International Conference on Arts and Humanities. 2.*

- Ulfi. 2021. Pengaruh Virgin Coconut Oil (VCO) Terhadap Aktivitas Bakteri Probiotik *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*. (Skripsi). Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sriwijaya. Palembang.
- Vidal, H.R., Maria, C.S., Andrea, A-E., Elena, F., Maria, J.C., Luis, C., David, H., and Mariano, S. 2020. Antimicrobial activity of EPA and DHA against oral pathogenic bacteria using an *in vitro* multi-species subgingival biofilm model. *Nutrients. 12*(9): 2812.
- Wahyuningsih, N. dan Zulaika, E. 2019. Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik pada Media Nutrient Broth dan Carboxy Methyl cellulose. *Jurnal Sains dan Seni ITS. 7*(2): 36-38.
- Wijayanti, D., Adi, D. D., dan Munim, A. 2019. Penggunaan minyak ikan sebagai pelarut dalam formulasi pakan ikan soluble liquid. *Journal Agroecotech Indonesia. 18*(1): 64-73.
- Xu, X., Bai, F., Wang, Y., Zhang, C., Chen, L., Li, Y., and Li, F. 2021. Potential use of *Lactobacillus plantarum* ZDY04 and *Bifidobacterium bifidum* WBIN03 as probiotics against *Vibrio parahaemolyticus* infection in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology. 109*: 201-211.
- Yano, Y., Nakayama, A., Saito, H., and Ishihara, K. 1994. Production of docosahexaenoic acid by marine bacteria isolated from deep sea fish. *Lipids. 29*(7): 527-528.
- Yano, Y., Hamano, K., Satomi, M., Tsutsui, I., Ban, M., and Aue-umneoy, D. 2014. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Vibrio* species related to food safety isolated from shrimp cultured at inland ponds in thailand. *Food Control 38. 30–36.*
- Yuhana, Lisa. 2019. Pengaruh lama penyimpanan terhadap kadar asam palmitat pada keju yang dianalisis dengan metode kromatografi gas – spektroskopi massa (KG-SM). (Skripsi). Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Karya Putra Bangsa. Tulungagung.
- Zakaria, Z. A., Zainal, S., Hamid, M. H. A., and Abas, F. 2018. Soluble liquid fertilizer from palm oil mill effluent: production, properties and its potential use as foliar fertilizer. *Journal of Cleaner Production. 198*: 1369-1379.