

**PROFILING SENYAWA BIOAKTIF AKTINOMISETES 18A1301 HASIL  
KOKULTIVASI MEDIA AMPAS TEBU SEBAGAI ANTIBAKTERI  
RESISTEN**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**RISKA SETYA DHARMAYANTI  
NPM 2117011107**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2025**

## ABSTRAK

### PROFILING SENYAWA BIOAKTIF AKTINOMISETES 18A13O1 HASIL KOKULTIVASI MEDIA AMPAS TEBU SEBAGAI ANTIBAKTERI RESISTEN

Oleh

**RISKA SETYA DHARMAYANTI**

Aktinomisetes merupakan kelompok bakteri yang dikenal sebagai penghasil berbagai senyawa bioaktif. Namun, eksplorasi yang berkelanjutan terhadap aktinomisetes menyebabkan tingginya tingkat dereplikasi sehingga menurunkan peluang penemuan senyawa baru. Penelitian bertujuan untuk melakukan profil senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes 18A13O1 melalui kokultivasi pada media ampas tebu dan untuk mengevaluasi potensi aktivitas antibakterinya terhadap bakteri yang resisten. Isolat 18A13O1 diaklimatisasi pada media ampas tebu dan diidentifikasi secara makroskopik dan mikroskopik untuk menunjukkan pertumbuhan optimal dan ciri khas aktinomisetes. Selanjutnya, isolat dikokultivasi pada media padat ampas tebu menggunakan metode *Solid-State Fermentation* (SSF) selama 14 hari. Biomassa yang dihasilkan diekstraksi menggunakan pelarut Dichloromethane (DCM) : metanol kemudian dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan diuji aktivitas antibakterinya melalui metode mikrodilusi. Ekstrak aktif dengan konsentrasi 2 mg/mL selanjutnya dianalisis menggunakan teknik LC-MS/MS untuk identifikasi senyawa. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak dari kokultivasi 18A13O1 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan diperoleh profil senyawa yang berperan dalam aktivitas antibakteri yaitu senyawa spinganine dengan berat molekul 302.3062 m/z yang terdeteksi pada waktu retensi 12.89 menit. Temuan ini menunjukkan potensi penggunaan media ampas tebu dan pendekatan kokultivasi dalam menginduksi produksi senyawa antibakteri baru dari aktinomisetes. Penelitian ini masih memiliki keterbatasan dalam konfirmasi struktur senyawa, sehingga disarankan dilakukan isolasi senyawa murni serta analisis lanjutan menggunakan NMR, IR, dan data MS/MS yang lebih lengkap guna meningkatkan akurasi identifikasi.

**Kata kunci:** aktinomisetes, ampas tebu, antibakteri, kokultivasi, KLT, LC-MS/MS, mikrodilusi, *Pseudomonas aeruginosa*

## ABSTRACT

### PROFILING BIOACTIVE COMPOUNDS OF ACTINOMYCETES 18A13O1 FROM COCULTIVATION OF BAGASSE MEDIA AS RESISTANT ANTIBACTERIALS

By

**RISKA SETYA DHARMAYANTI**

Actinomycetes is a group of bacteria known to produce various bioactive compounds. However, continuous exploration of actinomycetes leads to a high rate of dereplication, thus reducing the chances of discovering new compounds. The study aimed to profile bioactive compounds produced by actinomycetes 18A13O1 through cocultivation on bagasse media and to evaluate its potential antibacterial activity against resistant bacteria. Isolate 18A13O1 was acclimatized on bagasse media and identified macroscopically and microscopically to show optimal growth and characteristic features of actinomycetes. Next, the isolate was cocultivated on bagasse solid media using the Solid-State Fermentation (SSF) method for 14 days. The resulting biomass was extracted using Dichloromethane (DCM) : methanol solvent then analyzed using Thin Layer Chromatography (KLT) and tested for antibacterial activity through microdilution method. The active extract with a concentration of 2 mg/mL was then analyzed using LC-MS/MS technique for compound identification. The results showed that the extract from 18A13O1 cocultivation has antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and obtained a compound profile that plays a role in antibacterial activity, namely spinganine compounds with a molecular weight of 302.3062 m/z detected at a retention time of 12.89 minutes. This finding shows the potential of using bagasse media and cocultivation approach in inducing the production of new antibacterial compounds from actinomycetes. This study still has limitations in confirming the structure of the compound, so it is recommended that pure compound isolation be carried out as well as further analysis using more complete NMR, IR, and MS/MS data to improve identification accuracy.

Keywords: actinomycetes, bagasse, antibacterial, cocultivation, KLT, LC-MS/MS, microdilution, *Pseudomonas aeruginosa*

**PROFILING SENYAWA BIOAKTIF AKTINOMISETES 18A1301 HASIL  
KOKULTIVASI MEDIA AMPAS TEBU SEBAGAI ANTIBAKTERI  
RESISTEN**

**Oleh**

**Riska Setya Dharmayanti**

**Skripsi**

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Judul Skripsi : **PROFILING SENYAWA BIOAKTIF  
AKTINOMISETES 18A1301 HASIL  
KOKULTIVASI MEDIA AMPAS TEBU  
SEBAGAI ANTIBAKTERI RESISTEN**

Nama Mahasiswa : **Riska Setya Dharmayanti**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2117011107**

Program Studi : **Kimia**

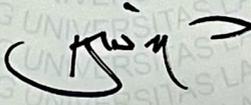
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



  
**Prof. Andi Setiawan, Ph.D**  
NIP. 195809221988111001

  
**Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si**  
NIP. 197707132009122002

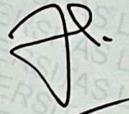
2. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerjasama  
FMIPA Universitas Lampung

  
**Mulyono, Ph.D**  
NIP. 197406112000031002

**MENGESAHKAN**

**1. Tim Penguji**

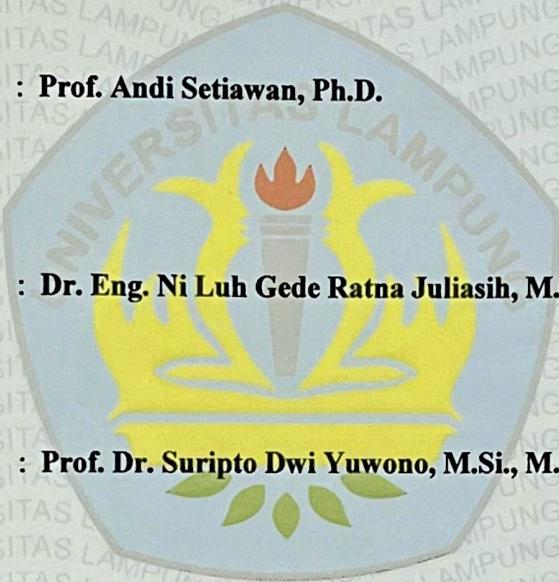
**Ketua : Prof. Andi Setiawan, Ph.D.** .....



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



**Penguji : Prof. Dr. Suripto Dwi Yuwono, M.Si., M.T** .....



**2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.**

**NIP 197110012003011002**

**Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 20 Juni 2025**

## SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Riska Setya Dharmayanti  
Nomor Pokok : 2117011107  
Mahasiswa : Kimia  
Jurusan : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Fakultas : Universitas Lampung  
Perguruan Tinggi

Dengan ini menyatakan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Profiling Senyawa Bioaktif Aktinomisetes 18A1301 Hasil Kokultivasi Media Ampas Tebu Sebagai Antibakteri Resisten”** adalah benar hasil karya saya sendiri. Saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Bandar Lampung, 26 Juni 2025



Yang menyatakan,

Handwritten signature of Riska Setya Dharmayanti.

Riska Setya Dharmayanti

NPM. 2117011107

## RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama lengkap Riska Setya Dharmayanti lahir di Trimulyo pada tanggal 01 Februari 2003 yang merupakan anak bungsu dari Bapak Abdul Rokhim dan Ibu Sudartinah. Penulis mengawali pendidikan di TK Dharma Wanita dan selesai pada tahun 2009, kemudian melanjutkan pendidikan di SD Negeri 1 Trimulyo (2009-2015), SMP Negeri 4 Metro (2015-2018), dan SMA Negeri 4 Metro (2018-2021). Pada tahun 2021 penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang S1 di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui Jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa penulis pernah mengikuti kegiatan organisasi sebagai Kader Muda Himpunan Mahasiswa Kimia (KAMI) periode 2021. Penulis juga pernah tergabung dalam beberapa organisasi mahasiswa seperti BEM FMIPA Universitas Lampung Dinas Kominfo (2022), anggota BEM U KBM Universitas Lampung Kementerian Komunikasi dan Informasi (2024) serta anggota KMNU Universitas Lampung (2024). Selain itu, penulis mengikuti program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) pada bidang Kewirausahaan di tahun 2024, sekaligus menjalankan bisnis kreatif Wrap and Go melalui program Pembinaan P2MW.

Pada Juli 2024, penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) yang berjudul “Uji Efektivitas Senyawa Bioaktif dari *Actinomyces* 18D36A1, 18D36A2, dan 18A13O1 sebagai Antimikroba Resisten”, setelah itu penulis mulai mengerjakan tugas akhir sebagai salah satu syarat kelulusan sebagai sarjana sains.

## **MOTTO**

*Tuhan tau waktu yang tepat, tempat yang tepat dan jawaban yang tepat untuk semua doa-doa kita.*

**-Rony Parulian**



Alhamdulillah Puji Syukur kepada Allah SWT yang senantiasa memberikan Nikmat, Kesehatan, dan Kesempatan, serta Shalawat beriring salam semoga selalu Tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW.

Kupersembahkan karya kecil ini sebagai wujud cinta, bakti, dan tanggung jawab kepada:

**Ibu**

Sudartinah, S.Pd., yang penuh kasih mengajarkanku arti sabar dan mandiri.

**Ayah**

Abdul Rokhim, yang selalu menyemangati dan mengajarkanku untuk selalu tenang dalam menghadapi masalah.

**Kakakku**

Rahmad Setya Dharmawan, yang semoga selalu sehat dan konsisten diet.

**Dosen-dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila**

atas seluruh ilmu, kebaikan, doa, dan nasihat yang diberikan selama ini.

**Sahabat dan teman-temanku Kimia 2021**

serta,

**Almamaterku Universitas Lampung**

## SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamiin, segala puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala keberlimpahan rahmat, nikmat kasih, serta karunia-Nya, sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si) pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Skripsi ini berjudul:

### **“Profiling Senyawa Bioaktif Aktinomisetes 18A13O1 Hasil Kokultivasi Media Ampas Tebu sebagai Antibakteri Resisten”**

Shalawat beriring Salam, tak lupa selalu tercurahkan kepada Baginda Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabatnya. Semoga kita termasuk ke dalam ummat yang mendapatkan syafaat serta cinta dan kasih dari beliau di yaumul akhir nanti, aamiin ya rabbal al'aamiin.

Suka dan duka tentunya selalu hadir mengiringi proses penulisan skripsi ini. Banyak kata dan ungkapan syukur yang mungkin tak sempat terucap secara langsung kepada berbagai pihak. Terimakasih banyak orang-orang baik Nan hebat yang telah membersamai perjalanan pendidikan dan penulisan skripsi ini. Penulis menyadari masih banyak terdapat kekurangan dalam penulisan, oleh sebab itu kritik dan saran sangat diharapkan. Harapannya, semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembacanya.

Dengan hati yang tulus dan penuh rasa syukur, penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph. D selaku dosen Pembimbing I yang sangat amat saya syukuri kehadirannya selama masa pendidikan ataupun penelitian tugas akhir. Dengan penuh Rasa hormat, terimakasih banyak untuk setiap rasa sabar, nasihat, kritik, saran, dan motivasi serta segala kebaikan lainnya yang telah diberikan selama ini. Semoga Allah senantiasa membalas semua kebaikan Bapak dengan keberkahan dan kebaikan yang lebih berlimpah lagi. Dengan penuh kerendahan hati, saya mohon maaf atas segala kata ataupun tindakan yang mungkin dianggap kurang baik dan kurang pantas dihadapan Bapak. Panjang umur dan sehat selalu ya Pak. Aamiin.
2. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna J., S.Si., M.Si. Selaku dosen Pembimbing II yang juga sangat saya syukuri kehadirannya. Terimakasih banyak untuk kebaikan, nasihat, ilmu, serta masukan yang selalu diberikan dengan sangat baik. Semoga Allah senantiasa memberikan kesehatan dan keberkahan untuk setiap langkah Ibu.
3. Bapak Prof. Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, S.Si., M.T. selaku Pembahas tugas akhir. Dengan penuh kerendahan hati dan rasa syukur, terimakasih banyak untuk semua kebaikan serta kemudahan yang Bapak berikan. Semoga Allah senantiasa memberikan kemudahan dan keberkahan disetiap langkah Ibu.
4. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si. selaku pembimbing akademik. Terimakasih banyak atas ilmu, bimbingan, serta saran, dan kebaikan selama menempuh pendidikan ini. Semoga Allah membalas setiap kebaikan yang telah diberikan.
5. Bapak dan Ibu Dosen Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik, dan memberikan banyak ilmu pengetahuan kepada penulis selama menempuh perkuliahan. Semoga Allah membalas kebaikan Bapak dan Ibu.

6. Seluruh staf administrasi dan pegawai di lingkungan Jurusan Kimia, Dekanat FMIPA, serta Universitas Lampung yang senantiasa membantu dalam sistem akademik, perkuliahan, penelitian, serta penyusunan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik.
7. Rumah kedua mbak Ida Nur Saadah dan Hilal Muhammad yang selalu menjadi tempat pulang saat aku lelah. Terimakasih sudah selalu menerimaku dan sabar menghadapi aku
8. Desti Faradila, sahabatku sejak dalam kandungan. Terimakasih sudah menjadi sahabat terbaik dan selalu ada saat penulis berada dititik terendah hidupnya.
9. Anisah Isti Roqhmah dan Fera Agistarika yang telah menjadi teman seperjuangan dalam mencapai titik akhir perkuliahan. Terimakasih sudah selalu berjuang dan saling merangkul dalam menghadapi jatuh bangunnya penelitian.
10. Rony Parulian Nainggolan, terimakasih sudah hadir dikehidupan penulis sehingga penulis mampu bertahan dan berambisi untuk selalu hidup dengan lebih baik disetiap pergantian harinya. Terimakasih sudah selalu berusaha baik dan memotivasi serta menghadirkan WeR1 terutama kak Dea, kak Canggih dan Khal dikehidupan penulis yang sebelumnya tidak berwarna.
11. Rekan seperjuangan ADS Research, Sefty Yustisia, Yesha Pramudita dan Wishnu. Terimakasih sudah menjadi teman penelitian yang baik dan memotivasi.
12. Manusia luar biasa penghuni LTSIT, Kak Fendi Setiawan, M. Si., Mba Rosyidatul Lutfiah, M.Si., Kak Charlos, S.Si., Kak Fayza Azzahra, S.Si., dan Kak Ibnu. Terimakasih sudah banyak sekali membantu diri ini dalam segala hal yang berkaitan dengan penelitian dan kepengurusan berkas persiapan tiap tahapnya. Terimakasih sudah sabar membimbing, mensupport, dan juga mewarnai hari-hari di semester akhir ini.
13. Teman-teman terdekat penulis Adelia Feby Tamara dan Amelia Normalita yang selalu mendukung dan memotivasi penulis dalam perkuliahan hingga penyusunan skripsi. Terima kasih untuk segala kebersamaan, tawa, canda, dan air mata.

14. Teman-teman seperjuangan di Laboratorium Kimia LT-SIT, Kimia Anorganik/ Fisik, Kimia Dasar, Kimia Organik, Biokimia, teman-teman kelas B yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis. Terima kasih atas kebersamaan selama ini.
15. Almamater tercinta Universitas Lampung.
16. Semua pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu persatu. Terimakasih atas segala ketulusan, kasih sayang, doa, dan bantuan yang diberikan. Semoga kebaikan yang sudah kalian berikan mendapatkan balasan berkali-kali lipat dari Allah SWT.

Bandar Lampung, 23 Juni 2025

Penulis

Riska Setya Dharmayanti

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xviii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1 Aktinomisetes.....	4
2.2 Aklimatisasi.....	8
2.3 OSMAC .....	9
2.4 Kultivasi .....	10
2.5 Kokultivasi .....	12
2.6 Ekstraksi.....	14
2.7 <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	16
2.8 <i>Staphylococcus Aureus</i> .....	17
2.9 Partisi .....	18
2.10 Kromatografi Lapis Tipis.....	19
2.11 Mikrodilusi.....	20
2.12 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	21
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>22</b>
3.1 Waktu dan Tempat.....	22
3.2 Alat dan Bahan .....	22
3.3 Prosedur Penelitian .....	23
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>27</b>
4.1 Isolat Aktinomisetes .....	27
4.2 Kultivasi dan Kokultivasi.....	31
4.3 Ekstraksi dan Partisi .....	34
4.4 Kromatografi Lapis Tipis.....	35
4.5 Uji Mikrodilusi .....	39
4.6 Analisis Hasil LC-MS/MS .....	42
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN</b> .....	<b>48</b>
5.1 Simpulan .....	48
5.2 Saran .....	48

<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>61</b>

## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
1. Pengamatan makroskopis Aktinomisetes yang ditumbuhkan pada media ISP2 .....	28
2. Keterangan warna dan koloni Aktinomisetes 18A13O1 pada media BSA yang disaring .....	30
3. Nilai Rf Kromatografi Lapis Tipis Fraksi DCM .....	36
4. Nilai Rf Kromatografi Lapis Tipis Fraksi Air.....	38
5. Senyawa-senyawa yang teridentifikasi pada dari sampel RT301 berdasarkan analisis LC-MS/MS.....	43

## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
1. Morfologi struktur reproduksi, bentuk dan permukaan spora pada aktinomisetes .....	5
2. Siklus hidup aktinomisetes mulai dari konidiospora hingga sporulasi. Berbagai jenis konidiospora ditunjukkan dalam kotak.....	6
3. Produksi metabolit sekunder melalui pendekatan OSMAC dan jalur biosintesis metabolit sekunder .....	10
4. Pertumbuhan isolat Aktinomisetes 18A13O1 pada media standar ISP2 setelah inkubasi selama 7 hari.....	28
5. Pertumbuhan aktinomisetes pada media agar ampas tebu (A) tanpa penyaringan dan (B) dengan penyaringan.....	29
6. Pengamatan mikroskopis isolat Aktinomisetes 18A13O1 pada media <i>Bagasse Sugarcane Agar</i> (BSA) .....	30
7. Hasil inokulasi aktinomisetes 18A13O1 pada media cair ampas tebu .....	32
8. Hasil kulltivasi aktinomisetes 18A13O1 hari ke-14 pada media padat berbasis ampas tebu.....	32
9. Hasil Kokultivasi Aktinomisetes 18A13O1 dan bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	33
10. Hasil Kokultivasi aktinomisetes 18A13O1 dan bakteri <i>Staphilococcus Aureus</i> .....	34
11. Visualisasi uji KLT fase organik ekstrak aktinomisetes 18A13O1 media ampas tebu.....	36
12. Visualisasi uji KLT fase air ekstrak aktinomisetes 18A13O1 media ampas tebu .....	37
13. Hasil Uji Mikrodilusi Ekstrak terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	41
14. Hasil Uji Mikrodilusi Ekstrak terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41

15. Kromatogram LC-MS/MS dari sampel RST3O1 yang dianalisis menggunakan perangkat lunak <i>Masslynx</i> .....	42
16. Kromatogram LC-MS/MS dari sampel RST3O1 .....	44
17. Spektrum massa senyawa spinganine .....	45
18. Struktur senyawa spinganine .....	46

## I. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Aktinomisetes termasuk dalam kelompok bakteri Gram-positif yang berperan sebagai penghasil senyawa bioaktif. Dari sekitar 23.000 senyawa bioaktif yang telah dihasilkan oleh mikroorganisme, lebih dari 10.000 berasal dari aktinomisetes. Di antara kelompok ini, anggota genus *Streptomyces* memproduksi sekitar 7.600 senyawa bioaktif (Fauziah dkk., 2022). Selain itu, aktinomisetes dapat menghasilkan berbagai jenis antibiotik termasuk epoksida, makrolida,  $\beta$ -laktam, peptida, amino-kumarin, aminoglikosida, ansamisin, lincosamid, dan tetrasiklin (Khalid *et al.*, 2021). Namun, eksplorasi yang berkelanjutan terhadap aktinomisetes tanah mengakibatkan banyak senyawa yang dihasilkan memiliki struktur serupa sehingga potensi penemuan senyawa baru menjadi menurun karena tingginya tingkat dereplikasi. Akibatnya pengembangan kandidat senyawa bioaktif baru dari sumber konvensional mengalami stagnasi serta dapat memperlambat inovasi di bidang farmasi dan kesehatan. Untuk mengatasi masalah ini para peneliti mulai mengalihkan eksplorasi ke lingkungan ekstrem seperti laut serta menggunakan metode kultur inovatif seperti kokultivasi dengan pendekatan teknik *One Strain-Many Compounds* (OSMAC). Metode ini dilakukan dengan menambahkan dua mikroorganisme sekaligus dalam satu kultur untuk merangsang produksi senyawa aktif yang belum tereksplorasi. Kokultivasi memungkinkan interaksi antar-mikroorganisme yang dapat mengaktifkan *silent biosynthetic gene clusters* (SBGCs) yang berpotensi meningkatkan produksi senyawa bioaktif (Kim *et al.*, 2021).

Beberapa penelitian telah melaporkan keberhasilan dari kokultivasi aktinomisetes dalam menghasilkan metabolit sekunder baru terutama ketika menggunakan pendekatan fermentasi padat seperti *Solid-State Fermentation* (SSF) yang menyediakan kondisi alami yang mirip dengan habitat mikroba. SSF dapat

mengubah limbah agroindustri menjadi produk bernilai tambah seperti senyawa bioaktif. Dengan menggunakan substrat bernilai ekonomis rendah, SSF memungkinkan aktinomisetes tumbuh dalam kondisi minim air atau tanpa air (Chillakamarry *et al.*, 2022). SSF telah banyak digunakan dalam produksi senyawa bioaktif dari aktinomisetes laut. Beberapa penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa penggunaan media fermentasi seperti pada media beras (Elawady *et al.*, 2024) atau cangkang udang (Laila *et al.*, 2023) dapat mendorong aktinomisetes untuk menghasilkan senyawa aktif dengan potensi biologis yang besar. Berbeda dengan sebelumnya, media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini berasal dari limbah ampas tebu karena ketersediaannya sebagai limbah agroindustri dan kandungan nutrisinya yang mendukung pertumbuhan aktinomisetes. Ampas tebu juga mengandung selulosa yang dapat didegradasi oleh enzim selulase yang dihasilkan aktinomisetes sehingga dapat meningkatkan produksi metabolit sekunder (Bhardwaj *et al.*, 2021).

Aktinomisetes laut menjadi target utama penelitian dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang unik. Strain aktinomisetes laut 18A13O1 telah terbukti menunjukkan potensi dalam menghasilkan senyawa antibakteri dan memiliki kemampuan beradaptasi pada media fermentasi berbahan alami. Senyawa bioaktif dari aktinomisetes ini diperoleh melalui kokultivasi menggunakan metode *Solid-State Fermentation* (SSF) dengan memanfaatkan limbah ampas tebu sebagai media fermentasi. Metode kokultivasi dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan untuk meningkatkan produksi metabolit sekundernya (Kim *et al.*, 2021). Biomassa hasil proses fermentasi diekstraksi menggunakan campuran pelarut diklorometana (DCM) dan metanol. Ekstrak yang diperoleh kemudian dipartisi untuk memisahkan fraksi berdasarkan polaritasnya. Komponen senyawa dalam masing-masing fraksi diuji dengan kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan metode deteksi sinar ultraviolet (UV) dan reagen kimia untuk mengidentifikasi keberadaan golongan senyawa bioaktif (Kamar *et al.*, 2021). Fraksi kemudian diuji menggunakan metode mikrodilusi untuk menentukan potensi penghambatan terhadap bakteri uji. Senyawa yang terdeteksi aktif pada uji mikrodilusi dianalisis lebih lanjut menggunakan *Liquid*

*Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS)* untuk memperoleh informasi kuantitatif serta struktur molekul senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri (Muadifah *et al.*, 2024).

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam eksplorasi senyawa antibakteri baru dari aktinomisetes laut strain 18A13O1 yang difermentasi menggunakan media ampas tebu dan dikembangkan sebagai antibakteri terhadap bakteri resisten. Dengan demikian, penelitian ini dapat memberikan wawasan baru dalam pengembangan sumber antibiotik alami serta potensi pemanfaatan limbah agroindustri untuk produksi senyawa bioaktif.

## **1.2 Tujuan Penelitian**

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menguji aktivitas antibakteri dari isolat aktinomisetes 18A13O1 hasil kokultivasi pada media padat ampas tebu terhadap bakteri patogen.
2. Mengkarakterisasi senyawa bioaktif isolat aktinomisetes 18A13O1
3. Memperoleh profil senyawa bioaktif dari aktinomisetes yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri.

## **1.3 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi baru mengenai potensi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes sebagai agen antibakteri. Selain itu, penelitian ini juga diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah untuk pengembangan lebih lanjut dalam industri bioteknologi khususnya dalam upaya pengembangan produk antibakteri yang ramah lingkungan dan efektif.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Aktinomisetes

Aktinomisetes adalah mikroorganisme yang termasuk dalam ordo Actinomycetales dan filumnya adalah Actinobacteria yang merupakan salah satu unit taksonomi terbesar di wilayah bakteri. Filum terdiri dari bakteri gram-positif dengan kandungan tinggi sitosin guanine (G + C) dalam DNA-nya dengan 51% di beberapa Corynebacteria hingga lebih dari 70% di *Streptomyces* dan *Frankia*. Pengecualiannya adalah genom obligat *Tropheryma whipplei* dimana kandungan G + C kurang dari 50%. Filum ini juga beradaptasi dengan berbagai lingkungan seperti tanah, air (bahkan asin) dan udara. Meskipun demikian, bagian dominan dari organisme ini lebih disukai dan ditemukan di tanah alkali dengan jumlah besar bahan organik (Simeis and Serra, 2021). Secara taksonomi, aktinomisetes termasuk dalam Domain Bacteria, Filum Actinobacteria, Kelas Actinobacteria, dan Ordo Actinomycetales yang terdiri dari berbagai famili dengan metabolit sekunder yang berpotensi tinggi seperti Streptomycetaceae, Pseudonocardiaceae, Micromonosporaceae, dan lainnya. Salah satu genus utama di antaranya adalah *Pseudonocardia*, yang digunakan dalam penelitian ini. Klasifikasi taksonomi *Pseudonocardia carboxydivorans* sebagai model aktinomisetes yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Pylum : Actinobacteria

Class : Actinobacteria

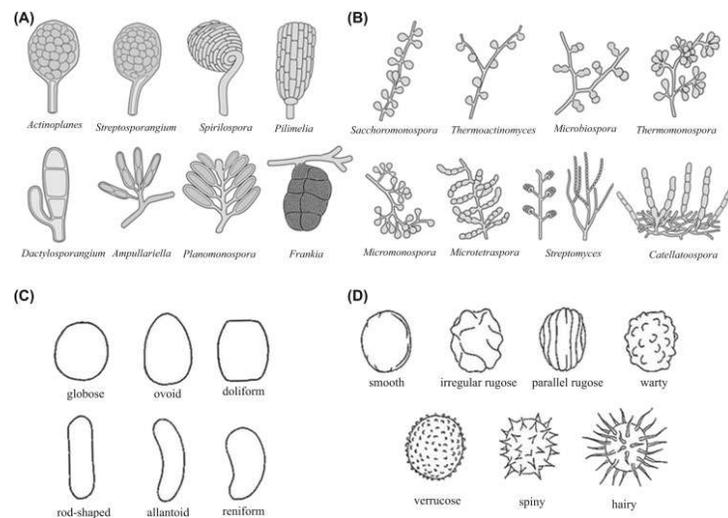
Order : Actinomycetales

Family : Pseudonocardiaceae

Genus : *Pseudonocardia* (Butdee *et al.*, 2025)

Aktinomisetes adalah sekelompok bakteri gram-positif yang memiliki morfologi khas yang mirip dengan jamur yang membentuk struktur filamen atau seperti

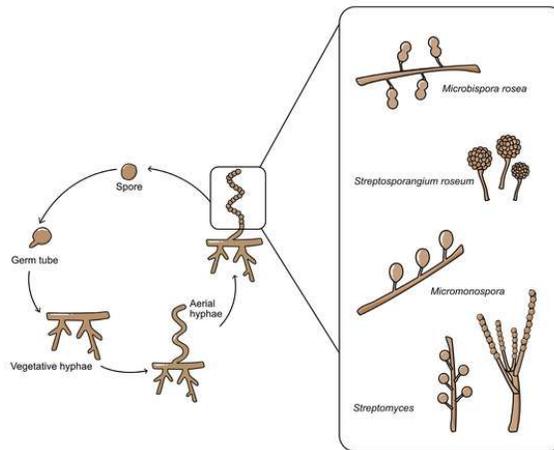
benang. Koloni yang terbentuk pada aktinomisetes umumnya padat, kering, bertekstur kasar atau berkerut dan dapat menampilkan permukaan yang menyerupai miselium. Hifa yang dihasilkan dapat tumbuh menembus media (hifa substrat) dan menjulang diatas permukaan media (hifa aerial) serta sering kali menghasilkan spora kecil untuk mempertahankan diri. Spora aktinomisetes memiliki warna yang bervariasi seperti putih, abu-abu, merah muda, biru kehijauan, hingga cokelat tergantung pada spesiesnya. Selain itu, beberapa aktinomisetes dapat menghasilkan pigmen berwarna pada koloni maupun pada media sekitarnya (Coral *et al.*, 2022).



Gambar 1. Morfologi struktur reproduksi, bentuk dan permukaan spora pada aktinomisetes. (A) Bentuk Sporangium (B) Bentuk Rantai Spora (C) Variasi Bentuk Spora (D) Variasi permukaan spora (Hazarika and Thakur, 2020).

Aktinomisetes memiliki miselium radial yang berkembang dengan baik yang terbagi menjadi miselium substrat dan miselium udara dalam siklus hidupnya. Miselium substrat terbentuk di media untuk mengasimilasi nutrisi dan miselium udara berkembang setelahnya. Tetapi ketika aktinomisetes tumbuh di lingkungan yang buruk, hifa menjadi melingkar dan mengembangkan septum. Setelah perkembangan septum, konidiospora terbentuk di dalam hifa. Kecuali *Streptomyces* dengan spora rantai panjang, yang lain memiliki karakteristik yang

dapat dibedakan seperti Micromonospora (satu spora non-motil), Microbispora (dua dalam rantai), dan Streptosporangium (dengan sporangium sebagai vesikula spora). Spora akan dilepaskan ke lingkungan dan akan berkecambah jika kondisi yang diinginkan tercapai. Pada tahap perkecambahan, spora akan mengeluarkan tabung kecambah, tabung kecambah berada mencapai tahap pertumbuhan vegetatif, dan siklusnya terus berulang (Ngamcharungchit *et al.*, 2023)



Gambar 2. Siklus hidup aktinomisetes mulai dari konidiospora hingga sporulasi. Berbagai jenis konidiospora ditunjukkan dalam kotak.

Aktinomisetes adalah bakteri yang memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di berbagai lingkungan ekstrim dan ditemukan di mana-mana di alam, mulai dari tanah yang ada di mana-mana, tanah rizosfer, dan tanaman actinorhiza hingga lingkungan yang lebih spesifik seperti tanah hipersalin, batu kapur, air tawar, laut, spons laut, gua gunung berapi, gurun, udara, saluran pencernaan serangga, coran cacing tanah, kotoran kambing, dan jaringan tanaman sebagai endofit.

Keanekaragaman habitat ini mencerminkan kemampuan adaptasi yang tinggi dan metabolisme yang canggih, dan melalui hal ini, aktinomisetes dapat menghasilkan berbagai senyawa bioaktif seperti antibiotik, antijamur, dan antitumor. Genus seperti *Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*, dan *Pseudonocardia* telah terbukti aktif melawan berbagai patogen seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan jamur patogen tanaman dan juga telah ditemukan terlibat dalam hubungan simbiosis yang penting dengan organisme lain seperti tanaman dan serangga. Keberadaan mereka di lingkungan yang tidak bersahabat juga

menawarkan potensi yang sangat besar sebagai sumber senyawa baru untuk obat-obatan di masa depan, terutama dalam memerangi resistensi antibiotik yang muncul (Selim *et al.*, 2021).

Aktinomisetes dikenal sebagai produsen utama antibiotik karena kemampuannya dalam menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan aktivitas antimikroba yang luas. Beberapa antibiotik yang sudah banyak digunakan dalam dunia medis seperti rifampisin dan sikloserin untuk pengobatan tuberkulosis dihasilkan oleh aktinomisetes. Selain itu, eritromisin yang efektif untuk infeksi saluran pernapasan diisolasi dari *Saccharopolyspora erethraea* sedangkan tetrasiklin dari *Streptomyces aureofaciens* menargetkan ribosom bakteri. Senyawa *nocardiopeptidins angucycline* baru dari *nocardiopepsis sp.* laut yang aktif terhadap MRSA berhasil diisolasi yang membuktikan bahwa penemuan antibiotik baru yang masih sangat potensial. Studi terhadap strain aktinomisetes dari ekosistem mangrove juga menunjukkan bahwa sebagian besar strain mampu menghasilkan metabolit bioaktif dengan aktivitas spektrum luas terhadap patogen. Selain mekanisme kerja antibiotik pada konsentrasi tinggi, efek antibiotik pada konsentrasi subinhibitori kini juga banyak diteliti. Efek ini membuka perspektif baru dalam memahami peran antibiotik sebagai alat regulasi ekosistem mikroba serta menjadi topik menarik untuk membandingkan aktivitas antibiotik dari aktinomisetes terestrial, air tawar dan laut (Jagannathan *et al.* 2021).

Aktinomisetes laut merupakan sumber yang kaya akan keragaman mikroorganisme sebagian besar belum terkarakterisasi dengan baik. Habitat laut seperti pesisir, sedimen laut dalam, air laut dan hutan mangrove memberikan kondisi yang unik bagi pertumbuhan aktinomisetes. Hutan mangrove menjadi ekosistem yang sangat dinamis karena menutupi 75% wilayah iklim tropis dunia dan menjadi tempat hidup bagi berbagai organisme yang masih didalami. Fluktuasi salinitas dan gradien pasang surut di lingkungan mangrove menciptakan kondisi yang mendukung mikroorganisme untuk menghasilkan metabolit yang berbeda dari biasanya. Sejak akhir abad ke-19 laporan mengenai aktinomisetes laut mulai muncul dan sejak 1980-an bioteknologi telah memfokuskan penelitian

pada mikroorganisme laut untuk aplikasi termasuk dalam pengembangan obat. Pada tahun 1984, *Rhodococcus marinonascens* ditemukan sebagai aktinomisetes laut pertama. Pada tahun 2005, genus aktinomisetes yang membutuhkan air laut untuk tumbuh, *Salinispora* ditemukan dengan spesies baru *Salinispora tropica* dan *Salinispora arenicola* yang berasal dari famili *Micromonosporaceae*. Penemuan metabolit sekunder baru dari *Salinispora* semakin mendorong pencarian untuk kelompok aktinomisetes laut lainnya. Beberapa genus aktinomisetes laut yang telah dipelajari antara lain *Dietzia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Salinispora*, dan *Micromonospora*. Aktinomisetes laut ini telah terbukti menghasilkan senyawa bioaktif yang memiliki potensi untuk digunakan sebagai agen antikanker, seperti *salinosporamide A* (dari *S. tropica*), *actinomycin D* (dari *Streptomyces parvulus*), dan *mitomycin C* (dari *Streptomyces caespitosus*). Sebagai sumber senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antitumor, antifungal, dan antibakteri, aktinomisetes laut menunjukkan potensi besar untuk pengembangan lebih lanjut dalam bidang bioteknologi dan pengobatan (Ngamcharunghit *et.al.*, 2023).

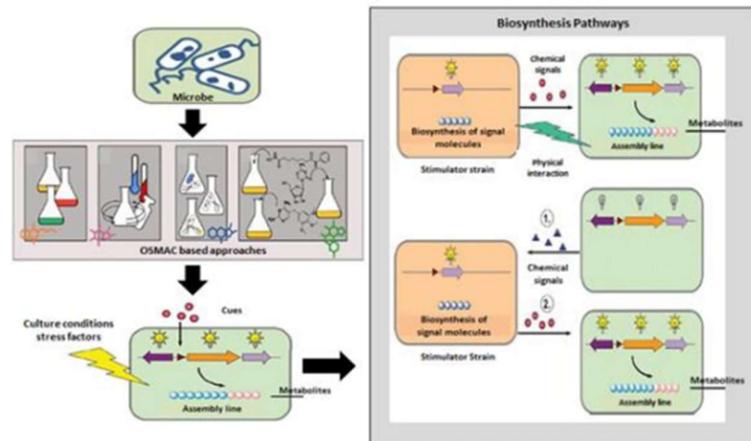
## 2.2 Aklimatisasi

Aklimatisasi merupakan proses adaptasi yang penting sebelum mikroorganisme digunakan dalam berbagai eksperimen atau aplikasi bioteknologi terutama ketika mikroorganisme digunakan dalam berbagai eksperimen atau aplikasi bioteknologi terutama ketika mikroorganisme tersebut dipindahkan ke lingkungan yang berbeda dari sebelumnya. Proses aklimatisasi mikroorganisme khususnya aktinomisetes krusial untuk memastikan kelangsungan hidup dan pemeliharaan aktivitas metabolik setelah transisi dari kondisi kultur steril ke lingkungan eksperimental atau terestrial yang lebih kompleks. Adaptasi ini mencakup penyesuaian fisiologis terhadap fluktuasi pH, suhu, salinitas, kelembaban, dan nutrisi agar mikroba dapat berkompetisi dalam ekosistem baru dan tetap memproduksi metabolit sekunder secara optimal. Menurut Silva *et al.* (2022) saat diformulasi sebagai bioinokulan, aktinomisetes harus mampu menghadapi stres lingkungan seperti perubahan ionik dan tekanan osmotik, sehingga protokol aklimatisasi dengan penyesuaian media secara bertahap dan pengujian toleransi

menjadi langkah penting. Penelitian terhadap isolat aktinomisetes dari tanah salin menunjukkan bahwa strain halotoleran mengatur homeostasis ion dan mensintesis eksopolisakarida pelindung untuk menahan kadar garam tinggi, yang secara signifikan meningkatkan viabilitas sel di bawah stres salinitas (Djebaili *et.al.*, 2020). Selain itu, *Dermaococcus barathri* yang merupakan salah satu jenis actinobacteria laut dalam terbukti mampu mengurangi akumulasi *reactive oxygen species* pada tanaman tomat di bawah perlakuan salinitas tinggi yang menandakan kemampuan adaptif dalam memitigasi stres oksidatif sekaligus mendukung pertumbuhan tanaman pada kondisi ekstrem (Rangseekeaw *et.al.*, 2021). Tanpa aklimatisasi seperti ini, kultur murni sering gagal bertahan di lapangan atau kehilangan aktivitas bioaktifnya

### 2.3 OSMAC

Strategi "*One Strain Many Compounds*" (OSMAC) merupakan pendekatan yang paling sederhana dan efektif. Dengan modulasi kondisi kultur, pendekatan OSMAC dapat mengaktifkan gen mikroba yang sebelumnya tidak aktif, sehingga membuka jalan bagi penambangan produk alami aktif yang cepat dan efisien. Hingga saat ini, strategi OSMAC telah memfasilitasi penemuan berbagai jenis produk alami mikroba, terutama termasuk peptida siklik, alkaloid, poliketida, dan terpenoid (Zhang *et al.*, 2024). Pendekatan OSMAC merupakan metode penemuan senyawa bioaktif berbasis kultur yang tidak memerlukan pengetahuan sebelumnya tentang jenis gugus gen biosintetik (BGC) atau mekanisme pengaturan yang mengaturnya. OSMAC merupakan pendekatan yang efektif untuk aktivasi gen kriptik atau BGC diam yang aktif secara kondisional hanya pada kondisi lingkungan tertentu. Strategi ini dilakukan dengan mengubah kondisi kultur, baik secara fisik maupun kimia, seperti komposisi medium (kadar nutrisi dan penambahan pemicu kimia), parameter fisik (suhu, pH, tekanan osmotik, dan salinitas), dan penerapan stres biotik atau abiotik. Oleh karena itu, OSMAC merupakan strategi yang tepat untuk meningkatkan keragaman senyawa metabolit dari satu galur mikroorganisme dan memperluas kemungkinan penemuan senyawa baru (Zahroh *et al.*, 2022).



Gambar 3. Produksi metabolit sekunder melalui pendekatan OSMAC dan jalur biosintesis metabolit sekunder

## 2.4 Kultivasi

Kultivasi adalah proses pengembangan dan pemeliharaan organisme dalam kondisi yang terkendali untuk tujuan produksi biomassa atau senyawa tertentu. Kultivasi melibatkan faktor-faktor lingkungan seperti cahaya, suhu dan nutrisi untuk mendukung pertumbuhan optimal (Veerabadrhan *et al.*, 2021). Kultivasi aktinomisetes adalah proses penanaman dan perbanyakan mikroorganisme dari dengan kemampuannya dalam menghasilkan senyawa bioaktif termasuk antibiotik. Proses kultivasi ini dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai media, baik media padat maupun cair yang diformulasikan untuk mendukung pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder (Meenakshi *et al.*, 2023). Dengan jumlah metabolit bioaktif yang relatif rendah yang diproduksi secara alami oleh mikroorganisme seperti aktinomisetes, kultivasi digunakan sebagai metode untuk meningkatkan produksi senyawa bioaktif. Kultivasi adalah metode yang penting dalam sektor farmasi karena memiliki kemampuan untuk mengoptimalkan biosintesis kandidat obat masa depan misalnya antibiotik dalam skala yang lebih besar dan berkelanjutan (Siro *et al.*, 2022).

Teknik kultivasi aktinomisetes dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu:

- *Solid State Fermentation (SSF)*

*Solid-state fermentation* (SSF) adalah proses fermentasi mikroba dimana mikroorganisme terpilih (bakteri, jamur, dan khamir) dibudidayakan pada bahan organik padat, lembab, dan tidak larut yang berperan sebagai penopang dan sumber nutrisi bagi pertumbuhan mikroorganisme dalam tanpa atau hampir tanpa keberadaan air yang mengalir bebas. SSF muncul sebagai alternatif yang menarik karena manfaat seperti produktivitas yang lebih tinggi, pencemaran air limbah yang lebih sedikit, risiko kontaminasi substrat yang lebih rendah dan kebutuhan energi yang lebih rendah (Wang *et al.*, 2023). Kandungan zat bioaktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes dalam fermentasi padat lebih tinggi dibandingkan dengan fermentasi cair. Fermentasi padat melibatkan serangkaian langkah yang dikategorikan menjadi proses *upstream*, *midstream* dan *downstream*. Proses *upstream* melibatkan persiapan substrat dan media pertumbuhan serta isolasi mikroorganisme yang digunakan untuk fermentasi, diikuti oleh proses *midstream* dimana substrat diinokulasi dan difermentasi, kemudian proses *downstream* dimana diperoleh produk akhir (Yafetto *et al.*, 2022).

Prinsip dari fermentasi ini didasarkan pada pertumbuhan mikroorganisme pada permukaan substrat padat yang memiliki kadar air terbatas. Beberapa substrat umum yang digunakan dalam fermentasi padat adalah dedak gandum, beras dan jerami padi, jerami, limbah buah dan sayuran, bubur kertas, ampas tebu, sawit kelapa dan media sintetis (Ye *et al.*, 2021). Keuntungan utama dari SSF adalah peningkatan hasil panen dan kemungkinan menggunakan residu agroindustri yang murah dan mudah didapat sebagai substrat untuk produksi hayati, sehingga lebih ramah lingkungan daripada SmF. SSF membutuhkan lebih sedikit air, biaya operasi yang lebih rendah, dan tidak membutuhkan peralatan canggih (Salsabila dan Meylani, 2024). Namun SSF juga memiliki kekurangan yaitu distribusi panas dan massa tidak mungkin dikontrol secara merata di seluruh substrat padat. Hal ini dapat menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme yang tidak merata dan efisiensi dalam produksi (Pablo, 2023).

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

*Submerged Fermentation* (SmF) adalah teknik yang menggunakan substrat cair seperti molase atau kaldu dimana senyawa bioaktif disekresikan ke dalam cairan fermentasi. Dalam fermentasi ini mikroorganisme memerlukan atmosfer yang terkendali untuk menghasilkan produk akhir berkualitas tinggi. Substrat yang digunakan dalam SmF adalah media cair, molase, air limbah, jus sayuran, dan gula larut untuk mengekstrak senyawa bioaktif. SmF sebagian besar digunakan untuk produksi polisakarida. SmF juga digunakan untuk menumbuhkan atau membudidayakan berbagai bakteri dan jamur untuk mendapatkan polisakarida intraseluler dan ekstraseluler (Sheikh *et al.*, 2024).

SmF menjadi metode yang sederhana dan efektif untuk memahami efek sinergis kondisi kultur dan substrat pada produksi pigmen dari mikroba potensial. Metode ini pasti akan memenuhi kebutuhan industri dan menghilangkan risiko yang ditimbulkan oleh pigmen sintetis yang digunakan dalam industri makanan dan farmasi (Ramesh *et al.*, 2022). Selain itu, SmF juga memiliki beberapa kekurangan yang perlu dipertimbangkan saat menerapkannya. Metode ini mahal dan membutuhkan peralatan fermentasi yang canggih karena harus terus menerus disterilkan, diangin-anginkan, dan diaduk. Selain itu, lingkungan cairan yang kaya nutrisi menimbulkan bahaya mikroorganisme asing yang mencemari sehingga dapat mengganggu proses produksi. Busa berlebih juga lazim terjadi pada SmF sebagai akibat dari langkah aerasi dan ini membutuhkan penambahan antifoam yang memiliki kecenderungan untuk mempengaruhi efisiensi fermentasi. Selain itu, densitas produk yang dihasilkan lebih rendah dibandingkan dengan fermentasi padat dan akan terjadi penghambatan produk yang akan menurunkan efisiensi produksi secara keseluruhan (Nazir *et al.*, 2024).

## **2.5 Kokultivasi**

Kokultivasi adalah proses membiakkan dua atau lebih jenis mikroorganisme bersama-sama untuk melihat bagaimana mereka mempengaruhi satu sama lain. Di alam, mikroorganisme tidak hidup sendiri melainkan bercampur dengan banyak jenis lainnya dan berinteraksi satu sama lain secara kompleks. Jika dibandingkan, pertumbuhan mikroorganisme dalam kultur murni (sendiri) mungkin berbeda dari

pertumbuhannya ketika dikultur bersama, karena ada interaksi antar mikroba yang mungkin saling membantu (sinergis) atau saling menghambat (antagonistik). Mikroorganisme dari genus yang sama lebih sering cocok untuk dikultur secara bersama-sama dan sering digunakan untuk menghasilkan senyawa metabolit yang beragam. Dalam kondisi ini, mikroorganisme dapat tumbuh berdampingan secara langsung atau hanya sebagian bersentuhan tergantung seberapa kuat interaksi di antara mereka. Kokultivasi, khususnya dengan jamur bukan hanya dapat meningkatkan produksi senyawa tertentu tetapi juga dapat memunculkan senyawa baru yang tidak akan muncul jika mikroorganisme ditumbuhkan sendiri. Karena itu, metode ini memiliki potensi besar dalam dunia industri terutama untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Kokultivasi juga digunakan dalam proses mikrobiologi lainnya seperti pengolahan limbah dan bisa melibatkan organisme yang sudah dikenal maupun yang belum diketahui (Prabhu *et al.*, 2022).

Kokultur mikroba berarti menumbuhkan dua atau lebih mikroorganisme secara bersamaan dalam ruang yang sama. Hal ini terkait dengan prosedur yang menjanjikan untuk membangkitkan jalur metabolit tersembunyi yaitu senyawa yang tidak terbentuk ketika mikroba dikulturkan secara individual. Melalui proses ini, mikroba dapat berinteraksi satu sama lain melalui senyawa kimia dalam bentuk volatil atau larut dalam medium yang akhirnya mengarah pada pembentukan metabolit tertentu. Proses ini dapat dikontrol oleh senyawa eksternal atau oleh molekul pengatur yang diproduksi oleh mikroba itu sendiri. Menariknya, proses ini dapat dilakukan tanpa informasi genom mikroba yang terperinci atau peralatan laboratorium yang rumit. Pada awalnya, kokultivasi digunakan sebagai cara untuk menemukan interaksi antara mikroba dalam tubuh manusia dan patogen dan juga untuk meningkatkan proses industri dalam makanan, minyak, dan pelarut. Kini, metode ini juga telah banyak digunakan misalnya dalam pengolahan limbah, proses pengolahan tanah, proses produksi gas, dan berbagai produk makanan seperti susu fermentasi, salami, dan minuman beralkohol. Selain itu, kokultivasi juga dapat memaksimalkan produksi senyawa bioaktif, mengatasi senyawa samping yang tidak diinginkan, mendukung pembentukan biofilm, bahkan mengatasi sifat patogen yang merugikan. Namun, penelitian terkait

pengaktifan biosintesis senyawa baru (seperti antibiotik atau antikanker) dari kokultivasi masih dalam tahap awal dan belum seluas aplikasi industri atau mikrobioma manusia. Meskipun demikian, berbagai jenis interaksi mikroba seperti saling membantu, saling tidak mengganggu, atau bahkan saling menghambat juga terbukti memicu proses penting seperti pembentukan spora dan biofilm dalam sistem kokultivasi (Selegato and Gamboa, 2023).

Metode kokultivasi merupakan gabungan dari ilmu ekologi dan praktik industri yang ramah lingkungan serta sangat menjanjikan untuk menghasilkan berbagai produk dan membantu proses bioremediasi. Pengembangan metode ini baik yang terbuka maupun tertutup sebagian besar didasarkan pada pemahaman yang baik tentang komponen-komponen yang terlibat. Dua jenis kultur yang digunakan secara umum yaitu kultur axenic (mengandung satu spesies mikroba) dan kultur non-axenic (mengandung campuran lebih dari satu mikroorganisme). Pemilihan jenis kultur ini biasanya dioptimalkan sesuai dengan tujuan kokultivasi misalnya untuk mensintesis metabolit, mengurai substrat secara biologis, atau meningkatkan hasil biomassa. Hal penting yang perlu diperhatikan di sini adalah tidak semua mikroba yang akan digunakan dapat dipertahankan hidup selama durasi kokultivasi. Perancangan untuk kokultivasi dalam banyak kasus mengikuti prinsip evolusi yaitu baik top-down (seleksi alam dari populasi polimikroba) atau bottom-up (memilih mikroba tertentu secara langsung). Kedua strategi memiliki keuntungan relatif tergantung pada tujuan yang dipertimbangkan. Interaksi mikroorganisme dalam sistem kokultur sangat heterogen dan kompleks, mulai dari hubungan yang saling membantu (mutualisme), hubungan yang tidak saling mempengaruhi (komensalisme), hingga hubungan yang saling menghambat seperti pemangsaan, parasitisme, amensalisme, dan kompetisi. Bahkan di antara dua jenis mikroba, semua jenis interaksi ini dapat terjadi pada saat yang bersamaan. Oleh karena itu, penting untuk menyelidiki bagaimana mikroba berinteraksi satu sama lain untuk merancang sistem kokultur terbaik (Rasheed *et al.*, 2023).

## **2.6 Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan komponen berdasarkan penggunaan pelarut. Ekstraksi juga diartikan sebagai proses pemisahan satu atau lebih komponen dari campuran homogen dengan bantuan pelarut cair sebagai zat pemisah. Pelarut yang digunakan harus mampu mengekstrak senyawa yang diinginkan tanpa melarutkan bahan lain. Secara umum, pemisahan dengan ekstraksi merupakan proses yang mudah dilakukan melalui tiga langkah, yaitu (1) Penambahan sejumlah pelarut yang telah diketahui agar dapat bersentuhan dengan sampel sebaiknya dengan proses difusi, (2) Zat terlarut akan terlarut dari sampel dan larut dalam pelarut sehingga terbentuk fase ekstrak, dan (3) Pemisahan fase ekstrak dengan sampel (Yulinar dan Suharti, 2022). Ekstraksi mencakup berbagai metode seperti maserasi, microwave assisted extraction (MAE), dan ultrasonic assisted extraction (UAE). Maserasi merupakan metode ekstraksi yang dilakukan dengan merendam bahan dalam pelarut dan memanfaatkan prinsip tercapainya konsentrasi kesetimbangan. Microwave assisted extraction (MAE) merupakan metode ekstraksi yang dibantu dengan menggunakan radiasi gelombang mikro untuk memanaskan pelarut secara cepat dan efektif. Ultrasonic assisted extraction (UAE) merupakan bentuk ekstraksi yang dibantu oleh gelombang ultrasonik yang merambat di dalam pelarut sehingga terjadi efek kavitasi yang mengakibatkan pemanasan dan terbentuknya senyawa ekstrak. Perbedaan proses ekstraksi yang dilakukan terhadap suatu bahan mempengaruhi rendemen ekstrak, jenis senyawa yang terdapat dalam ekstrak dan kualitas ekstrak (Fauziah dkk., 2022).

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode maserasi. Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi sederhana dengan merendam bahan atau medium dalam pelarut (misalnya etanol atau metanol) pada suhu ruangan selama beberapa waktu. Selama proses ini, larutan biasanya diaduk sesekali untuk membantu melepaskan zat kimia aktif dari bahan. Setelah proses perendaman selesai, larutan disaring untuk memisahkan cairan dari residu padat. Residu dapat diperas sehingga pelarut yang tersisa dapat ditekan keluar, kemudian cairan dapat disaring lagi untuk pemurnian atau dibiarkan mengendapkan kotoran. Maserasi harus dilakukan dalam wadah tertutup untuk menghindari penguapan pelarut. Penguapan cairan tidak boleh dilakukan selama ekstraksi karena tujuannya adalah

mengekstrak sebanyak mungkin terlebih dahulu. Setelah ekstraksi selesai, maka pelarut dapat diuapkan misalnya menggunakan rotary evaporator untuk mendapatkan ekstrak yang lebih pekat.

Pelarut yang digunakan sangat penting karena jenis pelarut akan menentukan jenis senyawa (fitokimia) yang akan larut dan terekstraksi. Maserasi juga cocok untuk ekstraksi senyawa yang tidak stabil terhadap panas, karena tidak memerlukan suhu tinggi. Keuntungan maserasi adalah murah, mudah digunakan dengan alat sederhana dan metode ekstraksi aktif tidak memerlukan pemanasan (Fikayuniar dkk., 2023). Namun, kelemahan terpenting dari metode ini adalah efisiensinya yang rendah dan waktu yang lama. Namun, jika kondisi ekstraksi dikontrol dengan benar, maserasi masih dapat menghasilkan ekstrak dengan kadar senyawa aktif yang tinggi (Bitwell *et al.*, 2023).

## **2.7 *Pseudomonas Aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri berbentuk batang aerobik Gram-negatif yang dapat diisolasi dari sebagian besar lingkungan, termasuk tanah, tanaman, dan jaringan mamalia. Bakteri ini dapat bertahan hidup di air, berbagai permukaan, dan peralatan medis menggunakan faktor pengikatnya yang berpengaruh, seperti flagela, pili, dan biofilm. Oleh karena itu, *Pseudomonas aeruginosa* melimpah di lingkungan alami dan buatan, termasuk danau, rumah sakit, dan saluran pembuangan rumah tangga.

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen oportunistik yang menyebabkan beberapa infeksi pada manusia. Bakteri ini telah menjadi penyebab penting infeksi nosokomial dan resistensi antibiotik. *Pseudomonas aeruginosa* dapat ditetapkan sebagai salah satu bakteri oportunistik yang terkait dengan infeksi layanan kesehatan, termasuk ventilator-associated pneumonia (VAP), infeksi unit perawatan intensif, infeksi aliran darah terkait jalur sentral, infeksi tempat pembedahan, infeksi saluran kemih, infeksi luka bakar, keratitis, dan otitis media. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan organisme yang mampu beradaptasi terhadap perubahan lingkungan, dengan cepat mengembangkan resistensi

terhadap antibiotik, dan menghasilkan berbagai faktor virulensi (Tuon *et al.*, 2022).

*Pseudomonas aeruginosa* telah diidentifikasi menunjukkan perkembangan resistensi antimikroba yang signifikan dalam lima dekade terakhir, terutama pada isolat klinis dari ICU. Isolat ini umumnya resistan terhadap berbagai kelas antibiotik termasuk  $\beta$ -laktam, aminoglikosida, fluorokuinolon, dan bahkan polimiksin, dan meningkatnya resistensi terhadap karbapenem di negara-negara tertentu seperti Cina. Penggunaan antibiotik yang lebih besar, terutama di rumah sakit, berkontribusi terhadap meningkatnya insiden infeksi dengan strain yang resistan terhadap banyak obat (MDR) dan yang resistan terhadap banyak obat (XDR). Infeksi dengan strain di atas dikaitkan dengan peningkatan mortalitas, lamanya tinggal di rumah sakit, dan biaya perawatan kesehatan. Risiko infeksi MDR/XDR lebih besar di antara host yang mengalami gangguan kekebalan seperti pasien yang terinfeksi HIV dan penerima transplantasi organ. Resistensi *Pseudomonas aeruginosa* multifaktorial terhadap antibiotik dimediasi oleh mekanisme resistensi intrinsik termasuk pengurangan porin, ekspresi pompa efluks, pembentukan biofilm, dan mutasi pada gen target antimikroba; resistensi ekstrinsik melalui perolehan gen resistensi horizontal (Kayu *et al.*, 2023).

## **2.8 *Staphylococcus Aureus***

*Staphylococcus aureus* merupakan patogen Gram-positif oportunistik yang dapat menyebabkan berbagai macam penyakit, mulai dari infeksi kulit superfisial hingga sepsis dan kegagalan multiorgan. Patogen ini mampu mengeluarkan banyak sekali toksin, enzim, dan protein virulensi, yang ekspresinya diatur oleh sistem penginderaan kuorum Agr. Aktivasi sistem pada kepadatan sel yang tinggi merangsang produksi faktor virulensi dan memperburuk infeksi. *Staphylococcus aureus* juga memicu respons inflamasi melalui aktivasi berbagai sel imun seperti neutrofil, makrofag, dan sel T, dan mampu membunuh sel inang melalui apoptosis, piroptosis, nekroptosis, atau autofagi. Infeksi *Staphylococcus aureus*, yang mencakup *Staphylococcus aureus* yang resistan terhadap methicillin

(MRSA), dikaitkan dengan penyakit seperti dermatitis atopik, fibrosis kistik paru, pneumonia, dan infeksi kaki diabetik (Chen *et al.*, 2022).

*Staphylococcus aureus* adalah kokus Gram-positif dan salah satu patogen manusia utama yang menyebabkan berbagai penyakit mulai dari infeksi kulit ringan hingga sepsis dan kegagalan organ. Pengendalian virulensi pada *Staphylococcus aureus* dikoordinasikan oleh sistem penginderaan kuorum yang dikenal sebagai pengatur gen aksesori (*agr*) dan terlibat dalam pengendalian ekspresi beberapa faktor virulensi seperti  $\alpha$ -toksin, hemolisin, dan modulin yang larut dalam fenol (PSM). Aktivasi sistem *agr* terjadi ketika konsentrasi peptida penginduksi otomatis (AIP) berada pada tingkat tertentu, yang menghasilkan ekspresi RNAIII yang mengatur produksi toksin dan enzim virulensi. PSM, seperti PSM $\alpha$  dan  $\delta$ -toksin, bersifat sitolitik dan proinflamasi dan terlibat dalam penyebaran koloni dan pembentukan biofilm. PSM $\alpha$  telah terbukti merusak keratinosit dan memicu pelepasan alarmin seperti IL-36 dan IL-1 $\alpha$  serta berkontribusi terhadap peradangan kulit. *Staphylococcus aureus* juga memiliki kapasitas untuk menginduksi berbagai bentuk kematian sel terprogram dalam sel inang seperti apoptosis, nekroptosis, piroptosis, dan autofagi. Toksin  $\alpha$  dan leukocidin Panton-Valentine (PVL) terlibat dalam proses tersebut, yang menyebabkan patogenesis penyakit seperti pneumonia dan dermatitis atopik (Cheung *et al.*, 2021)

## 2.9 Partisi

Partisi adalah teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kelarutan antara dua fase cair yang tidak dapat bercampur, umumnya pelarut organik dan air. Teknik ini adalah teknik yang lazim dalam pemisahan senyawa bioaktif dari sumber alaminya, seperti tanaman atau mikroorganisme, sebagai langkah awal pemurnian sebelum analisis lebih lanjut. Peran utama dari proses ini adalah untuk memisahkan senyawa kompleks dalam ekstrak mentah menjadi fraksi sederhana berdasarkan polaritasnya (Truong *et al.*, 2021). Melalui pemilihan pelarut, senyawa polar akan larut dalam fase air, sedangkan senyawa nonpolar akan berpindah ke fase organik. Proses ini bersifat universal, mudah dilakukan, dan

akan menyebabkan senyawa target terkonsentrasi dalam fraksi tertentu (Tong *et al.*, 2023).

## 2.10 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah suatu teknik pemisahan dengan menggunakan prinsip distribusi suatu zat dalam dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Adanya perbedaan migrasi dari masing-masing komponen menjadi alasan mengapa pemisahan ini dapat terjadi (Charismawati dkk., 2021). Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode kromatografi yang memisahkan komponen-komponen berdasarkan perbedaan kepolaran antara sampel dan pelarut fase gerak yang digunakan. KLT umumnya digunakan untuk berbagai keperluan seperti menentukan jumlah komponen dalam campuran, mengidentifikasi senyawa serta yang utama untuk mengevaluasi kemurnian dan identitas suatu senyawa isolat dengan menggunakan nilai faktor retensi ( $R_f$ ) sebagai parameter. Nilai  $R_f$  berkisar antara 0,00 hingga 1,00 dihitung hingga dua desimal. Bercak yang terdeteksi menunjukkan senyawa tertentu yang terkandung dalam ekstrak (Putri dkk., 2024).

Proses elusi dilakukan di dalam sebuah chamber yang harus dijenuhkan terlebih dahulu dan ditutup rapat sebelum plat KLT dimasukkan. Tujuan dari penjenuhan ini adalah untuk memastikan bahwa uap eluen terdistribusi secara merata di seluruh chamber sehingga eluen dapat bergerak dengan kecepatan yang sama di seluruh permukaan plat KLT. Setelah elusi selesai plat KLT dikeluarkan dari chamber, dikeringkan dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 dan 366 nm. Pengamatan ini bertujuan untuk mendeteksi keberadaan suatu senyawa dalam sampel yang dianalisis (Mutiara dkk., 2023). Selain sampel dan adsorben, fase gerak juga merupakan komponen penting lainnya dalam sistem KLT. Fase gerak dapat berupa satu pelarut organik atau campuran pelarut organik. Untuk menentukan fase gerak apa yang perlu digunakan dalam pengujian KLT, proses optimasi fase gerak dapat dilakukan. Optimasi fase gerak dicapai melalui penentuan sifat fisik dan kimia analit yang akan dianalisis dan jenis fase diam adsorben yang digunakan. Salah satu sifat penting dari fase gerak adalah harus diadsorpsi oleh adsorben. Saat fase gerak melewati permukaan gel silika, ia

memindahkan analit di sepanjang fase diam jika fase gerak tertarik ke adsorben. Daya elusi fase gerak ditingkatkan oleh polaritas (Nichairin dan Mita, 2023). Fase stasionernya adalah silika, alumina atau selulosa yang menempel pada kaca atau plastik.

Keuntungan KLT adalah deteksi beberapa mikotoksin dari satu sampel, kuantitasi yang baik, akurasi dan presisi yang sama dengan HPLC. Kerugiannya adalah, teknisi terampil diperlukan, praperlakuan sampel, memakan waktu, banyak peralatan, dan analisis per sampel (Lestari dan Rostinawati, 2023).

### **2.11 Mikrodilusi**

Uji mikrodilusi adalah metode standar untuk pengujian kepekaan antimikroba secara kuantitatif, yang telah dianjurkan oleh Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dan telah memperoleh standar internasional ISO 20776-1. Metode ini melibatkan pengenceran dua kali lipat berulang dari agen antimikroba dalam media kultur cair (misalnya Mueller-Hinton Broth) dalam mikroplate 96-*well* dan inokulasi dengan inokulum bakteri yang telah distandarkan kekeruhannya sesuai dengan standar 0,5 McFarland, yang menghasilkan konsentrasi akhir sekitar  $5 \times 10^5$  CFU/mL. Setelah inkubasi 16–20 jam pada suhu 35–37°C, pertumbuhan bakteri diamati secara visual atau menggunakan indikator warna resazurin, yang berubah dari biru menjadi merah muda sebagai indikasi aktivitas metabolisme sel (Vanegas *et al.*, 2021). Keunggulan teknik mikrodilusi meliputi penggunaan reagen dalam jumlah minimal, kemampuan untuk menguji beberapa konsentrasi antimikroba secara bersamaan, dan kemudahan dalam mengamati hasilnya. Metode ini juga memungkinkan penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC) yang akurat dan penting dalam menentukan aktivitas antimikroba dari senyawa uji.

Dalam sebuah penelitian oleh Oh *et al.* (2021), teknik mikrodilusi digunakan untuk menemukan MIC exebacase terhadap berbagai isolat bakteri, yang mengonfirmasi reproduktifitas dan keakuratan metode ini dalam menguji aktivitas antimikroba. Meskipun metode ini bermanfaat, metode ini terbatas, terutama

untuk pengujian obat hidrofobik atau obat yang sangat berwarna yang cenderung mengganggu pembacaan kolorimetrik hasil. Untuk tujuan tersebut, modifikasi seperti metode mikrodilusi agar telah dikembangkan yang memungkinkan seseorang untuk berhasil menguji obat tersebut. Selain itu, kemajuan teknologi mikrofluida memungkinkan miniaturisasi metode mikrodilusi, misalnya, perangkat mikrokapiler, yang meningkatkan efisiensi dan pengujian skala besar melalui penggunaan reagen bervolume lebih kecil (Needs *et al.*, 2022).

### **2.12 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS)**

Kromatografi Cair-Spektrometri Massa (LC/MS-MS) adalah metode analisis yang menggabungkan dua teknik utama untuk memisahkan dan menganalisis komponen dalam sampel. Teknik pertama, kromatografi cair, digunakan untuk memisahkan senyawa berdasarkan sifat fisikokimia, seperti polaritas, ukuran, dan interaksi lainnya. Proses ini memastikan bahwa berbagai komponen dalam sampel dipisahkan secara efektif saat bergerak melalui kolom kromatografi menggunakan pelarut cair. Setelah proses verifikasi selesai, teknik kedua yaitu spektrometri massa yang berperan dalam mendeteksi dan mengidentifikasi senyawa yang terpisah. Dalam spektrometri massa, molekul dalam sampel diubah menjadi ion-ion yang dilepaskan. Ion-ion ini kemudian dianalisis berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (Anggraeni dkk., 2024).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilaksanakan sejak bulan Oktober 2024 sampai bulan Maret 2025 yang bertempat di Laboratorium *Biomassa* UPA Lab Terpadu Universitas Lampung. Analisis LC-MS/MS dilakukan di Laboratorium Forensik Badan Reserse Polri Sentul Bogor.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat cawan petri, gelas kimia, pipet tetes, erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, gunting, *cutter*, spidol, *spinbar*, spatula, kertas saring, aluminium foil, kapas, blender, gunting, spidol, plastik *wrap*, *coverglass*, pinset, mikropipet 1000  $\mu\text{L}$  & 100  $\mu\text{L}$ , plat KLT, mikrotip, jarum ose bulat, karet gelang, bunsen, *autoclave* Tomy SX-700, *laminar air flow* ESCO/AVC4A1, saringan, *cylinder cup*, drying oven Jisico, *hot plate* dan neraca analitik Wigen Houser.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah air laut buatan (NaCl dan akuades), akuades, alkohol 70%, agar *swallow*, spirtus, DMSO, etil asetat, *Triptic Soy Broth* (TSB), heksan, ciprofloxacin, limbah ampas tebu, reagen visualisasi KLT meliputi  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  (10% Ce(IV) dan 15%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  dalam akuades), ninhidrin (0,2 g ninhidrin + 100 mL etanol), dan dragendorf (Bismut(III) nitrat, asam tartarat, kalium iodida dan akuades).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1 Aklimatisasi dan Identifikasi secara Makroskopis Aktinomisetes

Aklimatisasi dilakukan dengan menumbuhkan isolat aktinomisetes pada media standar *International Streptomyces Project 2* (Lampiran 1) sebagai langkah awal. Setelah media disiapkan, sterilisasi dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15-20 menit. Isolat aktinomisetes kemudian ditumbuhkan pada media ISP2 dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28-30°C untuk pertumbuhan awal. Setelah berhasil tumbuh pada media ISP2 isolat dipindahkan ke media *bagasse sugarcane agar* (BSA) dengan dua variasi yaitu media yang disaring dan tidak disaring. BSA adalah media agar yang terbuat dari ampas tebu. Pembuatan media BSA mengacu pada metode Ejaz and Suhail (2021) dengan modifikasi yaitu melarutkan 6 g serbuk BSA ke dalam 150 mL air laut buatan. Campuran tersebut kemudian digunakan dalam dua variasi yaitu melalui proses penyaringan dan tanpa penyaringan. Sebanyak 100 mL media kemudian ditambahkan 3 g agar dan dipanaskan kembali hingga larut. Media BSA ini kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan mengeras. Satu ose isolat 18A13O1 kemudian digoreskan pada media BSA dan diinkubasi selama 7 hari. Aktinomisetes yang tumbuh pada dua media, kemudian diamati secara makroskopis untuk melihat media mana yang mendukung pertumbuhan paling optimal. Media dengan pertumbuhan terbaik kemudian dipilih sebagai media peremajaan dan isolat ditumbuhkan kembali pada media tersebut. Proses peremajaan dilakukan dengan inkubasi pada suhu 28–30°C selama 7 hari. Setelah inkubasi, pertumbuhan diamati kembali secara makroskopis.

#### 3.3.2 Identifikasi Mikroskopis

Identifikasi secara mikroskopis merujuk dari Setiawan *et al.* (2021) dilakukan dengan cara meletakkan *coverslip* pada sudut 45° dalam media yang sudah memadat, kemudian strain aktinomisetes diambil menggunakan jarum ose steril dan digores pada media dekat *coverslip* serta diinkubasi selama 7 hari. Setelah tahap inkubasi, *coverslip* yang ditumbuhi strain aktinomisetes ditarik dengan hati-hati dan diletakkan di atas *objek glass*. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan menggunakan mikroskop Axio Zeiss Image A1 perbesaran 400 M.

### 3.3.3 Kultivasi, Kokultivasi dan Ekstraksi

Untuk proses fermentasi aktinomisetes, inokulum disiapkan dengan menumbuhkan biakan dalam media cair yang mengandung 1 gram ampas tebu dalam 25 mL air laut steril. Koloni isolat 18A13O1 hasil peremajaan kemudian diinokulasi secara aseptik ke dalam media cair dan diinkubasi selama 7 hari. Setelah inkubasi, inokulum digunakan untuk fermentasi pada media ampas tebu melalui dua prosedur yaitu kultivasi (kultur tunggal) dan kokultivasi dengan bakteri uji.

Kultivasi dilakukan dengan cara menambahkan 20 gr ampas tebu kedalam cawan petri ukuran 90 cm. Sebanyak 2 mL inokulum cair kemudian dituangkan kedalam media dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 14 hari dalam kondisi statis. Untuk kokultivasi, 10 mL inokulum bakteri  $1,0 \times 10^8$  CFU/ML (mengacu pada standar *McFarland*) dibuat menggunakan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) dan diinkubasi selama 2 jam. Pada hari keempat kokultivasi, inokulum bakteri *Staphilococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* ditambahkan kedalam media yang telah ditumbuhi aktinomisetes sebanyak 0,2 mL. Kokultivasi dilakukan pada suhu 30°C selama 14 hari (Setiawan *et.al.*, 2022). Hasil dari kultivasi dan kokultivasi yang telah berhasil tumbuh kemudian diekstraksi menggunakan pelarut diklorometana (DCM) dan metanol dengan perbandingan 1:1 sebanyak 40 mL. Setelah 2 jam proses maserasi (perendaman pelarut), larutan diekstrak dan dipipet lalu dimasukkan ke dalam vial. Ekstrak ini kemudian dipisahkan menggunakan corong pisah untuk memisahkan fase organik dan fase air. Fase DCM (organik) dipartisi lebih lanjut dengan menambahkan air sebanyak 3 kali pengulangan. Campuran dikocok dan dibiarkan hingga lapisan terpisah lalu fase organik dipisahkan dari fase air menggunakan corong pisah. Proses ini dilakukan untuk memastikan senyawa yang larut dalam pelarut organik dapat terpisah sempurna dari senyawa yang larut dalam air. Fase air kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator.

### 3.3.4 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan cara hasil ekstraksi ditotolkan pada plat KLT silika gel F<sub>254</sub> (fasa diam) dengan bantuan pipa kapiler. Sampel kemudian dielusi menggunakan fase gerak yang berbeda sesuai dengan jenis ekstrak yaitu diklorometan (DCM) untuk ekstrak fase organik dan campuran diklorometan (DCM) : methanol (9:1) untuk ekstrak fase air. Proses elusi dilakukan di dalam wadah tertutup rapat agar fase gerak tersebar merata dan hasil pemisahan lebih optimal.

Bercak-bercak yang mengindikasikan komponen ekstrak pada plat KLT divisualisasikan dibawah sinar lampu ultraviolet ( $\lambda$  : 254 nm, 366 nm), kemudian direaksikan dengan pereaksi serum sulfat (CeSO<sub>4</sub>). Setelah pola bercak terlihat jelas kemudian diukur jarak yang ditempuh bercak terhadap jarak yang ditempuh fase gerak untuk menentukan nilai Rf (*Retention Factor*). Nilai Rf dihitung untuk setiap bercak yang muncul dengan rumus berikut (Agustin dkk., 2021) :

$$Rf : \frac{\text{Jarak senyawa dari garis awal}}{\text{Jarak eluen dari garis awal}}$$

Untuk mengetahui kandungan senyawa dalam ekstrak yang lebih spesifik selanjutnya ekstrak direaksikan dengan pereaksi Dragendorf dan Ninhidrin (Setiawan *et.al.*, 2022). Komposisi masing-masing reagen dapat dilihat pada Lampiran 2.

### 3.3.5 Uji Mikrodilusi

Ekstrak dari setiap kultur dilarutkan dalam metanol 12,5% hingga mencapai konsentrasi akhir 2 mg/mL. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji mikrodilusi dalam *mikroplate 96-well*. Metode ini mengacu pada Yasmin, dkk (2024) dengan beberapa modifikasi. Pada setiap sumur, ditambahkan 50  $\mu$ L sampel dan 25  $\mu$ L suspensi bakteri uji. Bakteri uji berasal dari kultur murni *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang ditumbuhkan pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) kemudian kekeruhannya disesuaikan hingga setara dengan standar McFarland 0,5. Metanol 12,5% digunakan sebagai kontrol pelarut, ciprofloxacin sebagai kontrol positif, dan media tanpa penambahan

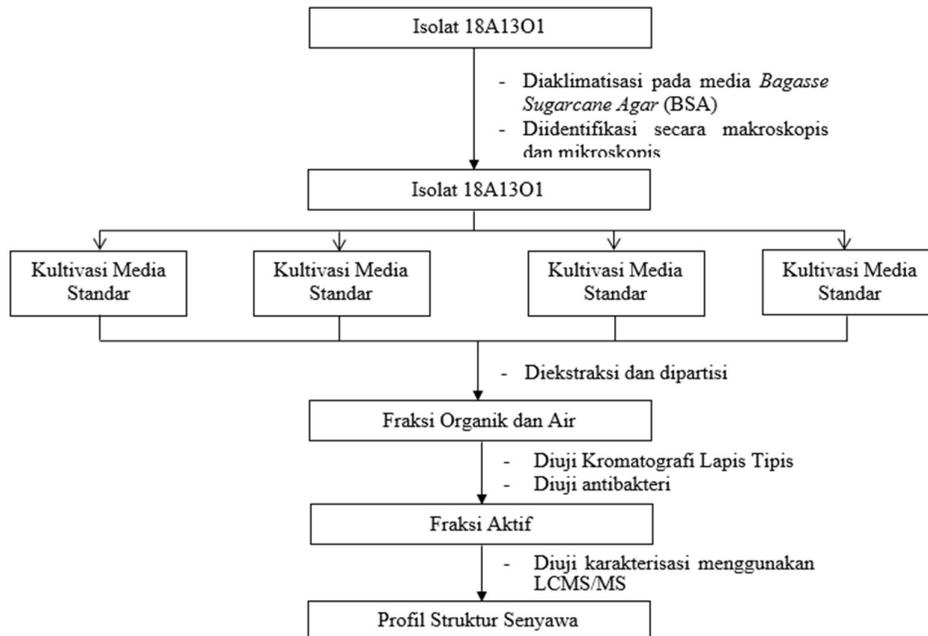
bakteri tambahan sebagai kontrol kontaminasi. Setiap perlakuan dilakukan dalam tiga ulangan (triplo) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.

Setelah inkubasi, 30 µL larutan resazurin ditambahkan ke setiap sumur dan dibiarkan untuk inkubasi lagi selama 1–4 jam. Perubahan warna setelah ditambahkan resazurin diamati dan dibandingkan dengan kontrol. Warna biru menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri (sampel aktif sebagai antibakteri), dan warna merah muda menunjukkan pertumbuhan bakteri (sampel tidak aktif).

### 3.3.6 Karakterisasi

Karakterisasi ekstrak fraksi aktif dilakukan menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS). Ekstrak aktif dari isolat unggulan dipekatkan menggunakan nitrogen hingga mendapatkan larutan 2 mg/ml kemudian dianalisis menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui informasi struktur dari senyawa bioaktif pada ekstrak.

### 3.4. Diagram Alir



Gambar 4. Diagram alir metode penelitian

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh beberapa poin kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak fraksi air dari hasil kokultivasi aktinomisetes kode 18A13O1 pada media padat ampas tebu (sampel RT3O1) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan hasil uji mikrodilusi menggunakan metode microplate. Aktivitas antibakteri ini mengindikasikan adanya senyawa bioaktif yang dihasilkan dari proses kokultivasi.
2. Diperoleh profil senyawa bioaktif dari ekstrak fraksi air yang berperan dalam aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* yaitu senyawa spinganine dengan massa molekul  $[M+H]^+$  sebesar 302.3062 m/z yang terdeteksi pada waktu retensi 12.89 menit berdasarkan hasil analisis data LC-MS/MS menggunakan Masslynx dan MZmine.

### 5.2 Saran

Sebagai tindak lanjut dari keterbatasan yang ada, penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan isolasi senyawa murni agar dapat dianalisis menggunakan teknik spektroskopi tambahan seperti *Nuclear Magnetic Resonance* (NMR) dan *Infrared* (IR) *Spectroscopy* untuk mengonfirmasi struktur senyawa secara lebih akurat. Selain itu, pengumpulan data fragmentasi MS/MS yang lebih lengkap dengan variasi energi juga perlu dilakukan guna memperoleh pola fragmentasi yang lebih representatif. Penggunaan standar referensi senyawa murni maupun basis data spektrometri massa yang lebih luas juga dianjurkan untuk meningkatkan akurasi identifikasi dan mengurangi potensi kesalahan. Dengan pendekatan ini, validitas hasil identifikasi senyawa bioaktif diharapkan menjadi lebih kuat dan kredibel.

## **DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Abidin, Z. A. Z., Azemi, S. E. F., and Zainuddin, Z. 2023. Diffusible Pigment of Actinomycete as A Source of Textile Dye. *Revelation and Science*. 13(2), 1-6.
- Agustin, R., Oktaviantari, D. E. dan Feladita, N. 2021. Identifikasi Hidrokuinon dalam Sabun Pemutih Pembersih Wajah di Tiga Klinik Kecantikan dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis dan Spektrofotometri Uv-Vis. *Jurnal Analisis Farmasi*. 6(1), 95-101.
- Angraeni, D. A., Federico, Putri, Y. A. E., dan Maelaningsih, F. S. 2024. Metode Analisis Kuantitatif Bahan Kimia Obat Sibutramin Hidroklorida pada Suplemen Pelangsing Tradisional menggunakan LC/MS-MS. *Jurnal Medika Farma*. 2(3), 266-271.
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K., and Verma, P. 2021. Current Perspective on Production and Applications of Microbial Cellulases: A Review. *Bioresour and Bioprocess*. 8(95), 1-34.
- Bian, Y., Gao, C., and Kuster, B. 2022. On The Potential of Micro-Flow LC-MS/MS in Proteomics. *Expert Review of Proteomics*. 19(3), 153-164.
- Bitwell, C., Indra, S. S., Lukas, C., and Kakoma, M. K. 2023. A Review of Modern and Conventional Extraction Techniques and Their Applications For Extracting Phytochemicals from Plants. *Scientific African*. 19, 1-19.
- Butdee, W., Saimee, Y., Suriyachadkun, C., and Duangmal, K. 2025. *Pseudonocardia Spirodela* Sp. Isolated from Duckweed and Formal Proposal to Reclassify *Pseudonocardia Antarctica* as a Later Heterotypic

Synonym Of *Pseudonocardia Alni* and Reclassify *Pseudonocardia Carboxydivorans* as *Pseudonocardia Alni* Subsp. *Carboxydivorans*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 75(1), 1-15.

- Charismawati, N. A., Erikania, S., dan Ayuwardani, N. 2021. Analisis Kadar Hidrokuinon pada Krim Pemutih yang Beredar Online dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan Spektrofotometri UV-Vis. *Jurnal Kartika Kimia*. 4(2), 58-65.
- Chen, H., Zhang, J., Dia, Y., Lv, Z., Liang, Z., Chen, J., Li, P., Liu, J., Yang, H., Tao, A., and Liou, X. 2022. Exploring the Role of *Staphylococcus aureus* in Inflammatory Diseases. *Toxin*. 14(7), 1-43.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., and Otto, M. 2021. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*. 12(1), 547-569.
- Chillakamarry, C. R., Sakinah, A. M., Zularsam, A., Sirohi, R., Khilji, I. A., Ahmad, N., and Pandey, A. 2022. Advances in Solid-State Fermentation for Bioconversion of Agricultural Wastes to Value-Added Products: Opportunities and Challenges. *Bioresource Technology*. 343, 1-7.
- Coral, D. A. P., Paz, J. J. O., Orozco, G. I. O., Muniz, C. H. A., Marina, M. A. S., Reyes, D. B., Cisneros, M. F. R., and Velasco, C. R. 2022. Molecular, Morphological and Biochemical Characterization of Actinomycetes and Their Antagonistic Activity Against Phytopathogenic Fungi. *Revista Fitotecnica Mexicana*. 45(1), 103-115.
- Detraksa, J. 2020. Evaluation of Plant Growth–Promoting *Streptomyces Sp.* SR13–2 Immobilized with Sugarcane Bagasse and Filter Cake For Promoting Rice Growth. *Food and Applied Bioscience Journal*. 8(2), 1-13.

- Djebaili, R., Pellegrini, M., Smati, M., Gallo, M. D., and Kitouni, M. 2020. Actinomycete Strains Isolated from Saline Soils: Plant-Growth-Promoting Traits and Inoculation Effects on *Solanum Lycopersicum*. *Sustainability*. 12(11), 1-19.
- Dwiyani, A., Retnowati, Y., Sidik, A., Kandowangko, N. Y., and Uno, W. D. 2025. Isolation and Characterisation of Actinomycetes in the Rhizosfer *Pandanus ammaryllifolius* Plants in Gorontalo. *Journal of Advanced Research*. 2(1), 19-28.
- Elawady, M. E., Hassan, M. G., Hamed, A. A., Elbeih, H. E., and Abdelsalam, S. S. 2024. Bioactive Secondary Metabolites from Marine Actinomycetes and Their Inhibitory Effect on Bacteria of Drinking Water. *Journal of Basic and Environmental Science*. 11(1), 60-70.
- Ejaz, U., dan Sohail, M. 2021. Sugarcane Bagasse: A Promising Substrate for Solid-State Fermentation. *Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science*. 1-13.
- Fauziah, R., Widyasanti, A. dan Rosalinda, S. 2022. Perbedaan Metode Ekstraksi terhadap Kadar Sisa Pelarut dan Rendemen Total Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria ternatea L.*). *Kimia Padjajaran*. 1(1), 18-25.
- Fauziah, R., Risna, Djide, N., dan Subehan. 2022. Karakterisasi Senyawa dan Uji Aktivitas Antibakteri dari Isolat Actinomycetes Rhizosfer tanaman Teh (*Camellia sinensis L.*). *Majalah Farmasi Farmakologi*. 26(2), 74-78.
- Fikayuniar, L., Rahma, A. D., Wahyuni, A., Shafira, K., Ilham, R. N., Wulandari, S. A., dan Khasanah, Y. 2023. Kandungan Flavonoid pada Ekstrak Bunga Kamboja (*Plumeria Sp*) dengan Metode Skrining Fitokimia. *Jurnal Ilmiah Wahana Pendidikan*. 9(16), 509-516.

- Hazarika, S. N., and Thakur, D. 2020. Actinobacteria. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. 1(2), 443-476.
- Hermawati, A. H., Surtini, Arohman, A. L., dan Hariyanto. 2023. Uji Antibiotik Ciprofloxacin terhadap Pertumbuhan *Escherichia Coli* secara In Vitro. *Jurnal Insan Cendekia*. 10(3), 181-188.
- Jagannathan, S. V., Manemann, E. M., Rowe, S. E., Callender, M. C., and Soto, W. 2021. Marine Actinomycetes, New Sources of Biotechnological Products. *Marine Drugs*. 19(7), 365.
- Kamar, I., Zahara, F., Yunihami, D. dan Umairah, R., U. 2021. Identifikasi Parasetamol dalam Jamu Pegal Linu menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT). *Jurnal Kimia Sains dan Terapan*. 3(1), 24-29.
- Kayu, S. J., Kuzel, T. M., and Shafikhani, S. H. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections, Animal Modeling, and Therapeutics. *Cells*. 12 (1), 1-37.
- Khalid, H., Tariq, A., Jurrat, H., Musaddaq, R., Liaqat, I., and Muhammad, N. 2024. Actinomycetes: Ultimate Potential Source of Bioactive Compounds Production. *Futuristic Biotechnology*. 4(4), 2-5.
- Kim, J. H., Lee, N., Hwang, S., Kim, W., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B. O., and Cho, B. 2021. Discovery of Novel Secondary Metabolites Encoded in Actinomycete Genomes Through Coculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 48, 3-4.
- Kumar, A., Nirmal, P., Kumar, M., Jose, A., Tomer, V., Oz, E., Proestos, C., Zeng, M., Elobeid, T., Sneha, K., and Oz, F. 2022. Major Phytochemicals: Recent Advances in Health Benefits and Extraction Method. *Molecules*. 28(2), 1-41.

- Laila, A., Setiawan, F., Widyastuti, W., Fadhilah, M. R., Setiawan, A., Juliasih, N. L., G. R., Setiawan, W. A., Apriliana, E., Ahmadi, P., Arai, M., and Hendri, J. 2023. Exploration and Biorefinery Antimicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesia's Marine Actinomycetes. *Fermentation*. 9(4), 334.
- Lieser, B., Liebisch, G., Drobnik, W., and Schmitz, G. 2003. Quantification of Sphingosine and Sphinganine from Crude Lipid Extracts by HPLC Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Lipid Research*. 44(1), 2209-2216.
- Lestari, A. P. dan Rostinawati, T. 2023. Review Artikel: Metode Analisis Kontaminasi Aflatoksin dalam Produk Pangan. *Farmaka*. 21(2), 252-260.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., and Shivaveerakumar, S. 2023. Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 18(1), 118-143.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M. H., and Shivaveerakumar, S. 2024. Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 18(1), 118-143.
- Muadifah, A., Tilarso, D. P., Putri, D. A., T. dan Martha, R. D. 2024. Pengaruh Metode Maserasi dan Soxhletasi terhadap Kandungan Senyawa Antioksidan Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) Menggunakan LC-MS. *Prosiding Seminar Nasional Hasil Riset dan Pengabdian*. 6, 1-15.
- Mutiara, D., Safitri, A., Ranboki, A. I., and Maelaningsih, F. S. 2023. Analisis Ibuprofen pada Sediaan Jamu Pegal Linu berdasarkan Beberapa Penelitian menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Multidisiplin*. 1(11), 231-235.

- Nazir, M., Iram, A., Cekmecelioglu, D., and Demirci, A. 2024. Approaches for Producing Fungal Cellulases Through Submerged Fermentation. *Frontiers in Bioscience (Elite Ed)*. 16(1), 1-13.
- Needs, S. H., Saiprom, N., Rifaqat, Z., Imtiaz, W., Chantratita, N., Runcharoen, C., Thammachote, J., Anun, S., Peacock, S. J., Ray, P., Andrews, S., and Edwards, A. D. 2022. Miniaturised Broth Microdilution for Simplified Antibiotic Susceptibility Testing of Gram Negative Clinical Isolates Using Microcapillary Devices. *Analyst*. 147, 3558-3569.
- Ngamcharungchit, C., Chaimusik, N., Panbangred, W., Euanorasetr, J., and Intra, B. 2023. Bioactive Metabolites from Terrestrial and Marine Actinomycetes. *Molecules*. 28(15), 1-33.
- Nguyen, B. L., and Hoang, A. T. P. 2020. Screening of Cellulolytic Actinomycetes for Decomposition of Agricultural Waste. The Italian Association of Chemical Engineering. 78, 283-288.
- Nichairin, W. dan Mita, S. R. 2023. Review Artikel : Identifikasi Bahan Kimia Obat (Bko) dalam Sediaan Obat Tradisional menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Farmaka*. 21(1), 155-170.
- Oh, J. T., Ambler, J. E., Cassino, C., and Schuch, R. 2021. Development of a Broth Microdilution Method for Exebacase Susceptibility Testing. *American Society for Microbiology*. 65(7), 1-8.
- Pablo, G. 2023. Solid State Fermentation Technology using Bioreactors Design, Applications, and Technical Considerations. *Pharmaceutical Bioprocessing*. 11(1), 4-6.
- Prabhu, G., Bhat, D., Bhat, R. M., and Selvaraj, S. 2022. A Critical Look at Bioproducts Co-cultured Under Solid State Fermentation and Their

Challenges and Industrial Applications. *Waste and Biomass Valorization*. 13, 3095-3111.

- Purwaningsih, D., and Wulandari, D. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Hasil Fermentasi Bakteri Endofit Umbi Talas (*Colocasia esculenta* L) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*: Potential of Antibacterial Compound Fermentation of Endophytic Bacteria from Taro Tuber (*Colocasia esculenta* L.) againts *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 3(5), 750-759.
- Putri, R. N., Wahidah, S. N., Hosiyah, Hafidz, I. T., dan Faisal. 2023. Uji Daya Hambat Antimikroba secara Difusi Sumuran dan Difusi Paper Disk. *Journal of Science, Engineering and Information Systems Research*. 1(4), 28-33.
- Putri, A. O., Hati, M. C., Ishanti, N. P., dan Ilham, H. S. 2024. Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Beberapa Jenis Tanaman dengan Kromatografi Lapis Tipis: Literature Review. *Jurnal Kefarmasian dan Gizi*. 3(2), 45-54.
- Ramesh, C., Prasastha, V. R., Venkatachalam, M., and Dufosse, L. 2022. Natural Substrates and Culture Conditions to Produce Pigments from Potential Microbes in Submerged Fermentation. *Fermentation*. 8(9), 1-23.
- Rangseekaew, P., Rodriguez, A. B., Aree, W. P., and Manzanera, M. 2021. Deep-Sea Actinobacteria Mitigate Salinity Stress in Tomato Seedlings and Their Biosafety Testing. *Plants*. 10(8), 1-23.
- Rasheed, R. N., Poubakhtiar, A., Allaf, M. M., Baharlooiein, M., Rafiei, N., Aratboni, H. A., Ramirez, J. R. M. and Winck, F. V. 2023. Microalgal Co-Cultivation Recent Methods, Trends in Omic-Studies, Applications, and Future Challenges. *Frontiers in Bioengineering Biotechnology*. 11, 1-25.

- Safont, D. F., Marin, E. G., Ibanez, M., Pitarch, E., and Hernandez, F. 2023. Analytical Key Issues and Challenges in the LC-MS/MS Determination of Antibiotics in Wastewater. *Analytica Chimica Acta*. 1239, 1-10.
- Salsabila, N. A., dan Meylani, C. P. 2024. Proses Produksi Asam Sitrat melalui Fermentasi: Metode dan Strategi. *Journal of Integrative Natural Science*. 1(1), 10-18.
- Selegato, D. M., and Gamboa, I. C. 2023. Enhancing Chemical and Biological Diversity by Co-Cultivation. *Frontiers Microbiology*. 14, 1-24.
- Selim, M. S. M., Abdelhamid, S. A., and Mohamed, S. S. 2021. Secondary Metabolites and Biodiversity of Actinomycetes. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 19(1), 1-13.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. 2021. Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation*. 7(4), 1-10.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., and Arai, M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal Fungi*. 8(3), 1-11.
- Sheikh, H., Anand, G. G., and Shivanna, G. B. 2024. Fermentation: A Potential Strategy for Microbial Metabolite Production. *The Science of Fermentation*. 1-25.

- Silva, G. C., Kitano, I. T., Ribeiro, I. A. F., and Lacava, P. T. 2022. The Potential Use of Actinomycetes as Microbial Inoculants and Biopesticides in Agriculture. *Ecosystems and Biodiversity*. 2(1), 1-20.
- Simeis, D. D., dan Serra, S. 2021. Actinomycetes : Sumber Senyawa Bioaktif yang Tak Terbatas Tinjauan Umum Produksi Antibiotik. *Antibiotik*. 10(5), 483.
- Siro, G., Pipite, A., Christi, K., Srinivasan, S., and Subramani. 2022. Marine Actinomycetes Associated with Stony Corals: A Potential Hotspot for Specialized Metabolites. *Microorganism*. 10(7), 1-32.
- Tong, S. C., Lee, Y. Y., Tang, T. K., Chan, E. S., and Phuah, E. T. 2023. Development of Dual Stage Solvent Fractionation as an Approach to Concentrate Carotenoids from Crude Palm Oil with High Recovery: The Potential Use of Molecular Simulation as a Pre-Screening Tool. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 100(11), 889-899.
- Truong, D. H., Ta, N. T. A., Pham, T. V., Huynh, T. D., Do, Q. T. G., Dinh, N. C. G., Dang, C. D., Nguyen, T. K. C., and Bui, A. V. 2021. Effects of Solvent—Solvent Fractionation on the Total Terpenoid Content and in Vitro Anti-Inflammatory Activity of Serevenia Buxifolia Bark Extract. *Food Science and Nutrition*. 9(3), 1720-1735.
- Tuon, F. F., Dantas, L. R., Suss, P. H., and Ribeiro, V. S. T. 2022. Pathogenesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogen*. 11(3), 1-19.
- Vanegas, D., Novilo, A. A., Khachatryan, A., Andrade, L. J., Penaherrera, E., Cuzco, N., Wilches, I., Calle, J., and Tamariz, F. L. 2021. Validation of a Method of Broth Microdilution For The Determination of Antibacterial Activity of Essential Oils. *BMC Research Notes*. 14(439), 1-7.

- Veerabadharan, M., Natesan, S., Mubarakali, D., Xu, S., and Yang, F. 2021. Using Different Cultivation Strategies and Methods for The Production of Microalgal Biomass as a Raw Material for The Generation Of Bioproducts. *Chemosphere*. 285, 1-12.
- Wang, J., Huang, Z., Jiang, Q., Roubik, H., Xu, Q., Gharsallaoui, A., Cai, M., Yang, K., and Sun, P. 2023. Fungal Solid-State Fermentation of Crops and Their By-Products to Obtain Protein Resources: The Next Frontier of Food Industry. *Trends in Food Science & Technology*. 138, 628-644.
- Yafetto, L. 2022. Application of Solid-State Fermentation by Microbial Biotechnology for Bioprocessing of Agro-Industrial Wastes From 1970 To 2020: A Review and Bibliometric Analysis. *Heliyon*. 8(1), 1-17.
- Yasmin, K. Z. A., Sulistyorini, R., dan Rakhmawatie, M. D. 2024. Potensi Ekstrak Etanol Biji Melon (*Cucumis melo L.*) sebagai Antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* Penyebab Karies Gigi. *Medica Arteriana*. 6(1), 19-26.
- Ye, H., Eang, J., Shi, J., Du, J. Y., Zhou, Y. H., Huang, M., and Matahari, B. 2021. Automatic and Intelligent Technologies of Solid-State Fermentation Process of Baijiu Production: Applications, Challenges, and Prospects. *Foods*. 10(3), 1-23.
- Yulinar, F. dan Suharti, P. H. 2022. Seleksi Proses ekstraksi Daun Sirih pada Pra Rancangan Pabrik Hand Sanitizer Daun Sirih dengan Kapasitas Produksi 480 Ton/Tahun. *Jurnal Teknologi Separasi*. 8(1), 146-153.
- Zahroh, E. W., Ningsih, F. and Sjamsuridzal, W. 2022. Detection of Antimicrobial Compounds from Thermophilic Actinomycetes using One Strain Many Compounds (OSMAC) Approach. *Jurnal Biologi Lingkungan, Industri, Kesehatan*. 9(1), 76-94.

Zhang, Y., Feng, L., Hemu, X., Tan, N. H., and Wang, Z. 2024. OSMAC Strategy: *A promising way to explore microbial cyclic peptides*. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 268, 1-15.