

**OPTIMASI KONDISI KULTIVASI *Kocuria palustris* 19C38A1 SECARA
SOLID-STATE FERMENTATION DALAM PRODUKSI SENYAWA
ANTIBAKTERI**

(Skripsi)

Oleh

**Ester Monika Simarmata
2017011033**



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

ABSTRAK

OPTIMASI KONDISI KULTIVASI *Kocuria palustris* 19C38A1 SECARA SOLID-STATE FERMENTATION DALAM PRODUKSI SENYAWA ANTIBAKTERI

Oleh

ESTER MONIKA SIMARMATA

Isu bakteri patogen yang resisten menjadi perhatian serius di seluruh dunia. Untuk mengatasi permasalahan tersebut, diperlukan inovasi untuk menemukan agen antibakteri baru dari alam dengan mekanisme kerja yang berbeda. Metabolit sekunder aktinomisetes merupakan sumber potensial senyawa bioaktif. Dalam penelitian ini, telah dilakukan kultivasi *Kocuria palustris* 19C38A1 yang diisolasi dari spons yang dilakukan secara *Solid State Fermentation* (SSF) dengan variasi waktu inkubasi 5, 6, 7, dan 8 hari, kultur diekstraksi dengan etil asetat dan dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) diperoleh bahwa pada hari ke-7 sebagai hari optimal. Kultivasi *scale up* dilakukan pada kultivasi hari ke-7, ekstrak kasar etil asetat dipisahkan dengan kromatografi kolom diperoleh 4 fraksi, kemudian diuji antibakteri secara KLT Bioautografi pada masing-masing fraksi dihasilkan semua fraksi aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Fraksi F4 yang diperoleh sebagai fraksi paling aktif penghasil senyawa antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* resisten dimurnikan dengan kromatografi kolom yang menghasilkan 5 fraksi (A, B, C, D, dan E) dan selanjutnya diuji antibakteri secara KLT bioautografi yang menghasilkan semua fraksi dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dan pada fraksi D analisis KLT menunjukkan satu noda. Fraksi D tersebut yang digunakan untuk analisis FTIR dan LC-MS/MS. Hasil LCMS/MS menunjukkan bahwa senyawa antibakteri yang diperoleh merupakan senyawa peptida. Selain itu, hasil uji KLT fraksi D dengan pereaksi ninhidrin mengindikasikan adanya komponen peptida.

Kata Kunci: Aktinomisetes, Antibakteri, *Kocuria palustris*, Senyawa Metabolit, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

OPTIMIZATION CULTIVATION CONDITIONS OF *Kocuria palustris* 19C38A1 BY SOLID-STATE FERMENTATION IN THE PRODUCTION OF ANTIBACTERIA COMPOUNDS

By

ESTER MONIKA SIMARMATA

The issue of resistant pathogenic bacteria is a serious concern worldwide. To overcome these problems, innovation is needed to find new antibacterial agents from nature with different mechanisms of action. Secondary metabolites of actinomycetes are potential sources of bioactive compounds. In this study, the cultivation of 19C38A1 actinomycetes isolate isolated from sponges was carried out by Solid State Fermentation (SSF) with a variation of incubation time of 5, 6, 7, and 8 days, the culture was extracted with ethyl acetate and analyzed using Thin Layer Chromatography (TLC) obtained that on day 7 as the optimal day. Then scale up cultivation was carried out on the 7th day of cultivation, the ethyl acetate crude extract was separated by column chromatography obtained 4 fractions, then tested for antibacterial by TLC Bioautography on each fraction resulting in all fractions actively inhibiting *Staphylococcus aureus* bacteria. Fraction F4 obtained as the most active fraction producing antibacterial compounds against resistant *Staphylococcus aureus* was purified by column chromatography which produced 5 fractions (A, B, C, D, and E) and then tested for antibacterial bioautography TLC which resulted in all fractions can inhibit *Staphylococcus aureus* bacteria and in fraction D TLC analysis showed one stain. Fraction D was used for FTIR and LC-MS/MS analysis. LCMS/MS results showed that the antibacterial compounds obtained were peptide compounds. In addition, the TLC test results of fraction D with ninhydrin reagent indicated the presence of peptide components.

Keywords: Actinomycetes, Antibacterial, *Kocuria palustris*, Metabolite Compound, *Staphylococcus aureus*.

**OPTIMASI KONDISI KULTIVASI *Kocuria palustris* 19C38A1 SECARA
SOLID-STATE FERMENTATION DALAM PRODUKSI SENYAWA
ANTIBAKTERI**

Oleh

ESTER MONIKA SIMARMATA

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
2025**

Judul Penelitian : **OPTIMASI KONDISI KULTIVASI *Kocuria palustris* 19C38A1 SECARA *SOLID STATE* FERMENTATION DALAM PRODUKSI SENYAWA ANTIBAKTERI**

Nama Mahasiswa : **Ester Monika Simarmata**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2017011033**

Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

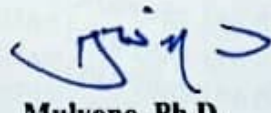


Prof. John Hendri, Ph.D.
NIP. 195810211987031001



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

**2. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerja Sama
Fakultas Matematika dan Ilmu Pegetahuan Alam**



Mulyono, Ph.D.
NIP. 197205302000032001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

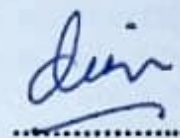
Ketua : Prof. John Hendri, Ph.D



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



Anggota : Dr. Dian Herasari, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 24 Juni 2025

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ester Monika Simarmata

Nomor Pokok Mahasiswa : 2017011033

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan bahwa skripsi yang berjudul "**Optimasi Kondisi Kultivasi *Kocuria palustris* 19C38A1 Secara *Solid State Fermentation* Dalam Produksi Senyawa Antibakteri**" adalah benar hasil karya sendiri. Selanjutnya saya tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi ini digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, Juni 2025

Yang menyatakan



Ester Monika Simarmata
NPM. 2017011033

RIWAYAT HIDUP

Penulis dilahirkan di desa Sumbermulyo Kabupaten Tanggamus, pada tanggal 1 Agustus 2002. Penulis merupakan anak pertama dari pasangan Bapak Viktor Simarmata dan Ibu Helaria Sutanti. Penulis memiliki satu adik laki-laki.

Penulis menyelesaikan pendidikan taman kanak-kanak di TK Bina Bakti Sumbermulyo pada tahun 2008. Penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Sumbermulyo dan lulus tahun 2014. Penulis melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 2 Sumberejo yang diselesaikan pada tahun 2017. Penulis melanjutkan Sekolah Menengah Atas di SMA Negeri 1 Sumberejo dan selesai pada tahun 2020. Tahun 2020 penulis terdaftar sebagai mahasiswa Kimia FMIPA Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN).

Pada tahun 2023, penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di desa Karang Agung Kecamatan Way Tenong, Kabupaten Lampung Barat. Penulis juga melakukan Praktik Kerja Lapangan pada tahun 2023 di Laboratorium Biopolimer dan UPA Laboratorium Terpadu, Universitas Lampung dengan judul **“Evaluasi dan Optimasi Parameter Waktu Kultivasi Aktinomisetes Laut Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Patogen Klinis”**.

MOTTO

“Jangan pernah mengeluh dengan apa yang engkau ijinkan terjadi”.

(Anonim)

“Seseorang telah mendengar apa yang belum kamu dengar; seseorang telah melihat apa yang belum kamu lihat; seseorang telah mengetahui apa yang belum kamu ketahui. Keberhasilanmu tergantung pada keinginanmu untuk diajar oleh mereka”.

(Anonim)

PERSEMBAHAN

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yesus Kristus yang senantiasa selalu menuntun langkahku, menjadikan aku manusia yang berakal dan berilmu.

Dengan segala kerendahan hati, kupersembahkan karya kecil ini sebagai tanda hormat, tanggung jawab, dan baktiku

Kepada:

Kedua Orang Tuaku

Bapak Viktor Simarmata dan Ibu Helaria Sutanti

Yang membuat segalanya menjadi mungkin sehingga saya bisa sampai pada tahap skripsi ini akhirnya selesai. Terima kasih atas segala pengorbanan, nasihat dan doa baik yang tidak pernah berhenti kalian berikan kepadaku.

Adikku,

Dionisius Simarmata

Atas dukungan dan semangat yang diberikan.

**Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih M.Si.,
dan Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia**

Yang telah membimbingku selama menempuh pendidikan sarjana di Jurusan Kimia Universitas Lampung.

Seluruh sahabat dan teman-teman terdekatku yang selama ini telah memberikan banyak dukungan, bantuan, dan motivasi kepadaku.

Serta

Almamaterku Tercinta
Universitas Lampung

SANWACANA

Segala puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yesus Kristus atas segala Berkat dan Kasih Karunia-Nya yang melimpah, penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Optimasi Kondisi Kultivasi *Kocuria palustris* 19C38A1 Secara Solid State Fermentation Dalam Produksi Senyawa Antibakteri”**.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung. Dalam pelaksanaan dan penulisan skripsi ini tidak lepas dari kesulitan dan kendala. Namun atas berkat dan kasih karunia Tuhan penulis dapat melalui segala sesuatunya dengan bantuan dan dukungan semangat dari orang-orang terkasih di sekitar penulis. Dalam kesempatan ini, penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua ku tercinta, Bapak Viktor Simarmata dan Ibu Helaria Sutanti yang telah berjuang dan berkorban demi penulis serta senantiasa memberikan semangat dan dukungan moral maupun materi.
2. Bapak Prof. John Hendri Ph.D., selaku dosen pembimbing I yang telah dengan sabar membimbing, memberikan masukan, dan mengarahkan penulis sejak awal hingga akhir penulisan skripsi ini.
3. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih M.Si., selaku dosen pembimbing II atas ketersediaannya memberikan bimbingan, saran dan kritik dalam proses penyelesaian skripsi ini.
4. Ibu Dr. Dian Herasari M.Si., selaku pembahas pada ujian skripsi. Terima kasih untuk masukan, arahan dan saran yang diberikan pada penyusunan skripsi ini.
5. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si., selaku Ketua Jurusan Kimia dan pembimbing akademik yang sejak awal masa studi hingga kelulusan selalu menjadi tempat bertanya, berdiskusi, dan mencari arahan. Terima kasih atas perhatian dan

dukungan selama perjalanan akademik ini, serta dorongan untuk selalu tetap semangat.

6. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
7. Bapak Ibu dosen dan seluruh staf Jurusan Kimia atas segala ilmu, motivasi, dan pengalamannya yang telah diberikan kepada penulis selama menempuh pendidikan di kampus.
8. Adikku Dionisius Simarmata, sepupu-sepupuku serta keponakanku yang telah memberikan dukungan dan semangatnya kepada penulis.
9. Kak Fendi Setiawan, S.Si., M.Si., selaku mentor penelitian yang telah banyak sekali membantu, memberikan dukungan, kritik, saran, motivasi, dan semangat sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
10. JHR 20: Alda Nurmala Dewi, Jordi Setiawan dan Muhammad Irfan Hanafi yang telah memberikan segala motivasi, dukungan, semangat, pengalaman, cerita, canda, suka duka penelitian dan penyusunan skripsi ini.
11. Mahasiswa Prof. John; Ibu Dr. Widyastuti, M.Si., kak Ridho Nahrowi M.Si., kak Laras Gadis Ermadi, S.Si., kak Wahidatun Nur Khasanah, S.Si., kak Adhella Pragustiyanti Mintarjo, S.Si., kak Wahyu Indah Silvi Budiyanti S.Si., yang telah memberikan semangat, saran, dan bantuannya sehingga penyusunan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
12. Kakak peneliti di UPA Laboratorium Terpadu Universitas Lampung: mba Rosyi dan kak Ibnu yang selalu memberikan semangat dan arahan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitiannya dengan baik.
13. Teman baikku Septi, Lola, mba Rahel, Serin atas segala motivasi, semangat, dan dukungan selama ini kepada penulis.
14. Teman-temanku Agil, Alda, Gita, Eva, Hamida, Ida, Sabrina, dan Fathia yang telah memberikan dukungan, semangat serta kebersamaan selama proses perkuliahan hingga penyusunan skripsi ini. Terima kasih atas setiap waktu, diskusi, serta bantuan yang telah kalian berikan kepada penulis.
15. Vio, Umi, dan Senna atas semangat, saran, dan bantuan yang telah kalian berikan kepada penulis.

16. Teman-teman di laboratorium UPA Laboratorium Terpadu Universitas Lampung yang tidak bisa disebutkan satu persatu terima kasih telah kebersamai selama penelitian di laboratorium.
17. Teman-teman Kimia Angkatan 2020 yang telah membantu hingga terselesaikannya skripsi ini.
18. Seluruh pihak yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu.yang secara langsung atau tidak langsung telah memberikan dukungan dan bantuanya, baik secara moril dan materiil sehingga pelaksanaan penelitian dapat terlaksana dengan baik.

Bandar Lampung, 02 Juli 2025
Penulis,

Ester Monika Simarmata

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Aktinomisetes	4
2.2 Aktinomisetes Laut.....	6
2.3 <i>Kocuria</i>	7
2.4 Kultivasi	8
2.5 <i>Solid-State Fermentation</i> (SSF).....	11
2.6 Ekstraksi	12
2.7 Kromatografi	13
2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	13
2.7.2 Kromatografi Kolom.....	15
2.8 Senyawa Metabolit Sekunder Aktinomisetes Laut.....	16
2.9 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.10 Antibakteri	19
2.11 Spektroskopi <i>Fourier Transform Infrared</i> (FTIR)	22
2.12 <i>Mass Spectroscopy</i> (MS)	24
III. METODE PENELITIAN.....	27
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	27
3.2 Alat dan Bahan	27
3.3 Prosedur Penelitian	28

3.3.1 Pembuatan Media.....	28
3.3.1.1 Media koloid kitin agar	28
3.3.1.2 Media Koloid Kitin Cair	28
3.3.1.3 Media Kulit Udang.....	28
3.3.1.4 Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA).....	29
3.3.1.5 Media <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	29
3.3.2 Biomaterial	29
3.3.3 Peremajaan mikroba.....	29
3.3.3.1 Peremajaan isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	30
3.3.3.2 Peremajaan bakteri patogen	30
3.3.4 Identifikasi Aktinomisetes	30
3.3.5 Kultivasi dan Ekstraksi Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	30
3.3.6 Kromatografi Lapis Tipis.....	31
3.3.7 Kultivasi <i>Scale up</i> dan Pemisahan Senyawa Bioaktif.....	31
3.3.8 Skrining aktivitas antibakteri	32
3.3.9 Pemurnian Senyawa Bioaktif Isolat Aktinomistes 19C38A1	32
3.3.10 Karakterisasi	33
3.3.10.1 Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR).....	33
3.3.10.2 <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometer/Mass</i> <i>Chromatography</i> (LC-MS/MS).....	33
3.3.11 Diagram Alir Penelitian.....	33
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	34
4.1 Peremajaan Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	34
4.2 Konfirmasi Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	35
4.3 Kultivasi dan Ekstraksi <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	36
4.4 Kromatografi Lapis Tipis	38
4.5 Kultivasi <i>Scale up</i> Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 ..	38
4.6 Pemisahan Senyawa Bioaktif Ekstrak Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria</i> <i>palustris</i> 19C38A1	42
4.7 Skrining Aktivitas Antibakteri.....	44
4.8 Pemurnian Senyawa Bioaktif Isolat Aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	45
4.9 Karakterisasi	48
4.9.1 Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)	48
4.9.2 <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometer/Mass</i> <i>Chromatography</i> (LC-MS/MS)	48

V. SIMPULAN DAN SARAN.....	53
5.1 Simpulan.....	53
5.2 Saran	53
DAFTAR PUSTAKA.....	54
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil pengelompokan fraksi besar hasil pemisahan ekstrak kasar etil asetat isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1.....	43
2. Hasil analisis gugus fungsi fraksi aktif isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1	49

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Fraksi C38BK2FA spektrum ESI TOF MSMS, $[M + H]^+ = m/z$ 365,2344 (Setiawan, et al., 2022).....	26
2. Isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 dalam media koloid kitin agar	34
3. Hasil uji mikroskopik isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1.....	35
4. Ekstrak kasar etil asetat (a) hari ke-5 (b) hari ke-6 (c) hari ke-7 dan (d) hari ke-8.....	37
5. Profil KLT ekstrak kasar etil asetat aktinomisetes (a) UV 254 (b) UV 366 (c) pereaksi $Ce(SO_4)_2$	39
6. (a) Inokulum isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 dalam media koloid kitin 1%, (b) Kultivasi isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 dalam media kulit udang selama 7 hari	40
7. (a) Maserasi kultur isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 (b) Ekstrak kasar etil asetat	41
8. Profil KLT ekstrak kasar etil asetat hari ke-7 kultivasi scale up (a) UV 254 (b) UV 366 dan (c) $Ce(SO_4)_2$	42
9. Profil KLT fraksi hasil pemisahan ekstrak kasar etil asetat (a) UV 254 (b) UV 366 (c) $Ce(SO_4)_2$ (d) reagen ninhidrin dan (e) reagen Dragendorff	43
10. Hasil uji KLT bioautografi fraksi hasil pemisahan ekstrak isolat aktinomisetes <i>Kocuria palustris</i> 19C38A1 terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (a) simplo (b) duplo	45
11. Profil KLT hasil pemurnian fraksi aktif F4 (a) UV 254 (b) UV 366 (c) $Ce(SO_4)_2$ (d) reagen ninhidrin dan (e) reagen Dragendorff	46
12. Hasil uji KLT bioautografi fraksi hasil pemurnian fraksi aktif F4 terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> (a) simplo (b) duplo	47
13. Spektrum FTIR sampel C38F4D	48

14.Kromatogram LC-MS/MS sampel C38F4D	50
15.Spektrum LC-MS/MS sampel C38F4D	50

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan laporan Ancaman Resistensi Antibiotik tahun 2019 dari *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) menyatakan bahwa resistensi antimikroba adalah ancaman kesehatan masyarakat global yang mendesak, menyebabkan kematian sedikitnya 1,27 juta orang di seluruh dunia (CDC, 2019). Resistensi bakteri terhadap antibiotik telah diketahui lebih dari 50 tahun yang lalu sejak akhir tahun 1950-an, sebagian besar isolat *Staphylococcus aureus* mengembangkan resistensi terhadap penisilin untuk mengobatinya. Namun demikian, dalam jangka waktu yang lama resistensi antibiotik tidak menjadi masalah yang serius di seluruh dunia. Sejak tahun 1960-an, kelas obat baru telah dikembangkan, seperti vankomisin dan metisilin yang menunjukkan bahwa masalah resistensi dapat dengan mudah diselesaikan melalui sintesis antibiotik molekul baru. Namun, pada dekade-dekade berikutnya bakteri mengembangkan banyak mekanisme resistensi antibiotik berbeda yang melindungi dirinya dari efek antibiotik tersebut dan berakibat resisten terhadap antibiotik yang berkelanjutan (Mancuso *et al.*, 2021).

Tahun 2050 diprediksi bahwa jumlah kematian akibat infeksi bakteri akan terus meningkat hingga mencapai 10 juta orang per tahun. Situasi ini menjadikan infeksi sebagai salah satu ancaman terbesar dalam bidang kesehatan global. Di Indonesia, salah satu infeksi yang sering terjadi adalah infeksi nosokomial yang disebabkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Selain itu, dari data WHO prevalensi infeksi nosokomial pada negara berkembang cukup tinggi berkisar 15,74% dimana jauh lebih tinggi dari negara maju dengan kasus berkisar 4,8% sampai 15,5%. Infeksi tersebut merupakan penyakit yang bersifat mengancam nyawa sehingga membutuhkan penanganan cepat (Millah dkk. 2022). Salah satu

solusi untuk mengatasi resistensi antimikroba adalah dengan mengeksplorasi sumber alami, seperti mikroorganisme aktinomisetes (Balachandar *et al.*, 2018).

Keragaman aktinomisetes sangat penting dalam produksi antibiotik. Bakteri ini adalah mikroorganisme yang bermanfaat secara industri yang menghasilkan berbagai macam antibiotik dan terlibat dalam produksi antibiotik yang sangat menarik bagi industri farmasi (Alqahtani *et al.*, 2022). Aktinomisetes tersebar luas di alam, antara lain di tanah, dasar danau, lumpur, kompos, serta di laut. Hal inilah yang mendorong semakin banyaknya penelitian-penelitian mengenai penelusuran senyawa aktif antibiotik dari aktinomisetes. Saat ini, penemuan-penemuan senyawa aktif baru dari aktinomisetes tanah telah mengalami penurunan dari tahun ke tahun, sehingga banyak peneliti yang mulai mengalihkan perhatiannya kepada aktinomisetes laut. Hal ini disebabkan karena biodiversitas laut yang lebih tinggi dibandingkan tanah. Keanekaragaman kondisi laut yang dipengaruhi oleh banyak hal, antara lain iklim, kedalaman laut, kadar garam, dan pertemuan arus laut, sangat menjamin biodiversitas organisme yang tinggi di dalamnya, termasuk keanekaragaman metabolit sekunder yang dihasilkannya (Burhamzah dan Rante, 2019).

Kemampuan aktinomisetes untuk memproduksi senyawa bioaktif dipengaruhi oleh proses fermentasi, dan kondisi fisik seperti waktu inkubasi menjadi hal penting untuk aktinomisetes dapat memproduksi senyawa metabolit. Pada penelitian Setiawan *et al.*, 2021 hasil kultivasi aktinomisetes menunjukkan bahwa kulit udang dapat digunakan sebagai media kultur alternatif. Pada penelitiannya Laila *et al.*, 2023, melakukan kultivasi aktinomisetes dengan *Solid State Fermentation* (SSF) pada media limbah cangkang udang yang dikultur selama 14 hari, menunjukkan bahwa *Kocuria palustris* dan ekstraknya mengandung komponen alkaloid yang berperan dalam aktivitas antimikroba. *Kocuria palustris* 19C38A1 adalah salah satu isolat unggulan yang memiliki aktivitas antijamur terhadap *Fusarium oxysporum* dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti kitoooligosakarida (Setiawan *et al.*, 2022). Ekstrak isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 yang dikultur 14 hari pada media limbah cangkang kulit udang

ini juga telah terbukti menghasilkan senyawa bioaktif dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (Laila *et al.*, 2023). Oleh karena itu, optimasi waktu kultivasi perlu dilakukan untuk meningkatkan efisiensi produksi senyawa bioaktif dengan aktivitas maksimal terhadap *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan uraian diatas, pada penelitian ini akan dilakukan optimasi kultivasi *Kocuria palustris* 19C38A1 secara SSF dalam memproduksi senyawa bioaktif sebagai antibakteri.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini, yaitu:

1. Memperoleh waktu kultivasi yang optimal dalam produksi senyawa metabolit sekunder dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 menggunakan metode *Solid State Fermentation* (SSF).
2. Memperoleh senyawa metabolit sekunder dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 yang berpotensi sebagai senyawa antibakteri.
3. Mengkarakterisasi senyawa metabolit bioaktif dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk memberikan informasi mengenai senyawa metabolit sekunder dari aktinomisetes laut sebagai senyawa antibakteri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Aktinomisetes

Aktinomisetes dikenal sebagai bakteri Gram positif dan ditandai dengan terbentuknya miselium udara dan substrat pada media padat, juga adanya spora dengan permukaan spora yang berbeda, dan kandungan DNA Guanin + Sitosin yang tinggi. Berdasarkan kriteria morfologi dan kimia, aktinomisetes telah dikelompokkan ke dalam genera yang berbeda; *Streptomyces* adalah genera yang paling umum diisolasi dari ordo Actinomycetales karena sangat penting dalam ilmu kedokteran, ekologi, dan industri bioteknologi (Selim *et al.*, 2021).

Aktinomisetes adalah mikroorganisme Gram-positif berfilamen yang termasuk dalam filum Actinobacteria yang mencakup salah satu unit taksonomi terbesar di antara 18 garis keturunan penting yang dikenal pada bakteri (Davies-Bolorunduro *et al.*, 2021). Actinobacteria menunjukkan beragam morfologi, perbedaan utamanya terletak pada ada tidaknya substrat miselium atau miselium udara, warna miselium, produksi pigmen melanoid difusi, dan struktur serta penampilan spora. Aktinomisetes menunjukkan beragam morfologi, termasuk kokoid (*Micrococcus*) dan batang-kokoid (*Arthrobacter*), serta sebagai bentuk hifa yang terfragmentasi (*Nocardia spp.*), dan juga bentuk dengan miselia bercabang permanen dan sangat berdiferensiasi (*Streptomyces spp.*, *Frankia*). *Rhodococci* membentuk filamen memanjang pada substrat dan tidak menghasilkan miselium sejati sedangkan *corynebacteria* tidak menghasilkan miselia sama sekali (Barka *et al.*, 2016).

Koloni aktinomisetes dewasa terdiri dari dua jenis miselia yang berbeda, yaitu miselium substrat (vegetatif) dan miselium udara (aerial miselium). Miselium substrat dan miselium udara memiliki peran yang berbeda. Miselium substrat

berperan dalam menyerap unsur hara yang dibutuhkan untuk pertumbuhan. Miselium substrat dapat menembus substrat atau tumbuh di permukaan, sedangkan miselium udara tumbuh secara vertikal. Miselium udara menutupi permukaan koloni sehingga koloni tampak berbulu dan bertepung. Miselium udara bertindak sebagai organ reproduksi, ketika nutrisi lingkungan berkurang, miselium udara berkembang membentuk rantai spora seperti fase dewasa dalam siklus hidupnya. Spora berkecambah dan berkembang menjadi miselium baru (Budi dkk., 2022). Fragmentasi miselium adalah bentuk khusus reproduksi vegetatif yang menghasilkan spora atau konidia. Fragmentasi dan segmentasi atau pembentukan konidia membantu sporulasi aktinobakteri. Tergantung pada perbedaan morfologi dan fungsinya. Karakteristik morfologi penting untuk klasifikasi aktinobakteri. Beberapa faktor seperti pertumbuhan miselium substrat, posisi dan jumlah spora, struktur permukaan spora, bentuk sporangia atau konidia, serta apakah sporangiospora mempunyai flagela atau tidak menentukan klasifikasinya. Penampilan morfologi aktinobakteri kompak, keras, dan seringkali kasar dengan permukaan kering pada media kultur dan sering ditutupi dengan miselium dan spora di udara (Hazarika *and* Thakur, 2020).

Hifa udara dapat membentuk miselium yang mengandung spora atau hifa reproduksi untuk sporulasi. Tergantung pada panjang dan jumlah spora, rantai spora morfologis dapat dibagi menjadi di- atau bisporous yang memiliki dua spora, oligosporus yang memiliki sedikit spora, dan polisporus dengan banyak spora. Untuk klasifikasi panjang rantai spora aktinobakteri, posisi, bentuk, struktur, dan warna sangat penting (Hazarika *and* Thakur, 2020).

Aktinomisetes merupakan bakteri yang tersebar luas di alam. Bakteri tersebut dapat hidup di berbagai kondisi lingkungan yang banyak mengandung unsur hara. Populasi aktinomisetes meningkat dengan adanya bahan organik yang mengalami dekomposisi. Beberapa spesies aktinomisetes dapat diisolasi dari lingkungan laut seperti pada ekosistem mangrove. Lingkungan payau pada ekosistem mangrove yang dipengaruhi oleh pasang surut air laut merupakan tempat terjadinya akumulasi bahan organik dan nutrisi. Habitat lain aktinomisetes selain di dalam

tanah adalah pada tempat-tempat ekstrim seperti daerah bekas letusan gunung berapi dan tanah lembab pada ekosistem mangrove (Anggraini dkk., 2021).

2.2 Aktinomisetes Laut

Laut adalah lingkungan yang unik untuk kelangsungan hidup mikroorganisme dan bergantung pada keanekaragaman mikroba berdasarkan nutrisi yang diberikan. Lingkungan yang unik ini memiliki kandungan metabolit sekunder yang menunjukkan sifat biologis yang sangat baik terhadap berbagai infeksi. Untuk sintesis metabolit bioaktif yang tersedia, berbagai faktornya terlibat dan berkontribusi dalam jalur metabolisme yang menyebabkan biosintesis senyawa bioaktif unik (Kadaikunnan *et al.*, 2021). Jumlah lebih banyak nutrisi yang tidak dapat diprediksi seperti karbon, nitrogen, beragam bahan kimia metabolit, produk keanekaragaman hayati, enzim dan berbagai tingkat pH, suhu, NaCl hanya terdapat pada sumber laut. Terpisah dari sumber lain, mikroba laut faktor yang sangat menarik untuk mensintesis metabolit sekunder jenis baru untuk aktivitas biologis (Almaary *et al.*, 2021).

Aktinomisetes yang hidup di habitat laut, dan terutama yang diperoleh dari organisme laut, menawarkan beragam zat bioaktif yang dirangsang oleh interaksi ekologis inangnya. Beberapa sumber laut tersebut, antara lain spons, sedimen laut, kepiting, ascidian, substrat laut, teripang, karang, ikan dan alga mempunyai hubungan simbiosis dengan aktinomisetes (Siro *et al.*, 2022). Anggota aktinomisetes dari habitat laut adalah kelompok mikroorganisme yang paling terisolasi dan berkarakter, dan pembuat metabolit sekunder bioaktif produktif dari Actinobacteria dengan tindakan organik yang menarik dan aplikasi klinis (Davies-Bolorunduro *et al.*, 2021).

Aktinomisetes dibudidayakan pada bahan dasar agar padat atau media pertumbuhan cair. Setelah memasukkan bakteri sebagai kultur starter, bakteri tersebut ditumbuhkan sesuai dengan pertumbuhan unik dan kondisi lingkungan di mana sampelnya diambil. Kondisi pertumbuhan khusus diperlukan untuk itu mengisolasi dan membudidayakan aktinomisetes laut, termasuk meniru

lingkungan laut tempat sampel diperoleh. Media pertumbuhan harus mengandung natrium, yang merupakan komponen media utama untuk pertumbuhan aktinomisetes laut baru, dan harus memiliki nilai osmotik mirip dengan air laut untuk keberhasilan isolasi. Media isolasi juga harus dilengkapi dengan sumber karbon yang berbeda, jika digabungkan sumber karbon-nitrogen, ekstrak sedimen, ekstrak spons dan alam air laut untuk meniru kondisi lingkungan alami aktivitas laut (Davies-Bolorunduro *et al.*, 2021). Media koloid kitin merupakan media selektif untuk mengisolasi dan membudidayakan mikroorganisme pendegradasi kitin. Media ini mengandung kitin koloidal, yang dibuat dengan melarutkan kitin dalam asam klorida pekat (HCl) sebagai substrat. Media ini sangat efektif untuk mengisolasi aktinomisetes dan bakteri kitinolitik lainnya (Hsu *and* Lockwood, 1975).

2.3 *Kocuria*

Kocuria adalah kokus Gram-positif yang tersusun berpasangan, rantai pendek, tetrad, paket kubik berisi delapan dan kelompok tidak beraturan. *Kocuria* termasuk dalam filum Actinobacteria, kelas Actinobacteria, ordo Actinomycetales, subordo Micrococcineae dan familia *Micrococcaceae*. Saat ini, terdapat lebih dari 18 spesies *Kocuria* yang diidentifikasi berdasarkan studi filogenetik 16S rRNA. Spesies *Kocuria* yang teridentifikasi sejauh ini meliputi *Kocuria assamensis*, *Kocuria aegyptia*, *Kocuria gwangalliensis*, *Kocuria atrinae*, *Kocuria carniphila*, *Kocuria flava*, *Kocuria palustris*, *Kocuria halotolerans*, *Kocuria himachalensis*, *Kocuria koreensis*, *Kocuria kristinae*, *Kocuria marina*, *Kocuria polaris*, *Kocuria rhizophila*, *Kocuria rosea*, *Kocuria salsicia*, *Kocuria sediminis*, *Kocuria turfanensis*, dan *Kocuria varians*. *Kocuria* juga diisolasi dari berbagai relung lingkungan dan ekologi, biasanya dianggap sebagai bakteri non-patogen yang jarang dikaitkan dengan infeksi manusia (Kandi *et al.*, 2016). Mikroorganisme ini ada di mana-mana dan dapat diisolasi dari berbagai sumber, seperti kulit, flora mamalia, dan tanah. Mikroorganisme ini biasanya menjajah kulit, mukosa, dan orofaring pada manusia (Ziogou *et al.*, 2023). Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ekstrak dari kultur *Kocuria palustris* memiliki

aktivitas antimikroba, Setiawan *et al.*, (2022) melakukan isolasi dan kultivasi aktinomisetes dengan *Liquid State Fermentation* (LSF) pada media kolid kitin yang dikultur selama 14 hari, menunjukkan ekstrak *Kocuria palustris* memiliki komponen alkaloid yang berperan dalam aktivitas antifungi. *Kocuria palustris* 19C38A1 memiliki aktivitas antifungi terhadap *Fusarium oxysporum* dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif seperti kitooligosakarida, penelitian ini mengidentifikasi bahwa isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 memiliki ciri adanya fragmentasi spora yang menjadi ciri famili *Micrococcaceae*. Analisis lanjutan menggunakan SEM diamati miselia aerial yang menampilkan rantai spora lurus dengan diameter 2 mikron. Penelitian Setiawan *et al.*, 2022 ini menyoroti potensi *Kocuria palustris* 19C38A1 sebagai sumber senyawa antifungi, dengan menunjukkan bahwa ekstrak kultur dari isolat ini memiliki aktivitas fungisida yang signifikan terhadap *Fusarium oxysporum*. Ekstrak isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 yang dikultur 14 hari pada media limbah cangkang kulit udang juga telah terbukti menghasilkan senyawa bioaktif dengan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* (Laila *et al.*, 2023). Pada penelitian Larasati, 2024 dilakukan variasi waktu kultivasi dan pH kultivasi *Kocuria palustris* 19C38A1 sebagai antifungi terhadap *Fusarium oxysporum* pada media kulit udang, dengan variasi waktu pertumbuhan 2 hari, 4 hari, 6 hari, 8 hari, 10 hari, 12 hari, dan 14 hari, yang selanjutnya setelah diketahui waktu optimum dilakukan kultivasi kembali dengan variasi pH 6, 7, dan 8 dan dari penelitian tersebut diperoleh kondisi optimum hari ke-6 dan pH 6 yang diprediksikan menghasilkan beberapa komponen seperti asam amino dan alkaloid.

2.4 Kultivasi

Kultivasi adalah teknik menumbuhkan mikroba hasil seleksi (isolat) mikroba dalam medium kultur. Kondisi media kultivasi harus sesuai dengan habitat aslinya sehingga isolat yang dibiakkan dapat berkembang secara baik. Pada saat kondisi media kultivasi sesuai dengan habitat aslinya, maka pertumbuhan dan reproduksi bakteri dapat diamati dan diukur (Carlina dkk., 2020). Media kultur dan parameter fisik memainkan peran penting yang secara signifikan mempengaruhi produksi

antimikroba oleh aktinomisetes. Produksi metabolit sekunder mikroba melalui fermentasi diketahui tidak stabil, sehingga menghasilkan hasil yang konsisten dari bahan aktif target baik melalui parameter fisik atau kimia seperti pH, suhu, dan jangka waktu yang sangat mempengaruhi hasil zat tersebut (Balachandar *et al.*, 2019). Dari sedikit variasi nutrisi atau kondisi lingkungan proses fermentasi, kualitas produk dapat berubah. Desain media kultur dan kondisi kultur merupakan aspek penting yang mempengaruhi pertumbuhan dan metabolisme aktinomisetes. Komposisi media mempengaruhi keekonomian produk dan proses. Aktinomisetes penting secara ekonomi dan bioteknologi dan juga bertanggung jawab untuk produksi metabolit sekunder seperti antibiotik, agen antikanker dan enzim. Produksi metabolit sekunder melalui fermentasi dipengaruhi oleh banyak faktor seperti waktu fermentasi, ventilasi, suhu, kombinasi pH awal komponen media, mineral dan kondisi kultur. Dengan optimalisasi proses fermentasi dengan faktor-faktor ini tidak hanya dapat meningkatkan kualitas produk akhir secara signifikan, tetapi juga mengurangi biaya fermentasi (Jadon *et al.*, 2019).

Suhu sangat berpengaruh terhadap kerja enzim, semakin tinggi suhu maka kerja enzim akan semakin cepat karena peningkatan suhu menyebabkan peningkatan energi kinetik reaktan. Pada dasarnya pertumbuhan adalah hasil dari metabolisme suatu reaksi kimia yang berlangsung di dalam sel yang dikatalisis oleh enzim. Maka peningkatan suhu akan menyebabkan peningkatan pertumbuhan. Suhu yang cocok untuk pertumbuhan aktinomisetes berkisar antara 25-30°C. Selain suhu, pH (derajat keasaman) juga merupakan faktor lingkungan yang berpengaruh terhadap pertumbuhan dan aktivitas bakteri. pH dapat mempengaruhi kerja enzim dan permeabilitas sel, sehingga transpor nutrisi ke dalam sel akan terganggu. Hal tersebut akan berdampak pada metabolisme sekaligus pertumbuhan terhadap sel bakteri (Gustiana dkk., 2021).

Fermentasi dari mikroorganisme seperti aktinomisetes akan menghasilkan suatu zat berupa metabolit sekunder yang dapat digunakan sebagai antimikroba. Proses fermentasi dapat terjadi ketika adanya medium fermentasi yang mendukung pertumbuhan dari bakteri seperti adanya suatu zat karbon dan mineral seperti magnesium, natrium, besi, ataupun kalium. Lama fermentasi menjadi salah satu

faktor yang berperan penting dalam proses fermentasi dari mikroorganisme dan berpengaruh secara signifikan terhadap hasil yang muncul setelah dilakukan fermentasi tersebut. Lama fermentasi ini perlu diketahui agar dapat diperoleh hasil senyawa metabolit sekunder dengan jumlah yang paling besar sehingga memberikan efek antimikroba yang lebih besar. Berdasarkan fase perkembangan pada bakteri aktinomisetes, terdapat 4 fase perkembangan yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner, dan fase kematian (Faruqi *et al.*, 2023).

Fase lag terjadi ketika biakan memasuki habitat atau medium yang baru atau medium yang berbeda dari medium sebelumnya. Pada fase ini bakteri mengalami adaptasi metabolik sel agar dapat bertahan hidup pada lingkungan yang baru. Panjang fase lag ditentukan oleh beberapa faktor seperti spesies bakteri, perubahan kondisi lingkungan dan kondisi biakan pada medium sebelumnya. Apabila biakan sedang mengalami pertumbuhan secara eksponensial kemudian dipindahkan ke dalam medium baru dengan kondisi lingkungan yang sama, maka fase lag tidak terjadi. Ketika biakan dipindahkan dari medium kaya nutrisi ke medium yang memiliki sedikit nutrisi maka biakan akan mengalami fase lag sebab sel perlu komplemen enzim yang lengkap untuk melakukan sintesis metabolit esensial yang ada pada medium yang baru. Oleh karena itu, kultur memerlukan waktu untuk beradaptasi pada lingkungan yang baru. Sel yang telah beradaptasi dengan lingkungan atau medium yang baru akan mulai berkembang dan membelah secara eksponensial dan memasuki fase kedua yaitu fase eksponensial atau fase log. Laju pertumbuhan bakteri bergantung pada kondisi lingkungan, apabila kondisi lingkungannya memiliki sedikit nutrisi maka pertumbuhan bakteri secara umum akan lebih lambat daripada pertumbuhan bakteri dengan medium yang kaya nutrisi. Pertumbuhan biakan akan memasuki fase stasioner ketika nutrisi pada medium semakin menipis atau ketika adanya akumulasi produk sampingan lain yang menghambat pertumbuhan bakteri. Pada fase stasioner tidak terdapat penurunan atau kenaikan jumlah sel yang signifikan, sehingga laju pertumbuhan biakan adalah nol. Karena jumlah sel yang membelah dan sel yang mati hampir sama. Tetapi meskipun tidak terdapat pertumbuhan yang signifikan proses biosintesis dan metabolisme energi sel tetap berlangsung. Nutrisi pada

medium biakan yang terus menipis dan adanya akumulasi produk sampingan yang terjadi terus menerus akan menyebabkan biakan mengalami fase kematian dimana jumlah sel menurun secara bertahap. Fase kematian pada biakan diikuti adanya proses lisis dari masing-masing sel bakteri (Wahyuningsih dan Zulaika, 2018).

Fermentasi adalah proses biologis; sebagian besar melibatkan mikroorganisme yang mengatur konversi enzimatik molekul kompleks menjadi senyawa sederhana. Dalam produksi obat, jalurnya menyimpang secara konvensional menjadi fermentasi terendam/cair (SmF) dan fermentasi keadaan padat (SSF). Versi fermentasi sebagian besar dieksploitasi karena kepentingan ekonomi dan lingkungan. Meskipun demikian, hasil dari setiap teknik fermentasi sangat bervariasi dalam hal pemanfaatan dan produktivitas substrat. Meskipun SmF telah mendapatkan pengakuan luas atas penggunaannya pada skala yang lebih besar dalam hal kapasitas produksi metabolit sekunder bioaktifnya, SSF muncul dan maju sebagai alternatif yang menjanjikan untuk SmF (Siro, *et al.*, 2022).

2.5 Solid-State Fermentation (SSF)

Solid-State Fermentation (SSF) menggambarkan fermentasi substrat padat menggunakan mikroorganisme dengan sedikit air atau tanpa air bebas. Dalam SSF, ada dua jenis substrat padat yang digunakan yaitu substrat padat inert yang dilengkapi dengan berbagai sumber nutrisi dan substrat padat yang tersedia secara alam seperti limbah (Kalaiyarasi *et al.*, 2020). SSF meniru lingkungan alami bagi mikroorganisme dan setiap individu memiliki kinerja terbaik di habitat aslinya. SSF digambarkan sebagai proses fermentasi yang menggunakan matriks padat yang mengandung kelembaban yang cukup untuk mendorong pertumbuhan mikroba tanpa tambahan air bebas. Bahan padat juga dapat berfungsi sebagai sumber nutrisi atau sebagai bahan pendukung yang dilengkapi dengan resep nutrisi lengkap yang penting untuk pertumbuhan mikroorganisme. SSF adalah bioproses yang populer dan stabil untuk produksi enzim khususnya untuk degradasi biomassa. SSF bisa menjadi bioproses yang sangat baik untuk produksi UKM dari limbah pertanian dan residu industri. Residu seperti itu dalam jumlah besar, termasuk ampas tebu, dedak, sekam, pomace utuh, biji-bijian, kulit sisa

jagung, dan lain-lain, diproduksi setiap tahun sebagai limbah yang kurang dimanfaatkan atau dibuang ke tempat pembuangan sampah. Fokus signifikan diamati untuk menggunakan bahan-bahan tersebut sebagai substrat terbarukan yang tersedia secara memadai dan berbiaya rendah untuk menghasilkan berbagai senyawa berharga. Sedikit substrat yang digunakan sebagai pendukung dalam bioproses SSF untuk menghasilkan berbagai metabolit sekunder dari mikroba (Kumar *et al.*, 2021).

Kulit udang, yang merupakan limbah dari industri perikanan, memiliki potensi besar sebagai substrat dalam berbagai aplikasi bioteknologi. Kulit udang mengandung kitin, yang dapat dihidrolisis menjadi N-asetilglukosamin menggunakan enzim kitinase. Sebagian besar aktinomisetes mampu secara efektif memecah kitin dan menggunakannya sebagai sumber karbon dan energi serta mensintesis kitinase (Brzezinska, *et al.*, 2010). Hal inilah yang menyebabkan kulit udang dapat digunakan sebagai substrat padat dalam proses fermentasi aktinomisetes untuk menghasilkan senyawa metabolit bioaktif (Setiawan, *et al.*, 2021). Persiapan dan pra-perlakuan adalah langkah-langkah yang diperlukan untuk mengubah substrat mentah menjadi bentuk yang sesuai untuk digunakan. Persiapan dan pra-perlakuan ini termasuk pengurangan ukuran melalui penggilingan, penggilingan atau pemotongan, hidrolisis fisik, kimia atau enzimatik polimer untuk meningkatkan ketersediaan substrat, dan suplementasi dengan nutrisi dan pengaturan pH dan kadar air melalui larutan mineral, pemasakan atau perawatan uap untuk pra-degradasi struktur makromolekul, dan eliminasi kontaminan utama. Pemilihan yang tepat substrat untuk proses SSF tergantung pada beberapa faktor terutama terkait dengan biaya dan ketersediaan, dan sifat substrat yang heterogen (Obi, 2019).

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi senyawa bioaktif secara historis telah dilakukan melalui berbagai teknik konvensional. Teknik konvensional untuk mengekstraksi senyawa target meliputi ekstraksi padat-cair, ekstraksi cair-cair, dan ekstraksi Soxhlet. Diantaranya, ekstraksi pelarut organik adalah pilihan umum bagi banyak industri dan penelitian

(Sanjeeva *et al.*, 2023). Tujuan dari ekstraksi adalah untuk mengambil senyawa kimia yang ada dalam sampel dimana prinsip ekstraksi berdasarkan pada perpindahan massa komponen zat yang terlarut ke dalam pelarut. Maserasi merupakan teknik ekstraksi padat-cair yang digunakan untuk mengambil atau menarik senyawa yang diinginkan dari suatu sampel dengan melakukan perendaman terhadap bahan yang akan diekstraksi dengan pelarut organik selama beberapa waktu, sehingga dengan adanya perendaman tersebut, pelarut atau cairan penyari ini akan menembus dinding sel tanaman atau mikroorganisme yang diekstraksi dan masuk ke rongga sel yang mengandung zat aktif, sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi didalam dan diluar sel maka larutan yang dengan konsentrasi terpekat akan didesak keluar (Riwanti dkk., 2020).

Senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri endofit di dalam media fermentasi biasanya diekstraksi dengan menggunakan etil asetat. Penggunaan larutan etil asetat dikarenakan larutan tersebut merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, memiliki tingkat toksisitas yang rendah dan mudah terevaporasi (Kartikasari dan Purwestri, 2021).

2.7 Kromatografi

2.7.1 Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu lempeng kromatografi. Prinsip kerjanya, yaitu dua fase yang mempengaruhi fase diam dan fase gerak. Fase diamnya berupa lapisan permukaan bidang datar yang didukung oleh lempeng kaca, plat aluminium, atau plat plastik. Sedangkan fase gerak berupa pelarut pengembang yang nantinya akan bergerak sepanjang fase diam karena adanya perambatan kapiler (pengembangan) (Pebe, 2022).

Prinsip KLT yaitu memisahkan sampel berdasarkan perbedaan kepolaran atau dikenal dengan prinsip "*like dissolve like*" artinya polar menyukai polar dan non polar menyukai non polar. Salah satu prinsip dari kelarutan adalah *like dissolve*

like, dimana pelarut akan melarutkan zat yang sifatnya sama seperti pelarut tersebut. Pengujian menggunakan KLT dilakukan dengan menotolkan sampel pada plat, plat yang digunakan adalah plat silika gel GF254. Sampel yang telah ditotolkan dibiarkan hingga mengering lalu dielusi dalam chamber yang telah dijenuhkan dengan fase gerak (Rokhmah dan Rusmalina, 2023). Lempeng KLT yang telah dielusi diperiksa menggunakan sinar UV 254 nm dan 366 nm untuk menentukan nilai Rf. Deteksi bercak menggunakan sinar UV 254 nm yang merupakan panjang gelombang pendek dengan indikator sinar berwarna hijau, sedangkan deteksi menggunakan sinar UV 366 nm yang merupakan panjang gelombang panjang dengan indikator sinar berwarna ungu. Noda gelap dengan latar belakang terang yang nampak ketika lempeng disinari sinar UV merupakan senyawa yang menyerap sinar UV 254 nm dan UV 366 nm. Noda atau bercak tersebut timbul karena adanya hubungan sinar UV dengan lempeng KLT yang berfluoresensi (Rahmadani dkk., 2022).

$$R_f = \frac{\text{jarak perjalanan suatu senyawa (a)}}{\text{jarak perjalanan suatu eluen (b)}}$$

Semakin besar Rf suatu senyawa, semakin besar jarak yang ditempuhnya pada plat KLT. Ketika membandingkan dua senyawa berbeda yang dijalankan dalam kondisi kromatografi yang identik, senyawa dengan Rf yang lebih besar kurang polar karena berinteraksi kurang kuat dengan adsorben polar pada plat KLT. Sebaliknya, jika struktur senyawa dalam campuran dapat diperkirakan senyawa dengan polaritas rendah akan memiliki nilai Rf yang lebih besar dari pada senyawa polar yang dijalankan pada plat yang sama. Rf dapat memberikan bukti yang menguatkan identitas suatu senyawa. Jika identitas suatu senyawa diduga tetapi belum terbukti, sampel asli senyawa atau standar ditetaskan dan dijalankan pada plat KLT berdampingan dengan senyawa yang dimaksud. Jika dua zat memiliki nilai Rf yang sama, kemungkinan besar merupakan senyawa yang sama. Jika keduanya memiliki nilai Rf yang berbeda, keduanya jelas merupakan senyawa yang berbeda (Kumar *et al.*, 2013).

KLT banyak digunakan karena kesederhanaannya, kecepatannya, dan biayanya yang rendah. Selain itu, kemampuan untuk memisahkan beberapa analit dari campuran dalam satu cawan, tidak ada batasan pada sifat komponen yang dipisahkan (mudah menguap atau tidak mudah menguap), dan penerapan pestisida dari kelas kimia yang berbeda dalam berbagai matriks sampel juga menguntungkan. *In situ bioassay* dapat dilakukan langsung di atas pelat untuk mendapatkan kromatogram profil aktivitas. Sifat-sifat ini menjadikan KLT metode pemisahan yang populer untuk analisis campuran senyawa kompleks yang terarah. Uji KLT banyak digunakan untuk penemuan obat baru dan fokus pada penghambat enzim, dan juga dapat mendeteksi kontaminan seperti antibiotik, pestisida, dan senyawa estrogenik dalam makanan (Shou *et al.*, 2023).

2.7.2 Kromatografi Kolom

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

Kromatografi kolom terdiri dari fase padat diam yang menyerap dan memisahkan senyawa yang melewatinya dengan bantuan fase gerak cair. Berdasarkan sifat kimianya, senyawa teradsorpsi dan elusi didasarkan pada adsorpsi diferensial suatu zat oleh adsorben. Berbagai fase diam, seperti silika, alumina, kalsium fosfat, kalsium karbonat, pati, dan magnesita, serta komposisi pelarut yang berbeda berdasarkan sifat senyawa yang akan dipisahkan dan diisolasi, digunakan dalam kromatografi kolom. Optimalisasi metode merupakan tugas penting dalam pemisahan kelompok senyawa yang berbeda dalam ekstrak. Dalam kromatografi kolom, kaca berbentuk silinder tabung, yang bagian bawahnya ditutup dengan sepotong wol kaca atau cakram berpori, diisi dengan bubuk (adsorben) dan pelarut yang sesuai. Sampel yang akan dipisahkan dicampur dengan silika dan dimasukkan ke bagian atas kolom dan dibiarkan bergerak bersama pelarut.

Dengan perbedaan polaritas, senyawa diadsorpsi pada daerah yang berbeda dan didesorpsi dengan polaritas pelarut yang sesuai. Senyawa yang kemampuan adsorpsinya lebih tinggi akan teradsorpsi di bagian atas dan senyawa yang memiliki kemampuan adsorpsi lebih rendah akan teradsorpsi di bagian bawah. Dengan menambahkan pelarut di bagian atas, senyawa terdesorpsi dan melewati kolom dan proses ini disebut elusi (Srivastava, *et al.*, 2021).

2.8 Senyawa Metabolit Sekunder Aktinomisetes Laut

Metabolit sekunder mikroba adalah senyawa yang tidak terkait dengan pertumbuhan dengan berbagai struktur kimia dan peran fisiologis. Produksinya biasanya terjadi pada fase pertumbuhan akhir dan dipicu oleh faktor stres lingkungan, misalnya keterbatasan nutrisi, kehadiran mikroorganisme pesaing, dan lain-lain. Molekul-molekul ini merupakan bagian integral dari mekanisme pertahanan dan kelangsungan hidup sel karena mereka dapat meningkatkan ketersediaan substrat kompleks, menghambat reproduksi spesies lain atau menawarkan perlindungan terhadap efek racun (Lajtai-Szabó *et al.*, 2022). Di antara filum mikroba yang berbeda di ekosistem laut, aktinomisetes menghasilkan sebagian besar produk alami, dengan bioaktivitas termasuk antibakteri, antijamur, antiparasit, antimalaria, imunomodulator, antiinflamasi, antioksidan, dan antikanker. Bioaktivitas yang beragam ini dimediasi oleh beberapa kelas senyawa termasuk poliketida, alkaloid, asam lemak, peptida, dan terpen (Abdelmohsen *et al.*, 2014). Sebagian besar metabolit sekunder adalah produk akhir dari proses biosintesis kompleks yang dihasilkan oleh sistem enzim yang sangat terstruktur, seperti sintetase peptida non-ribosomal (NPRS) dan sintetase poliketida (PKS), dari aspek konstitusif dasar. Sintetase peptida non-ribosomal adalah enzim modular yang mengkatalisis sintesis produk peptida utama dari berbagai substrat asam amino proteinogenik dan non-proteinogenik. Sintetase poliketida (PKS) adalah enzim multifungsi yang melakukan biosintesis berbagai senyawa alami (Meenakshi, *et al.*, 2024).

Alkaloid adalah konstituen kimia utama dalam metabolit sekunder aktinomisetes dan salah satu jenis senyawa yang paling banyak digunakan sebagai obat. Sebagian besar molekul yang mengandung nitrogen ini memiliki struktur cincin yang kompleks dengan aktivitas farmakologis yang menjanjikan (Liu *et al.*, 2024). Alkaloid memiliki struktur kimia yang sangat berbeda termasuk sistem cincin heterosiklik dan mencakup lebih dari 20.000 molekul yang berbeda dalam organisme. Alkaloid dapat diklasifikasikan menurut zat awal dari jalur biosintesisnya, seperti asam amino yang menyediakan atom nitrogen dan bagian dari kerangkanya termasuk terpenoid dan purin. Dengan demikian, identifikasi zat awal yang mensintesis berbagai alkaloid adalah salah satu kunci terpenting untuk klasifikasi senyawa alkaloid alami. Struktur kimia alkaloid sangat beragam dan ekstraksi fitur senyawa kimia dari struktur molekul sangat penting untuk klasifikasi senyawa alkaloid. Struktur kimia alkaloid sangat bervariasi, dan dapat dibagi menjadi beberapa kelas berdasarkan strukturnya, seperti indoles, kuinolin, isokuinolin, pirolidin, piridin, pirolizidin, tropan, serta terpenoid dan steroid (Eguchi *et al.*, 2019).

Peptida bioaktif adalah fragmen protein yang bermanfaat bagi sistem tubuh dan kesehatan manusia secara keseluruhan. Sebagian besar peptida bioaktif berkisar antara dua (dipeptida) dan 20 residu asam amino dan memiliki molekul 0,4-2 kDa (Zaky *et al.*, 2022). Peran fisiologis peptida yang berbeda telah menjadikannya pilihan yang baik untuk produksi senyawa terapeutik. Berbagai jenis aktivitas fisiologis peptida bioaktif telah dilaporkan, tergantung pada jenis, jumlah, urutan, dan sifat asam amino. Dari sudut pandang nutrisi, bioavailabilitas peptida yang lebih besar daripada protein. Selain itu, peptida yang lebih kecil memiliki sifat alergen yang lebih sedikit daripada protein primer (Akbarian *et al.*, 2022). Peptida pendek (1-50 asam amino) dengan sifat kationik dan hidrofobik diketahui sebagian pertahanan yang ampuh bagi organisme inang, yang memberikan aktivitas terhadap bermacam mikroorganisme patogen seperti bakteri gram-negatif dan gram-positif, jamur, virus dan parasit. Meskipun beberapa peptida memiliki aktivitas biologi, aktivitas antimikroba merupakan salah satu yang paling banyak dipelajari. Peptida yang paling banyak dipelajari adalah

peptida dengan aktivitas antimikroba yang dicirikan oleh interaksinya dengan membran sitoplasma mikroorganisme tanpa memperdulikan target lainnya. Faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah interaksi elektrostatik antara peptida dan lipid bermuatan positif dan anionik pada permukaan mikroorganisme target. Selain itu, sifat hidrofobisitas peptida (faktor yang diperlukan untuk penyisipan ke dalam membran) dan fleksibilitas peptida memungkinkan interaksi peptida dengan mikroba (Espitia *et al.*, 2012). Meskipun sebagian besar dari peptida merusak stabilitas membran target dengan menciptakan lubang di membran sitoplasma, sekelompok peptida menargetkan molekul intraseluler dan mengganggu sintesis protein, DNA, aktivitas enzim atau dinding sel menyebabkan kerusakan dinding sel target (Besharati *and* Lackner, 2023).

2.9 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri coccus, gram positif, susunannya bergerombol dan tidak teratur seperti anggur. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri yang bersifat non-spora, non-motil, anaerob fakultatif, oksidase negative dan katalase positif. Suhu pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu pada suhu 6,5-46° C dan pada pH 4,2-9,3. Dalam waktu 24 jam maka koloni bakteri *Staphylococcus aureus* akan tumbuh dengan diameter mencapai 4 mm pada media padat koloni berpermukaan halus, berbentuk bulat, berkilau, menonjol dan berwarna abu-abu sampai kuning emas tua (Nurhidayanti dan Sari, 2022).

Staphylococcus aureus, umumnya merupakan patogen oportunistik atau komensal yang menetap pada kulit inang dan mukosa pada hewan dan manusia.

Staphylococcus yang bersifat komensal dapat bertindak sebagai patogen jika mereka berhasil memasuki inang melalui beberapa mekanisme, seperti trauma kulit, inokulasi, implantasi alat, baik pada pasien dengan sistem imunitas lemah, dan pada semua pasien yang menunjukkan perubahan mikrobiota. Pada manusia, lebih dari 80% penyakit *Staphylococcus aureus* yang didapat di rumah sakit adalah infeksi endogen yang disebabkan oleh strain yang dibawa dalam hidung (Savini, 2018).

Infeksi *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab meningkatnya jumlah penyakit dan kematian. Pada hidung dan kulit manusia, terdapat bakteri yang berkolonisasi sehingga dapat menyebabkan beberapa penyakit seperti infeksi kulit, endokarditis, bakteremia, pneumonia, meningitis, osteomyelitis, sepsis dan *toxic shock syndrome*. Salah satu tantangan dalam pengobatan infeksi oleh *Staphylococcus aureus* adalah adanya resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik. Selain itu, munculnya strain baru *Staphylococcus aureus* juga menambah masalah kesehatan di masyarakat. Oleh karena itu, strategi baru diperlukan untuk menghindari meluasnya resistensi (Rianti dkk., 2022).

2.10 Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang dapat mengganggu pertumbuhan bakteri atau bahkan membunuh bakteri dengan cara mengganggu metabolismenya. Senyawa ini memiliki sifat toksik selektif, artinya senyawa tersebut dapat secara spesifik menargetkan dan membunuh bakteri penyebab penyakit tanpa menjadi racun bagi inangnya. Mekanisme kerja senyawa antibakteri antara lain merusak dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Purssell, 2019). Mekanisme antibakteri dari masing-masing senyawa metabolit sekunder berbeda-beda. Senyawa metabolit sekunder menghambat pertumbuhan bakteri dimulai dengan merusak dinding sel. Senyawa alkaloid bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel. Ketidakstabilan dinding sel menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, dan pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu menyebabkan sel bakteri menjadi kehilangan bentuk dan lisis (Dewi dkk., 2014). Peptida antibakteri berinteraksi dengan membran sel bakteri, yang menyebabkan destabilitas dan permeabilitas. Interaksi ini biasanya terjadi melalui tarikan elektrostatik antara peptida kationik dan komponen membran bakteri yang bermuatan negatif, seperti lipopolisakarida pada bakteri gram-negatif atau asam lipoteikoat pada bakteri gram-positif (Jenssen *et al.*, 2006). Beberapa peptida antimikroba juga dapat menembus sel dan menghambat proses intraseluler, seperti sintesis DNA, RNA, atau protein. Selain itu, peptida antimikroba memiliki sifat imunomodulatori,

meningkatkan respon imun inang dengan merekrut sel imun dan memodulasi peradangan. Peptida antimikroba juga efektif dalam mengganggu biofilm, yang seringkali resisten terhadap antibakteri konvensional (Mihaylova-Garnizova *et al.*, 2024).

Penentuan aktivitas senyawa antibakteri dapat diuji dengan metode secara difusi ataupun dilusi, yaitu:

- Metode difusi

Metode difusi, juga dikenal sebagai metode difusi sumur agar, melibatkan penggunaan pelat agar. Dalam metode ini, lubang-lubang dibuat pada agar, dan senyawa antibakteri ditambahkan ke dalam lubang-lubang tersebut. Senyawa tersebut kemudian berdifusi melalui agar-agar, menciptakan gradien konsentrasi. Jika senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri maka akan menghambat pertumbuhan bakteri di sekitar sumur. Diameter zona hambat diukur dan digunakan sebagai indikator aktivitas senyawa terhadap bakteri (Balouiri *et al.*, 2016).

- Metode dilusi

Metode dilusi adalah teknik yang umum digunakan dalam mikrobiologi untuk mengurangi konsentrasi bakteri dalam sampel ke tingkat yang diinginkan untuk tujuan pengujian atau penghitungan. Metode ini melibatkan pencampuran sampel dengan media yang diinokulasi bakteri dan kemudian mengencerkan campuran untuk mencapai konsentrasi yang diinginkan. Metode dilusi memiliki beberapa keunggulan dan penerapan dalam mikrobiologi. Salah satu kelebihan metode dilusi adalah dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum suatu sampel yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini penting dalam menguji efektivitas agen antimikroba atau menentukan kerentanan bakteri terhadap obat tertentu. Dengan melakukan pengenceran serial dengan peningkatan konsentrasi agen antimikroba, konsentrasi hambat minimum (MIC) dapat ditentukan (Balouiri *et al.*, 2016).

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bioautografi adalah teknik yang menggabungkan pemisahan KLT dengan estimasi aktivitas biologis *in situ*. Metode ini sangat cocok untuk bioanalisis produk alami yang kompleks karena pemisahan komponen, lokasi, dan bioevaluasi dilakukan secara bersamaan (Zang *et al.*, 2021). Metode ini adalah teknik di mana KLT dikaitkan dengan pengujian biologis atau deteksi kimia yang menunjukkan sifat biologis. Sejumlah teknik KLT bioautografi telah dikembangkan dan berhasil diterapkan untuk aktivitas serupa dimana semua langkah yang terlibat dalam proses seperti pemisahan senyawa, penentuan aktivitas biologis dan visualisasi hasilnya dilakukan langsung di plat KLT tunggal (Pal dan Bala, 2022).

Bioautografi agar overlay adalah gabungan dari metode difusi agar dan bioautografi langsung. Untuk memungkinkan difusi yang baik dari senyawa yang diuji ke dalam media agar, pelat dapat ditempatkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum inkubasi. Media agar yang diinokulasi dengan mikroorganisme dilapisi secara merata pada pelat tipis. Setelah agar mengeras, pelat tipis dikultur semalaman pada suhu sekitar 30°C dan diwarnai dengan zat pengembangan warna, dan kemudian hasil eksperimen dapat diamati. Keuntungan metode ini adalah mengurangi pengaruh langkah eksperimen terhadap hasil. Metode *overlay agar* cocok untuk mikroorganisme berspektrum luas, terutama ragi dan bakteri (Wang *et al.*, 2021).

Resazurin (nama IUPAC: 7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one) adalah pewarna fenoxazin-3-one dengan warna biru tua dalam larutan. Resazurin ini telah digunakan sebagai indikator kelangsungan hidup sel dan aktivitas metabolisme sejak akhir tahun 1920an. Prinsip dasar uji resazurin yang secara komersial dikenal sebagai uji Alamar Blue adalah reduksi resazurin berwarna biru menjadi resorufin berwarna merah muda secara ireversibel berdasarkan aktivitas metabolisme di dalam sel. Konversi bentuk teroksidasi menjadi bentuk tereduksi oleh aktivitas enzim mitokondria dan sitoplasma (enzim tipe reduktase atau diaphorase) (Varçin, *et al.*, 2020).

2.11 Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR)

Spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR) telah muncul sebagai alat yang serbaguna dan sangat diperlukan, yang merevolusi analisis molekuler di seluruh spektrum domain ilmiah, termasuk mikrobiologi. Teknik ini beroperasi berdasarkan prinsip bahwa molekul menyerap frekuensi tertentu dari cahaya inframerah, yang sesuai dengan frekuensi getaran ikatan kimianya. Penyerapan tersebut menghasilkan spektrum karakteristik yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan struktur molekuler yang ada dalam sampel. Spektroskopi FT-IR didasarkan pada prinsip bahwa molekul menyerap frekuensi tertentu dari cahaya inframerah, sesuai dengan frekuensi getaran ikatan kimianya. Ketika sampel terkena cahaya inframerah, molekul-molekul dalam sampel menyerap cahaya ini pada frekuensi karakteristik, yang menyebabkan ikatan-ikatan dalam molekul bergetar. Berbagai jenis ikatan, seperti ikatan C-H, O-H, dan N-H, memiliki frekuensi getaran yang berbeda, yang mengarah pada pola-pola unik dalam penyerapan cahaya inframerah. Dengan mengukur intensitas cahaya yang diserap pada berbagai panjang gelombang, spektrometer FTIR menghasilkan spektrum karakteristik untuk sampel. Spektrum ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi gugus fungsi dan struktur molekuler yang ada dalam sampel, yang pada dasarnya menyediakan "sidik jari" yang dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif. Spektroskopi FTIR dapat digunakan untuk mempelajari beragam spesimen, termasuk padatan, cairan, dan gas, dan memiliki aplikasi di berbagai domain ilmiah, termasuk kimia, fisika, ilmu material, dan biologi (Kassem *et al.*, 2023).

Spektroskopi inframerah merupakan salah satu spektroskopi serapan yang digunakan untuk mempelajari interaksi radiasi IR dengan berbagai zat. Hasil pengukuran yang dilakukan dengan berbagai jenis serapan IR adalah spektrum serapan IR, yaitu ketergantungan intensitas radiasi IR yang dipancarkan (transmisi, T) atau kerapatan optik (D) terhadap frekuensinya (bilangan gelombang). Berdasarkan rentang yang diteliti, spektroskopi IR dapat dibagi menjadi tiga wilayah: near-IR, mid-IR yang terkadang disebut spektroskopi IR, dan far-IR. Radiasi gelombang panjang berenergi rendah dalam rentang ini

menyediakan energi yang cukup untuk menyebabkan transisi antara sublevel vibrasi. Spektroskopi far-IR jarang digunakan untuk studi struktur, terutama dalam kasus objek biologis, namun berguna untuk memperoleh informasi tentang getaran struktur yang mengandung atom unsur berat, getaran kerangka, dan getaran kisi kristal. Sebaliknya, berbagai jenis near dan mid-IR secara aktif digunakan untuk mempelajari sampel biologis. Wilayah mid-IR dibagi menjadi wilayah frekuensi grup ($4000\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) dan wilayah sidik jari (di bawah $1500\text{--}600\text{ cm}^{-1}$). Getaran yang umum untuk berbagai gugus fungsi terwujud di wilayah pertama: getaran yang melibatkan atom hidrogen (dari 4000 hingga 2850 cm^{-1}), getaran berbagai ikatan rangkap tiga (dari 2500 hingga 2000 cm^{-1}), getaran berbagai ikatan rangkap dua (dari 2000 hingga 1500 cm^{-1}), dan lain-lain. Di wilayah sidik jari, berbagai jenis getaran khas untuk ikatan C-C, C-N, dan C-O diamati, seperti halnya dengan getaran tekuk untuk ikatan X-H, C-H, O-H, dan N-H, termasuk tekukan dan getaran rangka sistem poliatomik (Pirutin *et al.*, 2023).

Prinsip spektroskopi FTIR bergantung pada interferometri dan transformasi fourier, yang secara mendasar mengubah cara spektrum inframerah diperoleh dan dianalisis. Dalam spektroskopi FTIR, radiasi inframerah dilewatkan melalui sampel, dimana ia berinteraksi dengan ikatan molekuler, menyebabkan penyerapan pada frekuensi tertentu sesuai dengan metode getaran. Cahaya yang dipancarkan atau dipantulkan kemudian diinterferensikan dengan berkas referensi, menghasilkan interferogram yang berisi tentang spektrum serapan sampel. Melalui transformasi fourier dari interferogram, data domain waktu diubah menjadi spektrum domain frekuensi, mengungkap puncak serapan karakteristik yang menunjukkan struktur dan komposisi molekuler. Proses ini memungkinkan akuisisi spektral resolusi tinggi dan analisis kuantitatif, memfasilitasi wawasan terperinci tentang ikatan kimia dan dinamika molekuler. Spektroskopi FTIR berbeda dengan teknik spektroskopi lainnya, spektroskopi FTIR menggunakan interferometri dan transformasi fourier untuk mencapai resolusi spektral dan sensitivitas yang unggul, hal ini memungkinkan deteksi pita serapan yang lemah dan diferensiasi puncak yang berjarak dekat, meningkatkan kemampuan untuk analisis molekuler yang terperinci. Selain itu, spektroskopi FTIR menawarkan

keunggulan dibandingkan teknik spektroskopi lainnya dalam hal fleksibilitas sampel, sensitivitas terhadap gugus fungsi, dan kemudahan interpretasi spektral (Siddique, 2024).

2.12 *Mass Spectroscopy (MS)*

Mass Spectroscopy (MS) adalah teknik instrumen yang didasarkan pada ionisasi sampel molekul dalam fase gas, yang diikuti dengan pemisahan dan deteksi ion yang dihasilkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z).

Berdasarkan pada cara ionisasi dan aplikasi yang diinginkan, molekul sampel yang terionisasi dapat terfragmentasi secara efisien untuk menghasilkan ion produk. Hasil ditampilkan dalam bentuk spektrum massa, yang merupakan representasi grafis dari kelimpahan ion versus m/z . Informasi yang diperoleh dari spektrum massa dapat mencakup massa molekul sampel dan massa fragmennya, yang dapat digunakan untuk menentukan struktur molekul. Karena molekul terfragmentasi dengan cara yang unik dalam kondisi tertentu, sampel dapat diidentifikasi secara pasti berdasarkan spektrum massa yang dihasilkan.

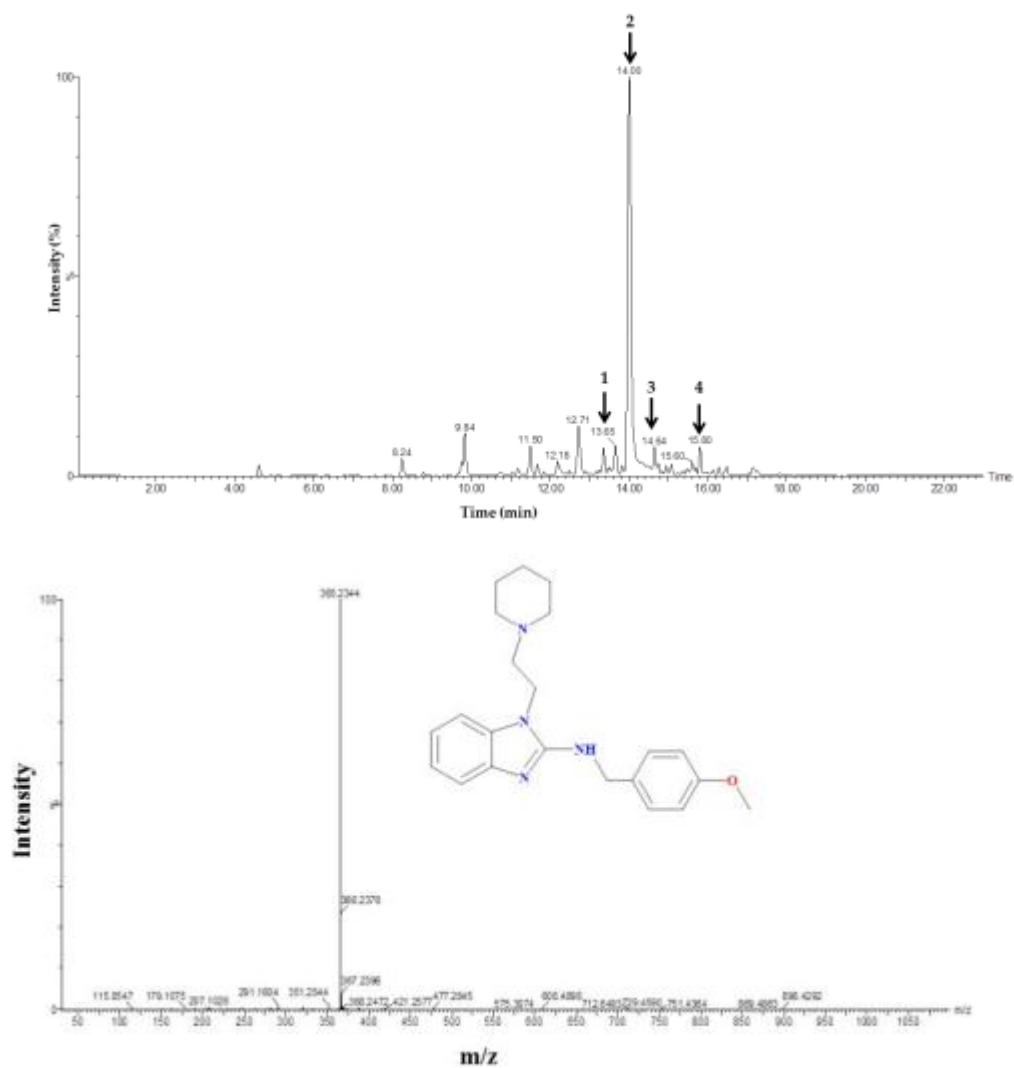
Spektrometer massa biasanya digabungkan dengan salah satu sistem *Gas Chromatography* (GC) atau *Liquid Chromatography* (LC), dan digunakan sebagai pendeteksi; yaitu pemisahan sampel dicapai melalui kromatografi dan senyawa yang dipisahkan masukkan spektrometer massa secara berurutan untuk ionisasi, pemisahan, dan deteksi ion yang dihasilkan. Menggabungkan sistem kromatografi ke spektrometer massa dengan cara ini menghasilkan dua informasi untuk setiap analisis: waktu retensi dan informasi spektral massa untuk setiap senyawa yang dipisahkan, keduanya dapat digunakan sebagai perbandingan dengan standar referensi yang sesuai (Smith, 2013).

Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik *Liquid Chromatography* (LC) dengan kemampuan analisis massa *Mass Spectrometry* (MS). Proses LC-MS/MS melibatkan penyuntikan sampel ke dalam sistem kromatografi cair, di mana komponen-komponen sampel dipisahkan berdasarkan interaksinya dengan fase gerak dan fase diam. Komponen yang terpisah kemudian

dimasukkan ke dalam spektrometer massa, di mana komponen tersebut terionisasi dan dipisahkan berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z). Spektrometer massa mendeteksi ion dan memberikan informasi tentang massa dan kelimpahannya, yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur komponen sampel. Keunggulan LC-MS/MS meliputi kemampuannya untuk menganalisis berbagai macam senyawa, termasuk molekul polar dan non polar, serta sensitivitas dan selektivitasnya yang tinggi (Pitt, 2009).

Mass Spectrometry terdiri dari tiga komponen penting: sumber ion, *mass analyzer*, dan detektor. Sumber ion mengionisasi analit yang diinginkan, *mass analyzer* memilih analit terionisasi berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z), dan detektor menangkap ion yang dipilih, memberikan keluaran yang dapat dibaca (Manohar and Marzinke, 2016).

Berdasarkan penelitian hasil analisis struktur fraksi aktif C38BK2FA menggunakan ESI-TOF-MS sebagai fungisida menunjukkan adanya 10 puncak kromatogram. Sementara itu, interpretasi data spektroskopi massa menunjukkan bahwa empat puncak kromatogram pada waktu retensi 13,65 (1), 14,00 (2), 14,4 (3), dan 15,80 (4) menit memiliki ion puncak molekul $[M + H]^+$ pada m/z 367.2429, 365.2344, dan m/z 367.2344, dengan rumus molekul $C_{22}H_{28}N_4O$, dan ion puncak molekul $[M + H]^+$ pada m/z 447.3065 dengan rumus molekul $C_{23}H_{38}N_6O_3$ menunjukkan bahwa fraksi aktif C38BK2FA memiliki kandungan nitrogen. Berdasarkan database pada Chemspider, rumus molekul $C_{22}H_{28}N_4O$ adalah gugus alkaloid dari benzimidazole dengan nama N-(4-Methoxybenzyl)-1-[2-(1-piperidinyl) ethyl]-1H-benzimidazole-2-amine. Sedangkan senyawa dengan rumus molekul $C_{23}H_{38}N_6O_3$ merupakan senyawa triazol dengan nama Methyl 1-[(3R,5S)-5-(cycloheptylcarbamoyl)-1-(1-ethyl-4-piperidinyl)-3-pyrrolidinyl]-1H-1,2,3-triazole-4-karboksilat. Berdasarkan data yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa aktivitas fungisida dari fraksi aktif C38BK2FA disebabkan oleh adanya senyawa benzimidazole yang termasuk dalam kelompok fungisida sistemik spektrum luas yang telah digunakan untuk mengendalikan penyakit tanaman yang disebabkan oleh *Fusarium spp* (Setiawan, et al., 2022).



Gambar 1. Fraksi C38BK2FA spektrum ESI TOF MSMS, $[M + H]^+ = m/z$ 365,2344 (Setiawan, et al., 2022).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Agustus 2024 sampai Februari 2025 di Unit Pelaksana Analisis (UPA) Laboratorium Terpadu, Universitas Lampung. Analisis LC-MS/MS dilakukan Badan Reserse Kriminal POLRI, Pusat Laboratorium Forensik, Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas yang umum digunakan cawan petri, Erlenmeyer iwaki, pipet tetes, gelas beaker iwaki, gelas ukur iwaki, kapas, kasa onemed, karet gelang, tisu, pinset, botol semprot, plastik wrap, plastik tahan panas, korek api, *cutter*, spidol, pensil, kertas label, spatula logam, jarum ose, bunsen, *hot plate stirrer* Thermolyne, neraca analitik Kern 440-47N, oven jisico, *laminar air flow*, autoklaf Tomy SX-700, corong pisah, *rotary evaporator*, mikropipet biohit, botol vial, chamber, inkubator Kaltis 499 Buchii/R210, *cover slip*, mikroskop Zeiss axio imager A1 dan seperangkat alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat kaca alumina silica gel kielsel 60 F254 dan lampu UV Kohler/SN402006, serta kolom kaca digunakan untuk pemurnian senyawa bioaktif.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit udang, akuades, air laut buatan, agar *swallow*, koloid kitin, alkohol teknis, etil asetat, metanol, n-heksana, reagen visualisasi KLT meliputi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ dan Dragendorff (stok 1: Bismut nitrat, air dan asam asetat glasial; stok 2: larutan KI dengan asam asetat glasial), DCM, silika, *Mueller Hinton* (MH), *Tryptic Soy Broth* (TSB), dan resazurin.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Media

Pada penelitian ini dibuat media tumbuh pada mikroorganisme yang akan dijadikan sampel dan bakteri patogen. Media yang dibuat untuk kultivasi isolat aktinomisetes yaitu media koloid kitin agar, koloid kitin cair dan media kulit udang, sedangkan media untuk uji *bioassay* antibakteri yaitu media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan *Tryptic Soy Broth* (TSB).

3.3.1.1 Media koloid kitin agar

Media koloid kitin agar dibuat mengacu pada metode yang digunakan oleh Hsu and Lockwood (1975). Media dibuat dengan melarutkan 1 gram koloid kitin dan 2 gram agar dalam 100 mL air laut buatan, setelah itu media disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C). 10 mL media steril dituangkan ke dalam 3 cawan petri dan didiamkan sampai menjadi padat di dalam ruangan steril (*Laminar Air Flow*) dibawah sinar UV.

3.3.1.2 Media Koloid Kitin Cair

Media koloid kitin cair dibuat untuk kultivasi dan kultivasi *scale-up* mengacu pada metode yang digunakan oleh Setiawan *et al.* (2021). Media kultivasi dibuat dengan melarutkan 0,2 gram koloid kitin dalam 20 mL air laut buatan. Sedangkan untuk media kultivasi *scale up* dibuat dengan melarutkan 1 gram kitin koloid dalam 100 mL air laut buatan di dalam labu erlenmeyer 250 mL, setelah itu media disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C).

3.3.1.3 Media Kulit Udang

Media kulit udang juga dibuat mengacu pada metode yang digunakan oleh Setiawan *et al.* (2021). Media dibuat dengan mencuci kulit udang hingga bersih dan diblender, lalu 200 gram media kulit udang dimasukkan ke dalam 6 erlenmayer 2 L, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C).

3.3.1.4 Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA dibuat mengacu pada metode yang digunakan oleh Utomo dkk. (2018) dengan sedikit modifikasi. Media dibuat dengan melarutkan 4 gram *Muller Hinton* (MH) dan 4 gram agar dalam 100 mL akuades di dalam erlenmayer 200 mL, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C), kemudian media steril dituangkan ke dalam cawan petri steril dan didiamkan sampai menjadi padat di dalam ruangan steril (*Laminar Air Flow*) dibawah sinar UV.

3.3.1.5 Media *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Media TSB dibuat mengacu pada metode yang digunakan oleh Maryani dkk. (2020). Media dibuat dengan melarutkan 0,75 gram *Tryptic Soy Broth* (TSB) dalam 25 mL akuades di dalam erlenmeyer 50 mL, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada 15 psi (121°C).

3.3.2 Biomaterial

Isolat aktinomisetes yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari deposit UPA Laboratorium Terpadu, Universitas Lampung yang sebelumnya diisolasi dari organisme laut spons. Isolat aktinomisetes yang digunakan ini diperoleh dari perairan Teluk Tomini, Oluhuta, Provinsi Gorontalo (0°25' 11,9" N 12308'31.8" BT) pada Agustus 2019. Isolat tersebut berhasil tumbuh pada media koloid kitin agar. Bakteri patogen *Staphylococcus aureus* yang digunakan pada penelitian ini untuk uji antibakteri diperoleh dari Rumah Sakit Abdul Moeloek, Bandar Lampung dan dipelihara pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

3.3.3 Peremajaan mikroba

Peremajaan mikroba pada penelitian ini terdiri dari mikroba yang berasal dari deposit UPA Laboratorium Terpadu yaitu isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1, dan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* yang diperoleh dari Laboratorium Patologi Klinik, Rumah Sakit Abdul Moelok, Bandar Lampung.

3.3.3.1 Peremajaan isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1

Peremajaan isolat aktinomisetes ini dilakukan menggunakan media koloid kitin agar (sesuai dengan prosedur 3.3.1.1). Deposit isolat 19C38A1 digores pada media koloid kitin agar dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Peremajaan isolat aktinomisetes ini dilakukan pada cawan petri menggunakan teknik gores zig-zag. Sebagai indikator keberhasilan dari peremajaan ini adalah tumbuhnya miselia berwarna putih pada permukaan media. Sebagai identifikasi dan validasi dari jenis isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 tersebut dilakukan secara mikroskopis menggunakan mikroskop Zeiss Axioo Imager A1 pada perbesaran 400 M (prosedur 3.3.4).

3.3.3.2 Peremajaan bakteri patogen

Peremajaan bakteri bertujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan. Peremajaan 2 bakteri patogen mengacu pada metode Wijayati dkk., (2014) dilakukan dengan mengambil satu jarum ose biakan murni kemudian digoreskan dalam biakan agar (sesuai dengan prosedur 3.3.1.4), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.3.4 Identifikasi Aktinomisetes

Identifikasi aktinomisetes dilakukan menggunakan mikroskop Zeiss Axioo Imager A1 pada perbesaran 400 M menggunakan metode *coverslip* 45°. Pada percobaannya, *Kocuria palustris* 19C38A1 digores pada permukaan koloid kitin agar yang telah ditancapkan 2 buah *coverslip* dengan sudut kemiringan 45° dan diinkubasi selama 7 hari, setelah tumbuh diidentifikasi ornamen spora menggunakan mikroskop zeiss axio imager A1 pada perbesaran 400 M merujuk pada Goodfellow *et al.* (2012).

3.3.5 Kultivasi dan Ekstraksi Isolat Aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1

Kultivasi dilakukan dengan metode *solid-state fermentation* (SSF). Kultivasi ini dimulai dengan membuat inokulum terlebih dahulu. Inokulum dibuat dengan

menggunakan media koloid kitin cair (sesuai dengan prosedur 3.3.1.2) yang digoreskan isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 pada media dan diinkubasi selama 7 hari dalam kondisi statis pada suhu ruang, setelah itu dituangkan inokulum isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 ke dalam media kulit udang (sesuai dengan prosedur 3.3.1.3). Kultur diinkubasi selama 5, 6, 7, dan 8 hari pada suhu kamar dalam kondisi statis. Kultur yang telah diinkubasi diekstraksi menggunakan etil asetat. Ekstraksi senyawa metabolit sekunder dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 dilakukan dengan merendam atau maserasi kultur isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 dengan etil asetat selama 2 jam, kemudian suspensi disaring untuk memisahkan kulit udang dan ekstrak. Hasil ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C di bawah tekanan tereduksi.

3.3.6 Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak yang telah dipekatkan dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Ekstrak kasar etil asetat ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan n-heksana : etil asetat (1:1). Kromatogram yang diperoleh diidentifikasi menggunakan lampu UV untuk mengetahui adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan diidentifikasi menggunakan pereaksi visualisasi $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ dan Dragendorff.

3.3.7 Kultivasi *Scale up* dan Pemisahan Senyawa Bioaktif

Kultivasi skala besar dilakukan dengan metode *solid-state fermentation* (SSF). Kultivasi ini dilakukan pada kondisi waktu optimum yaitu pada hari ke-7 dalam kondisi statis, dan kultur dimaserasi menggunakan etil asetat untuk memisahkan dan mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1. Ekstrak yang diperoleh dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C di bawah tekanan tereduksi. Ekstrak pekat etil asetat diidentifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan eluen n-heksana : etil asetat (10:1), selanjutnya difraksinasi menggunakan silika gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck KGaA, Darmstadt, Jerman) kromatografi kolom terbuka dengan fase gerak n-heksana dan etil asetat. Kromatografi lapis

tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan silika gel F254 (lembaran aluminium, Merck KgaA, Darmstadt, Jerman) dan reagen spesifik Dragendorff (Larutan 1: 1,7 g bismut nitrat dengan 80 mL air dan 20 mL asam asetat glasial; Larutan 2: Larutan KI (50% b/v, 100 mL) dengan asam asetat glasial).

3.3.8 Skrining aktivitas antibakteri

Uji untuk menentukan bioaktivitas antibakteri pada masing-masing fraksi yang diperoleh terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan metode KLT bioautografi. Uji ini dimulai dengan peremajaan bakteri patogen (prosedur 3.3.3.2) selama 24 jam, kemudian dibuat inokulum pada media TSB (prosedur 3.3.1.5) hingga kekeruhan 0,5 McFarland. Fraksi yang diperoleh dari proses pemisahan ditotolkan pada plat KLT silica gel GF254 yang dielusi dengan n-heksana:etil asetat (1:1). Plat KLT yang telah dielusi ini ditempatkan pada cawan petri steril dan dituangkan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (prosedur 3.3.1.4) yang digoreskan suspensi bakteri patogen (0,5 McFarland) sebanyak 1 mL secara merata, selanjutnya didinginkan pada *freezer* selama 15 menit dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Kemudian ditetesi dengan pereaksi resazurin, zona hambat yang terbentuk diamati di sekeliling cawan petri.

3.3.9 Pemurnian Senyawa Bioaktif Isolat Aktinomistes 19C38A1

Pemurnian senyawa bioaktif dilakukan dengan rekromatografi kolom pada fraksi F4. Ekstrak difraksinasi menggunakan silika gel 60 (0,063-0,200 mm, Merck KgaA, Darmstadt, Jerman) kromatografi kolom terbuka dengan fase gerak DCM dan metanol. Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan dengan menggunakan silika gel F254 (lembaran aluminium, Merck KgaA, Darmstadt, Jerman) dan reagen spesifik Dragendorff (Larutan 1: 1,7 g bismut nitrat dengan 80 mL air dan 20 mL asam asetat glasial; Larutan 2: Larutan KI (50% b/v, 100 mL) dengan asam asetat glasial). Fraksi yang diperoleh diuji bioaktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan metode KLT bioautografi yang dielusi dengan DCM : metanol (3:1). Zona hambat yang terbentuk diamati di sekeliling cawan petri.

3.3.10 Karakterisasi

3.3.10.1 Spektroskopi Fourier Transform Infrared (FTIR)

Senyawa metabolit sekunder hasil isolasi yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan spektrofotometer FTIR untuk mengetahui gugus-gugus fungsional dari senyawa metabolit sekunder yang telah diisolasi. Analisis FTIR dilakukan terhadap senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 pada kisaran 400-4000 cm^{-1} .

3.3.10.2 Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometer/Mass Chromatography (LC-MS/MS)

Identifikasi dan karakterisasi senyawa antibakteri yang dihasilkan oleh isolat 19C38A1 dilakukan dengan menggunakan LC-MS/MS Mode Positif. Fraksi aktif dilarutkan dalam metanol dan dianalisis melalui analisis LC-MS/MS. *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometer/Mass Chromatography* (LC-MS/MS) digunakan untuk menentukan berat molekul dan pola fragmentasi senyawa. Dalam karakterisasi menggunakan LC-MS/MS, ekstrak isolat aktinomisetes disuntikkan ke dalam kolom kromatografi. Fase gerak didorong ke kolom oleh pompa bertekanan tinggi dengan laju aliran yang dapat direproduksi. Elusi gradien umumnya digunakan saat komposisi fase gerak (persentase polar versus non-polar) bervariasi selama proses, seperti waktu yang dibutuhkan untuk mengeluarkan analit yang diinginkan, membersihkan kolom, dan kemudian menyeimbangkan kembali kolom.

3.3.11 Diagram Alir Penelitian

Diagram alir prosedur penelitian dapat dilihat pada Lampiran 1.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Berdasarkan pembahasan penelitian, maka dapat disimpulkan:

1. Ekstrak kasar etil asetat dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 menunjukkan waktu kultivasi yang optimal pada waktu inkubasi 7 hari, dibuktikan dengan analisis KLT.
2. Senyawa metabolit yang dihasilkan dari isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen *Staphylococcus aureus*.
3. Fraksi ekstrak isolat aktinomisetes *Kocuria palustris* 19C38A1 menghasilkan senyawa peptida dengan pola L-prolyl-L-glutaminyl-L-leucyl-L-alanyl-L-threonyl-L-leucine, yang dikonfirmasi melalui karakterisasi LCMS/MS dan spektroskopi FTIR.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis memberikan saran yaitu

1. Perlu dilakukan optimasi kondisi pH fermentasi untuk efisiensi produksi senyawa metabolit bioaktif.
2. Perlu dilakukan uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) untuk mengevaluasi daya hambat senyawa antibakteri yang dihasilkan terhadap pertumbuhan bakteri patogen, serta untuk menentukan efektivitas dan potensi resistensi patogen terhadap senyawa antibakteri yang diperoleh.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdelmohsen, U. R., Bayera, K., and Hentschel, U. 2014. Diversity, Abundance and Natural Products of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Nat. Prod. Rep.*, 31(3): 381-399.
- Akbarian, M., Khani, A., Eghbaltpour, S., and Uversky, V. N. 2022. Bioactive Peptida: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1-30.
- Almaary, K. S., Alharbi, N. S., Kadaikunnan, S., Khaled, J. M., Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Kanisha, C. C., Murugan, M., and Alanzi, K. F. 2021. Anti-bacterial Effect of Marine Sea Grasses Mediated Endophytic Actinomycetes Against *K. pneumoniae*. *Journal of King Saud University-Science*, 33: 1-7.
- Alqahtani, S. S., Moni, S. S., Sultan, M. H., Bakkar, M. A., Madkhali, O. A., Alshahrani, S., Hafiz A., Menachery, S. J., Rehman, Z. U., Alam, M. S., Mohan, S. Elmobark, Mo. E., Banji, D., and Say, M. Z. 2022. Potential Bioactive Secondary Metabolites of Actinomycetes sp. Isolated from Rocky Soils of the Heritage village Rijal Alma, Saudi Arabia. *Arabian Journal of Chemistry*, 15: 1-15.
- Anggraini, A. D., Puspitasari, A., dan Rahayuningsih, C. K. 2021. Potensi Metabolit Sekunder Isolat Aktinomycetes Sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri Terhadap *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Dari Tanah Mangrove Wonorejo Surabaya. *The Journal Of Muhammadiyah Medical Laboratory Technologis*, 4(2): 181-187.
- Balachandar, R., Karmegam, N., Subbaiya, R., Boom, P., Karthik, D., and Saravanan, M. 2019. Optimization of Culture Medium for Improved Production of Antimicrobial Compounds by *Amycolatopsis* sp. -AS9 Isolated from Vermicasts. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20: 1-8.
- Balachandar, R., Karmegam, N., Saravanan, M., Subbaiya, R., and Gurumoorthy, P. 2018. Synthesis of Bioactive Compounds from Vermicast Isolated Actinomycetes Species and its Antimicrobial Activity Against Human Patogenic Bacteria. *Microbial Patogenesis*, 121: 155–16.

- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibnsouda, S. K. 2016. Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6: 71-79.
- Barbieri, J. T., and Sun, J. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* ExoS and ExoT. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 152: 79-92.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., and Wezel, G. P. V. 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 80: 1-43.
- Besharati, M., and Lackner, M. 2023. Bioaktive peptidas: a Review. *The EuroBiotech Journal*, 7 (4): 176-188.
- Brzezinska, M. S., Walczak, M., Lalke-Porczyk, E., and Donderski, W. 2010. Utilization of Shrimp-Shell Waste as a Substrate for the Activity of Chitinases Produced by Microorganisms. *Polish J. of Environ. Stud.*, 19(1): 177-182.
- Budi, M. B., Giyanto, and Tondok, E. T. 2022. Isolation of Actinomycetes from Peatland to Suppress the Growth of *Ganoderma boninense* the Causal Agent of Basal Stem Rot Disease in Oil Palm. *Biodiversitas*, 23 (11): 5914-5922.
- Burhamzah, R., dan Rante, H. 2019. Isolasi dan Skrining Aktinomisetes Laut Penghasil Senyawa Antibakteri-Multi Drug Resistance dari Sedimen Laut Pantai Galesong. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 23(3): 79-81.
- Carlina, Z., Firmani, U., dan Luthfiah, S. 2020. Karakterisasi Bakteri Saluran Pencernaan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Perikanan Pantura (JPP)*, 3(2): 36-48.
- CDC. 2019. *Antibiotic Resistance Threats in the United States* . Atlanta, GA: U.S. : Department of Health and Human Services.
- Chen, J., Xu, L., Zhou, Y., and Han, B. 2021. Natural Products from Actinomycetes Associated with Marine Organisms. *Marine Drugs*, 19(11): 1-57.
- Davies-Bolorunduro, O., Osuolale, O., Saibu, S., Adeleye, I., and Aminah, N. 2021. Bioprospecting Marine Actinomycetes for Antileishmanial Drugs: Current Perspectives and Future Prospects. *Heliyon*, 7: 1-12.
- Dewi, M. K., Ratnasari, E., dan Trimulyono, G. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Majapahit (*Crescentia cujete*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *LenteraBio*, 3(1): 51-57.

- Diggle, S. P., and Whiteley, M. 2020. Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: Opportunistic Pathogen and Lab Rat. *Microbiology*, 166(1): 30-33.
- Eguchi, R., Ono, N., Morita, A. H., Katsuragi, T., Nakamura, S., Huang, M., Altaf-Ul-Amin, M., and Kanaya, S. 2019. Classification of Alkaloids According to the Starting Substances of Their Biosynthetic Pathways Using Graph Convolutional Neural Networks. *BMC Bioinformatics*, 20(1): 1-13.
- Espitia, P. J., Soares, N. d., Coimbra, J. S., Andrade, N. J., Cruz, R. S., and Medeiros, E. A. 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11: 187-204.
- Faruqi, M. F., Bahar, M., Yusmaini, H., and Pramesyanti, A. 2023. Optimization of Fermentation Time of Actinomycetes Isolate on The Growth of *Trichophyton rubrum* In Vitro. *Seminar Nasional Riset Kedokteran*, 41-49.
- Forestryana, D., dan Arnida. 2020. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2): 113-124.
- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., and Suzuki, K. L. 2012. (Eds.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. *Springer: New York, NY, USA*.
- Gustiana, T., Rozirwan, dan Ulqodry, T. Z. 2021. Actinomycetes yang Diisolat dari Mangrove *Rhizophora apiculata* di Perairan Tanjung Api-api, Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains*, 23(3): 140-149.
- Hazarika, S. N., and Thakur, D. 2020. Chapter 21 - Actinobacteria. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology* (pp. 443-476). Assam, India: Academic Press.
- Hsu, S. C., and Lockwood, J. L. 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. *Applied Microbiology*, 29(3): 422-426.
- Ismail, B., and Nielsen, S. 2010. Basic Principles of Chromatography. In *Food Analysis* (pp. 473-498). Boston, MA: Springer.
- Jadon, P., Dwivedi, A., Singh, C., and Kumar, A. 2019. Optimization of Various Physiochemical Parameters to Enhance Production of Secondary Metabolite from Soil Actinomycetes Against Dermatophytes. *Environment Conservation Journal*, 20 (1&2): 35-40.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R. E. 2006. Peptida Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3): 491-511.

- Kadaikunnan, S., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Alobaidi, A. S., Rajivgandhi, G. N., Ramachandran, G., Gnanasekaran, C., Chelliah, C. K., Alanzi, K. F., and Manoharan, N. 2021. Partially Purified Actinomycetes Compounds Enhance the Intracellular Damages in Multi-drug Resistant *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. *Saudi J Biol Sci*, 28(11):6057-6062.
- Kalaiyarasi, M., Ahmad, P., and Vijayaraghavan, P. 2020. Enhanced Production Antibiotics Using Green Gram Husk Medium by *Streptomyces* sp. SD1 Using Response Surface Methodology. *Journal of King Saud University – Science*, 32(3):2134-2141.
- Kandi, V., Palange, P., Vaish, R., Bhatti, A. B., Kale, V., Kandi, M. R., and Bhoomagiri, M. R. 2016. Emerging Bacterial Infection: Identification and Clinical Significance of *Kocuria* Species. *Cureus*, 8(8):1-6.
- Kartikasari, N., dan Purwestri, Y. A. 2021. Kemampuan Antibakteri Senyawa Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Tanaman Purwoceng terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu Hayat*, 5(1): 17-24.
- Kassem, A., Abbas, L., Countinho, O., Opara, S., Najaf, H., Kasperek, D., Pokhrel, K., Li, X., and Tiquia-Arashiro, S. 2023. Applications of Fourier Transform-Infrared Spectroscopy in Microbial Cell Biology and Environmental Microbiology: Advances, Challenges, and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 14: 01-25.
- Kumar, S., Jyotirmayee, K., and Sarangi, M. 2013. Thin Layer Chromatography: A Tool of Biotechnology for Isolation of Bioactive Compounds from Medicinal Plants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 18(1): 126-132.
- Kumar, V., Ahluwalia, V., Saran, S., Kumar, J., Patel, A. K., and Singhanian, R. R. 2021. Recent Developments on Solid-State Fermentation for Production of Microbial Secondary Metabolites: Challenges and Solutions. *Bioresource Technology*, 323.
- Laila, A., Setiawan, F., Widyastuti, W., Fadhillah, M. R., Setiawan, A., Juliasih, N. L., Setiawan, W. A., Apriliana, E., Ahmadi, ., and Arai, M. 2023. Exploration and Biorefinery Antimicrobial Agent through Solid State Fermentation from Indonesia's Marine Actinomycetes. *Fermentation*, 9(334): 1-14.
- Lajtai-Szabó, P., Hülber-Beyer, É., Nemestóthy, N., and Bélafi-Bakó, K. 2022. The Role of Physical Support in Secondary Metabolite Production by *Streptomyces* Species. *Biochemical Engineering Journal*, 185.

- Liu, Z., Sun, W., Hu, Z., Wang, W., and Zhang, H. 2024. Marine Streptomyces-Derived Novel Alkaloids Discovered in the Past Decade. *Mar. Drugs*, 22(1): 51.
- Mancuso, G., Midiri, A., Gerace, E., and Biondo, C. 2021. Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Patogens. *Patogen*, 10: 1310.
- Manohar, M., and Marzinke, M. A. 2016. Application of Chromatography Combined With Mass Spectrometry in Therapeutic Drug Monitoring. *Clinical Challenges in Therapeutic Drug Monitoring*, 45-70.
- Maryani, Monalisa, S. S., dan Panjaitan, R. S. 2020. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia catappa*) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* Pada Uji In Vitro. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 10(2): 196-208.
- Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M., and Shivaveerakumar, S. 2024. Actinomycetes: Isolation. Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(1): 118-143.
- Mihaylova-Garnizova, R., Davidona, S., Hodzhev, Y., and Satchanska, G. 2024. Antimicrobial Peptidas Derived from Bacteria: Classification, Sources, and Mechanism of Action against Multidrag-Resistant Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(19): 1-21.
- Millah, Z. N., Triatmoko, B., dan Nugraha, A. S. 2022. Isolasi Fungi Tanah Muara Desa Pasir Putih Kabupaten Situbondo serta Penapisan Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 20(2): 150-157.
- Moradali, M. F., Ghods, S., and Rehm, B. H. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 7(39) :1-29.
- Nurhidayanti, dan Sari, R. R. 2022. Perbedaan Karakteristik Koloni Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Media Agar Darah Domba dan Media Agar Darah Manusia. *Jurnal Analisis Kesehatan*, 11 (1): 30-34.
- Obi, C. N. 2019. Solid State Fermentation: Substrates Uses and Applications in Biomass and Metabolites Production- A Review. *South Asian Research Journal of Biology and Applied Biosciences*, 1(1): 20-29.
- Pal, A., and Bala, S. C. 2022. Comparative Study of Thin-Layer Chromatography Bioautography and Antioxidant Activities of Different Parts of *Clitoria ternatea* (Fabaceae). *Asian J Pharm Clin Res*, 15(3): 134-138.

- Pan, C., Hassan, S. S., Ishaq, M., Yan, S., and Jin, H. 2025. Marine Actinomycetes: a Hidden Treasure Trove for Antibacterial Discovery. *Frontiers in Marine Science*,12: 1-8.
- Pang, R., Zhou, H., Huang, Y., Su, Y., and Chen, X. 2020. Inhibition of Host Arginase Activity Against *Staphylococcal Bloodstream* Infection by Different Metabolites. *Frontiers in Immunology*,11: 1-11.
- Pebe, M. A. 2022. Uji Konfirmasi Morfin dengan Metode KLT. *HUMANTECH: Jurnal Ilmiah Multi Disiplin Indonesia*, 1(7): 867-876.
- Pirutin, S. K., Jia, S., Yusipovich, A. I., Shank, M. A., Parshina, E. Y., and Rubin, A. B. 2023. Vibrational Spectroscopy as a Tool for Bioanalytical and Biomonitoring Studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8): 1-35.
- Pitt, J. J. 2009. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 30(1):19-34.
- Purssell, E. 2019. Antimicrobials. *Understanding Pharmacology in Nursing Practice*, 4:147–65.
- Rahmadani, Rahmah, M., dan Maulida, R. M. 2022. Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Deksametason Pada Jamu Penggemuk Badan. *FARMASIS: Jurnal Sains Farmasi*, 3(2): 86-91.
- Rianti, E. D., Tania, P. O., dan Listyawati, A. F. 2022. Kuat Medan Listrik AC Dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Biologi*, 11(1): 79-88.
- Riwanti, P., Izazih, F., dan Amaliyah. 2020. Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% *Sargassum polycystum* dari Madura. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 2(2): 82-95.
- Rokhmah, M., dan Rusmalina, S. 2023. Analisis Rhodamin B Pada Bumbu Tabur Balado Di Pasar Kecamatan Ulujami dan Comal Menggunakan Metode Benang Wol Dan KLT. *Jurnal Kesehatan Aeromedika*, 9(1): 48-54.
- Sanjeewa, K. A., Herath, K., Kim, Y.-S., Jeon, Y.-J., and Kim, S.-K. 2023. Enzyme-Assisted Extraction of Bioactive Compounds from Seaweeds and Microalgae. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 167.
- Savini, V. 2018. *Pet-to-Man Travelling Staphylococci*. London, United Kingdom: Academic Press.

- Selim, M. S., 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., Setiawan, F., Juliasih, N. L., 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*. *Fungi*, 1-11.
- 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*, 1-10.
- Shou, Y., Wang, M., Cao, J., She, Y., Cao, Z., Hao, Z., Jin, F., Wang, J., and El-Aty, A. A. 2023. A Method for the Rapid Determination of Pesticides Coupling Thin-Layer Chromatography and Enzyme Inhibition Principles. 416.
- Siddique, I. M. 2024. Exploring Functional Groups and Molecular Structure: A Comprehensive Analysis using FTIR Spectroscopy. *Chemistry Research Journal*, 9(2): 70-76.
- Siro, G., Pipite, A., Christi, K., Srinivasan, S., and Subramani, R. 2022. Review Marine Actinomycetes Associated with Stony Corals: A Potential Hotspot for Specialized Metabolites. *Microorganisms*, 10(7): 1-32.
- Smith, R. W. 2013. Mass Spectrometry. *Encyclopedia of Forensic Sciences*, 603-608.
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., Bharti, R., Kumar, D., and Kharwar, R. N. 2021. Advances in Extraction Technologies: Isolation and Purification of Bioactive Compounds from Biological Materials. In *Natural Bioactive Compounds* (pp. 409-433). Varanasi, Uttar Pradesh, India: Academic Press.
- Utomo, S. B., Fujiyanti, M., Lestari, W. P., dan Mulyani, S. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Senyawa C-4-Metoksifenilkaliks[4]resorsinarena Termodifikasi Hexadecyltrimethylammonium-Bromide Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*, 3(3): 201-209.
- Varçin, M., Şener, B. B., and Bayraç, C. 2020. Adsorption of Resazurin by Poly(acrylic acid) Hydrogels and Evaluation of its use in Reduction Assay for Cell Viability. *Dyes and Pigments*, 186; 1-9.

- Wahyuningsih, N., dan Zulaika, E. 2018. Perbandingan Pertumbuhan Bakteri Selulolitik Pada Media Nutrient Broth dan Carboxy Methyl Cellulose. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 7(2): 36-38.
- Wang, M., Zhang, Y., Wang, R., Wang, Z., Yang, B., and Kuang, H. 2021. An Evolving Technology That Integrates Classical Methods with Continuous Technological Developments: Thin-Layer Chromatography Bioautography. *Molecules*, 1-21.
- Wijayati, N., Astutiningsih, C., dan Mulyati, S. 2014. Transformasi α -Pinena dengan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25923. *Biosaintifika*, 6 (1):24-28.
- Zaky, A. A., Simal-Gandara, J., Eun, J.-B., Shim, J.-H., and EL-Aty, A. M. 2022. Bioactive, Application, Safety, and Health Benefits of Bioactive Peptides From and By-Products: A Review. *Frontiers in Nutrition* , 8, 1-18.
- Zang, Y., Miao, Y., Wu, T., and Cheng, Z. 2021. Development of a Thin-Layer Chromatography Bioautographic Assay for Neuraminidase Inhibitors Hyphenated with Electrostatic Field Induced Spray Ionisation-Mass Spectrometry for Identification of Active *Isatis indigotica* Root Compounds. *Journal of Chromatography A*.
- Ziogou, A., I. G., Giannakodimos, A., Baliou, S., and Ioannou, P. 2023. Kocuria Species Infections in Humans-A Narrative Review. *Microorganisms*, 11(9): 1-13.