

**ANALISIS METABOLIT SEKUNDER MIKROALGA DIATOM ASAL
LAMPUNG TIMUR MENGGUNAKAN LC-MS/MS SEBAGAI
ANTIBIOFILM**

(Skripsi)

Oleh

**HASMAWATI
2117011099**



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

ABSTRAK

Analisis Metabolit Sekunder Mikroalga Diatom Asal Lampung Timur Menggunakan LC-MS/MS Sebagai Antibiofilm

Oleh

Hasmawati

Kemampuan bakteri membentuk biofilm menjadi salah satu penyebab utama meningkatnya ketahanan bakteri patogen terhadap berbagai antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibiofilm dan mengidentifikasi senyawa bioaktif dari ekstrak diatom asal perairan mangrove Lampung Timur menggunakan metode LC-MS/MS. Diatom dikultivasi selama 11 hari, dipanen pada fase stasioner, kemudian diekstraksi dengan pelarut diklorometana:metanol (3:1) dan dipartisi untuk menghasilkan fraksi DCM dan metanol. Uji antibiofilm terhadap *P. aeruginosa* dilakukan menggunakan metode kristal violet pada *microtiter plate 96-well*. Fraksi metanol menunjukkan aktivitas antibiofilm yang signifikan dengan kerusakan struktur biofilm pasca perlakuan. Hasil analisis LC-MS/MS terhadap fraksi metanol mengungkapkan keberadaan senyawa lipopeptida kompleks dengan rumus molekul $C_{52}H_{99}N_{11}O_7$ (m/z 990.7780), yang berperan sebagai agen antibiofilm. Penelitian ini menunjukkan bahwa diatom dari Lampung Timur berpotensi sebagai sumber senyawa bioaktif untuk pengembangan agen antibiofilm alami yang ramah lingkungan.

Kata kunci: Diatom, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiofilm, LC-MS/MS, lipopeptida, metabolit sekunder

ABSTRACT

Analysis Secondary Metabolites of Diatom Microalgae from East Lampung Using LC-MS/MS as Antibiofilms

By

Hasmawati

The ability of bacteria to form biofilms is one of the main causes of increased resistance of pathogenic bacteria to various antibiotics. This study aims to test the antibiofilm activity and identify bioactive compounds from diatom extracts from East Lampung mangrove waters using LC-MS/MS method. Diatoms were cultivated for 11 days, harvested at stationary phase, then extracted with dichloromethane:methanol (3:1) solvent and partitioned to produce DCM and methanol fractions. Antibiofilm assay against *P. aeruginosa* was performed using crystal violet method on 96-well microtiter plate. The methanol fraction showed significant antibiofilm activity with damage to the biofilm structure after treatment. LC-MS/MS analysis of the methanol fraction revealed the presence of a complex lipopeptide compound with the molecular formula $C_{52}H_{99}N_{11}O_7$ (m/z 990.7780), which acts as an antibiofilm agent. This study shows that diatoms from East Lampung have the potential as a source of bioactive compounds for the development of environmentally friendly natural antibiofilm agents.

Key words: Diatoms, *Pseudomonas aeruginosa*, antibiofilm, LC-MS/MS, lipopeptides, secondary metabolites

**ANALISIS METABOLIT SEKUNDER MIKROALGA DIATOM ASAL
LAMPUNG TIMUR MENGGUNAKAN LC-MS/MS SEBAGAI
ANTIBIOFILM**

Oleh

Hasmawati

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 : **ANALISIS METABOLIT SEKUNDER
MIKROALGA DIATOM ASAL LAMPUNG
TIMUR MENGGUNAKAN LC-MS/MS
SEBAGAI ANTIBIOFILM**

Nama : **Hasmawati**

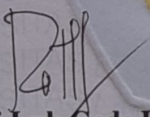
Nomor Pokok Mahasiswa : **2117011099**

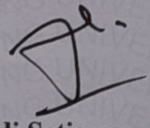
Jurusan : **Kimia**

Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

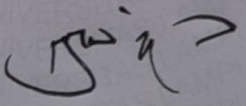


1. Komisi Pembimbing


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


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

2. Wakil Dekan Bidang Akademik dan Kerja Sama
FMIPA Universitas Lampung


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua

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

Sekretaris

: Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.

Penguji

Bukan Pembimbing : Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.

2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: 16 Juni 2025

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Hasmawati
Nomor Pokok Mahasiswa : 2117011099
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang berjudul “Analisis Metabolit Sekunder Mikroalga Diatom Asal Lampung Timur Menggunakan LC-MS/MS Sebagai Antibiofilm” adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebagai publikasi.

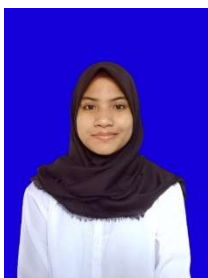
Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana semestinya.

Bandar Lampung, 26 Juni 2025



Hasmawati
NPM 2117011099

RIWAYAT HIDUP



Penulis bernama Hasmawati, lahir di Cilegon pada tanggal 25 Februari 2002. Penulis merupakan putri dari Bapak Sadeli dan Ibu Nurjanah, serta berdomisili di Link. Weri RT 03/RW 02, Kelurahan Kebonsari, Kecamatan Citangkil, Kota Cilegon, Banten. Pendidikan dasar ditempuh di SD Negeri Kepuh Denok dan lulus pada tahun 2015. Penulis melanjutkan pendidikan ke SMP Negeri 11 Cilegon dan lulus pada tahun 2018, kemudian menempuh pendidikan menengah kejuruan di SMK Negeri 2 Cilegon jurusan Kimia Analis, dan lulus pada tahun 2021. Pada tahun yang sama, penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA), Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif dalam kegiatan organisasi kemahasiswaan, antara lain sebagai Anggota Biro Penerbitan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) periode 2022–2023 dan Anggota Departemen Riset dan Penalaran UKM Penelitian periode 2022–2023 Universitas Lampung. Penulis juga mengikuti Program Merdeka Belajar Kampus Merdeka (MBKM) bidang Kewirausahaan pada tahun 2023 dengan produk inovasi bernama “Puding Bunga Telang (PULANG)”. Penulis melaksanakan Kuliah Kerja Nyata (KKN) 2023 di Desa Rejomulyo, Kabupaten Lampung Selatan. Penulis juga telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Metanol Mikroalga Asal Lampung terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*” yang dilaksanakan di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) FMIPA Universitas Lampung.

MOTTO

"Percaya pada diri sendiri adalah awal menuju kemandirian dan kesuksesan, jangan biarkan orang lain menentukan arah hidupmu"

(Hasmawati)

"Maka sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan. Sesungguhnya bersama kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan yang lain). Dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap"

(Q.S AL-Insyirah : 6-8)

"Seberat apapun Allah SWT tidak akan membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya"

(Q.S AL-Baqarah : 286)

"Education is the most powerful weapon which you can use to change the world"

(Nelson Mandele)

"Sukses bukanlah milik orang pintar, tapi milik mereka yang mau berusaha"

(Bob Sadino)

PERSEMBAHAN

Dengan mengucap *Alhamdulillah*, tiada sanjungan dan pujian yang berhak diucapkan selain hanya kepada Allah SWT. Sholawat beriring salam kepada nabi Muhammad SAW seorang nabi yang sangat luar biasa untuk dijadikan tauladan umat manusia.

Dengan segala kerendahan hati kupersembahkan karya kecilku ini sebagai wujud cinta, bakti, dan tanggung jawabku kepada Kedua Orang Tuaku tercinta (Dua Insan yang paling berjasa, penyemangat luar biasa, yang selalu berdoa untuk kesuksesanku).

Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. dan Bapak Mulyono, M.Si., Ph.D. dosen yang selalu membimbing dalam mengerjakan penelitian dan tugas akhir.

Seluruh Bapak dan Ibu dosen Jurusan Kimia yang telah memberikan ilmu, bimbingan, dan membagi pengalaman kepada penulis selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Seluruh keluarga besarku yang selalu memberikan bantuan, dukungan, dan motivasi. Almater tercinta Kimia FMIPA Universitas Lampung

SANWACANA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala limpahan karunia, rahmat dan kasih sayang-Nya yang tiada henti sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik yang berjudul **“Analisis Metabolit Sekunder Mikroalga Diatom Asal Lampung Timur Menggunakan LC-MS/MS Sebagai Antibiofilm”**. Sholawat serta salam tak lupa penulis haturkan kepada junjungan besar Nabi Muhammad SAW, keluarga, sahabat, dan seluruh umatnya yang senantiasa taat mengamalkan ajaran dan sunnahnya. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mendapatkan gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu kritik dan saran dari semua pihak yang bersifat membangun selalu penulis terima demi kebaikan skripsi ini. Dengan segala kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu dan mendukung dalam penyusunan skripsi ini dari awal sampai akhir kepada:

1. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasi, M.Si. selaku dosen pembimbing utama dan dosen akademik yang telah membimbing, memotivasi, dan memberikan semangat kepada penulis selama proses penyusunan skripsi.
2. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph. D. selaku dosen pembimbing kedua yang telah membimbing, memotivasi, dan memberikan semangat kepada penulis selama proses penyusunan skripsi.

3. Bapak Mulyono, Ph. D. selaku penguji pada ujian skripsi yang telah memberikan masukan, motivasi dan saran – saran yang telah diberikan.
4. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku Ketua Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, M.Si. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
6. Bapak dan Ibu dosen jurusan kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu dan bimbingan yang telah diberikan selama penulis menjalani perkuliahan.
7. Bapak dan Ibu staff Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung.
8. Terkhusus kedua orang tua tercinta, yang telah memberikan semangat, motivasi, doa, kasih sayang yang tulus dan dukungan yang tiada henti selama ini.
9. Kepada kakak-kakakku tersayang yang selalu mendoakan serta memberikan semangat dan dukungan untuk menyelesaikan skripsi ini.
10. Seluruh keluarga besar penulis yang telah memberikan support, motivasi, semangat dan doa kepada penulis.
11. Kakak – kakak “*Microalgae Research*” Mba Sinur, Mba Leha, Mba Novita, Mba Fyra, Mba Risdi, Mba Olivia, dan ka Riyadi yang telah membimbing dan memberikan semangat kepada penulis.
12. Rekan penelitian mikroalga Sovia dan Hurin yang telah memberikan bantuan dan semangat selama proses penelitian.
13. Mba Rosyi dan kak Fendi terima kasih telah membantu, membimbing dan memberikan semangat kepada penulis selama proses penelitian.
14. Sahabatku Nella Simanjuntak, Suci Dera Jenita, dan Kurniawan Sugiarto yang telah memberikan keceriaan, memberikan bantuan dan semangat selama penulis berkuliah. Semoga kebaikan selalu menyertai kalian.
15. Teman – teman kosan asrama putri ayu Tyas, Avi, Hanna, Rika, Erwanda, Nadira, Ayu, Ulma, dan Caca yang telah memberikan dukungan dan semangat kepada penulis.

16. Partner kuliah Putu Devi, Putri Ilda, Amalia, Wahyuni, Aprillia, dan Camelia yang telah memberikan semangat kepada penulis.
17. Teman – teman penelitian LTSIT yang telah memberikan bantuan dan semangat selama proses penelitian.
18. Keluarga besar Jurusan Kimia khususnya mahasiswa kimia angkatan 2021 atas segala kebersamaannya dan kekeluargaannya selama ini.
19. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang secara tulus memberikan moril dan materil kepada penulis.
20. Terakhir, terima kasih untuk diri sendiri yang telah mampu berusaha keras dan berjuang sejauh ini.

Bandar Lampung, 26 Juni 2025

Penulis

Hasmawati

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Tujuan Penelitian	4
1.3 Manfaat Penelitian	4
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Mikroalga.....	5
2.2 Diatom.....	6
2.3 Siklus Pertumbuhan Mikroalga.....	7
2.4 Faktor Pertumbuhan Mikroalga	8
2.5 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.6 Biofilm	12
2.7 Antibiofilm.....	13
2.8 Ekstraksi.....	14
2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	16
2.10 <i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)</i>	17
III. METODE PENELITIAN.....	19
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
3.2 Alat dan Bahan.....	19
3.3 Prosedur Penelitian	25
3.3.1 Kultivasi Mikroalga	25
3.3.2 Pemanenan dan Ekstraksi Biomassa Mikroalga	25
3.3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis	26

3.3.4	Peremajaan Isolat Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
3.3.5	Uji Aktivitas Antibiofilm	27
3.3.6	Analisis Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)	28
3.3.7	Diagram Alir.....	29
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN	25
4.1	Kultivasi Diatom.....	25
4.2	Pemanenan dan Ekstraksi Biomassa Diatom	25
4.3	Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis.....	26
V.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	27
5.1	Kesimpulan	27
5.2	Saran	27
	DAFTAR PUSTAKA.....	28
	LAMPIRAN.....	33

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
Gambar 1. Beberapa spesies mikroalga dari kelas diatom.....	6
Gambar 2. Fase pertumbuhan mikroalga	8
Gambar 3. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
Gambar 4. Skema proses pembentukan biofilm dan strategi antibiofilm	14
Gambar 5. Prinsip Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	17
Gambar 6. Skema alat LC- MS/MS	19

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antimicrobial Resistance (AMR) menjadi salah satu ancaman global serius di abad ke-21, ditandai dengan meningkatnya infeksi kebal obat akibat mutasi mikroorganisme, terutama karena penggunaan antibiotik berlebihan. Pada 2019, AMR menyebabkan lebih dari 1,2 juta kematian, dan diperkirakan akan meningkat hingga 10 juta per tahun pada 2050 jika tidak segera ditangani (Tang *et al.*, 2023). Berdasarkan data *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) Amerika Serikat, menunjukkan bahwa terjadi 3 juta infeksi akibat resistensi bakteri setiap tahun dan lebih dari 48.000 orang meninggal (CDC, 2024). AMR berdampak besar pada ekonomi dan sistem kesehatan yang menyebabkan penurunan produktivitas dan meningkatnya biaya perawatan (Sharma *et al.*, 2024). Bakteri patogen seperti *E. coli*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa* memicu jutaan kematian. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* multiresisten menjadi tantangan besar dalam dunia medis karena sifatnya yang resisten terhadap banyak obat dan kemampuannya membentuk biofilm, yang mempersulit pengobatan infeksi dan meningkatkan resistensi terhadap antibiotik (Sapagh *et al.*, 2023).

Pembentukan biofilm pada bakteri patogen salah satu penyebab resistensi yang berkontribusi pada peningkatan resistensi antimikroba terhadap berbagai antibiotik

(Penesyian *et al.*, 2020). Biofilm mampu melindungi bakteri dari serangan luar, termasuk antibiotik, dan bakteri patogen dalam biofilm menunjukkan tingkat resistensi yang lebih tinggi dibandingkan saat tidak membentuk biofilm (Bowler, 2018). Saat ini, informasi mengenai agen antibiofilm yang secara spesifik menargetkan biofilm bakteri masih sangat terbatas. Salah satu solusi untuk mengatasi resisten adalah dengan mencari senyawa antibiofilm, dan mikroalga menjadi salah satu sumber potensial untuk senyawa tersebut (Lopez and Soto, 2019).

Mikroalga dapat menghasilkan berbagai metabolit sekunder, seperti asam lemak, karotenoid, dan polisakarida yang memiliki sifat antioksidan, antiinflamasi, antijamur, antimikroba dan antibiofilm (Shirvani *et al.*, 2023). Selain itu, metabolit sekunder yang dihasilkan oleh mikroalga dapat menghambat pembentukan biofilm, sehingga menjadikannya alternatif alami yang menjanjikan untuk melawan infeksi bakteri resisten (Verni *et al.*, 2023). Diatom merupakan kelompok mikroalga eukariotik bersel tunggal yang memiliki dinding silika, memberikan struktur yang sangat spesifik dan bisa hidup di lingkungan air tawar, payau, maupun laut (Nieri *et al.*, 2023). Penelitian Wibowo *et al.*, (2023) menunjukkan bahwa ekstrak mikroalga seperti *Arthrospira platensis* dan *Polysiphonia scopulorum* memiliki potensi sebagai agen antibakteri dan antibiofilm terhadap bakteri multiresisten seperti *Pseudomonas aeruginosa*. Diatom memiliki kelebihan seperti efisiensi fotosintesis yang tinggi, dapat diproduksi secara massal, memiliki laju pertumbuhan yang cepat dan sederhana, serta kemampuan hidup di berbagai lingkungan menjadikan diatom sumber senyawa bioaktif yang berkelanjutan dan bermanfaat untuk kesehatan global (Behzadnia *et al.*, 2024).

Hutan mangrove, sebagai salah satu ekosistem pesisir yang kaya akan biodiversitas mikroalga, menjadi lokasi yang ideal untuk mengeksplorasi potensi mikroalga dalam menghasilkan senyawa bioaktif. Hutan mangrove di Lampung Timur, khususnya di kawasan pesisir, memiliki potensi besar dalam mendukung ekosistem mikroalga seperti diatom. Kondisi ekosistemnya yang unik memungkinkan diatom di wilayah

tersebut untuk beradaptasi dan memproduksi metabolit sekunder yang bervariasi. Sejumlah penelitian telah mengungkapkan bahwa lingkungan laut Indonesia, termasuk di wilayah Lampung khususnya di hutan mangrove, menyimpan sumber daya hayati yang kaya, namun sebagian besar masih belum dimanfaatkan secara optimal (Imron et al., 2024). Mangrove berperan penting sebagai habitat mikroorganisme laut dengan manfaat bioaktifnya. Kondisi tersebut membuka peluang besar bagi para peneliti untuk menggali lebih dalam mengenai manfaat dan aplikasi mikroalga. Salah satu potensi besar yang bisa dikembangkan adalah penggunaan metabolit sekunder dari diatom sebagai agen antibiofilm (Yuliasamaya dkk., 2014).

Analisis senyawa metabolit sekunder diatom ini memerlukan teknik yang tepat untuk mengidentifikasi dan memisahkan komponen bioaktifnya. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) menjadi salah satu teknik analisis yang efektif untuk menganalisis ekstrak diatom dari Lampung Timur yang telah menunjukkan aktivitas antibiofilm, karena kemampuannya dalam mengidentifikasi berbagai jenis senyawa tanpa perlu derivatisasi sampel. LC/MS-MS adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Data LC-MS/MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu. Senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Mangurana dkk., 2019). Keuntungan dari LC-MS/MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil (senyawa yang mudah bereaksi atau berubah ketika terkena suhu tinggi), polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein (Ovidio *et al.*, 2023).

Berdasarkan latar belakang di atas, peneliti tertarik untuk meneliti diatom yang kajiannya masih sangat terbatas untuk mengetahui kemampuannya sebagai penghasil metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibiofilm terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan analisis menggunakan *Liquid Chromatography Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah menguji bioaktivitas antibiofilm senyawa bioaktif yang dihasilkan dari ekstrak diatom asal Lampung Timur dan menganalisis profil senyawa bioaktif yang terdapat di dalam diatom asal Lampung Timur menggunakan LC MS/MS.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk menginformasikan senyawa bioaktif yang diperoleh dari ekstrak mikroalga asal Lampung Timur memiliki potensi menjadi antibiofilm dan untuk pengembangan produk antibakteri dan antibiofilm berbasis senyawa alami yang lebih ramah lingkungan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Mikroalga

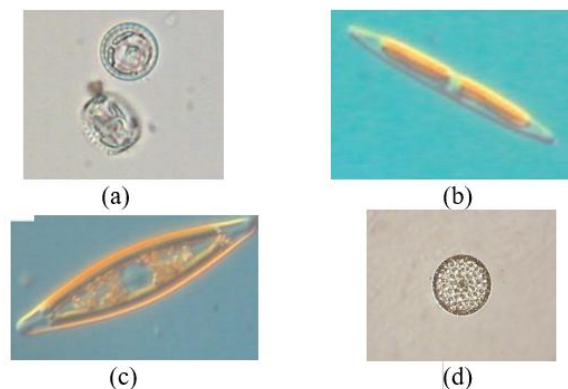
Mikroalga merupakan kelompok autotrof fotosintetik yang dapat hidup di air laut, payau dan juga air tawar. Mikroalga menghasilkan oksigen melalui proses fotosintesis dengan mengubah air dan karbon dioksida menjadi karbohidrat dan oksigen menggunakan energi cahaya matahari (Tan *et al.*, 20220). Mikroalga dapat dibudidayakan secara massal untuk memproduksi biomassa, yang memiliki berbagai kegunaan seperti pakan ternak, suplemen makanan, dan bioplastik. Budidaya mikroalga untuk biomassa juga dapat mengurangi tekanan terhadap pertanian konvensional berbasis lahan dan mendukung produksi pangan serta bahan yang lebih berkelanjutan (Yu *et al.*, 2022). Mikroalga dapat menghasilkan banyak metabolit alami seperti protein, karbohidrat, lipid, dan komponen bioaktif dengan manfaat antioksidan, antibakteri, antibiofilm, antiinflamasi, antitumor (Shirvani *et al.*, 2023).

Mikroalga terbagi menjadi empat kelompok besar antara lain diatom (*Bacillariophyceae*), alga hijau (*Chlorophyceae*), alga merah (*Rhodophyta*), dan alga biru (*Cyanophyceae*). Mikroalga diketahui sebagai sumber penting vitamin, prekursor vitamin, termasuk asam askorbat, riboflavin, dan α , β -tokoferol. Beberapa jenis mikroalga yang telah diteliti untuk potensi komersialnya meliputi *Dunaliella*, *Chlorella*, dan *Spirulina* (Hadiyanto *et al.*, 2012). Mikroalga juga dapat menghasilkan senyawa-senyawa yang bermanfaat dalam industri makanan, farmasi, kosmetik, bahan bakar nabati dan fitoremediasi untuk meningkatkan kualitas air. Mikroalga

memiliki kemampuan untuk menghasilkan karotenoid seperti β -karoten, astaxanthin, dan lutein, serta lipid yang mengandung asam lemak tak jenuh ganda rantai panjang (PUFA) omega-3 dan omega-6 (Maltsev *et al.*, 2021).

2.2 Diatom

Diatom merupakan mikroalga fotosintetik uniseluler dimana fitoplankton yang paling umum di bumi, dengan ukuran mulai dari 2 μm hingga 2 mm, dengan hampir 110.000 spesies diatom menunjukkan keragaman morfologi yang luar biasa. Selama jutaan tahun, diatom telah memainkan peran penting dalam ekosistem sebagai penghasil biomassa laut (Min *et al.*, 2024). Diatom dari kelas *Bacillariophyceae* adalah kelompok fitoplankton eukariotik yang paling penting yang bertanggung jawab atas sekitar 40% dari produktivitas primer laut (Indrayani dkk., 2022). Diatom dikenal karena dinding selnya yang terbuat dari silika (SiO_2), yang disebut frustule. Frustule ini memiliki kemampuan untuk menyerap dan membawa senyawa bioaktif. Selain itu, silika dari dinding sel diatom memiliki sifat permukaan yang luas dan dapat berfungsi sebagai pembawa material bioaktif yang berpotensi menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen seperti bakteri gram positif dan gram negatif (Min *et al.*, 2024).



Gambar 1. Beberapa Spesies Mikroalga dari Kelas Diatom (a) *Cyclotella sp.* (b) *Nitzschia sp.* (c) *Navicula sp.* (d) *Thalassiosira sp.* (Vuuren *et al.*, 2006).

2.3 Siklus Pertumbuhan Mikroalga

Fase pertumbuhan mikroalga ditentukan dengan melakukan pengamatan seperti melihat bentuk ukuran sel, menghitung kepadatan sel, dan biomassa sel. Pertumbuhan mikroalga terbagi atas 4 fase yaitu fase lag, fase eksponensial, fase stasioner dan fase kematian :

1. Fase lag

Pada fase ini, sel diatom beradaptasi dengan medium dan lingkungan kulturnya. Secara fisiologis, sel-sel mempersiapkan diri untuk pembelahan sel pada usia tertentu dengan menghasilkan enzim dan senyawa metabolisme lainnya yang diperlukan untuk pembelahan sel. Jumlah sel yang membelah masih sedikit selama fase ini sehingga jumlah sel tidak banyak mengalami peningkatan (Prayitno, 2016).

2. Fase eksponensial

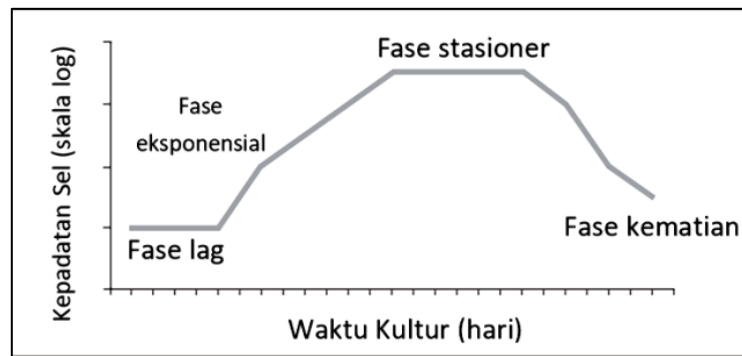
Pada fase ini, sel diatom beradaptasi dengan medium dan lingkungan kulturnya. Secara fisiologis, sel-sel mempersiapkan diri untuk pembelahan sel pada usia tertentu dengan menghasilkan enzim dan senyawa metabolisme lainnya yang diperlukan untuk pembelahan sel. Jumlah sel yang membelah masih sedikit selama fase ini, sehingga jumlah sel tidak banyak mengalami peningkatan (Prayitno, 2016).

3. Fase stasioner

Pada fase ini, mikroalga tidak lagi tumbuh dengan laju yang cepat dan biomassa yang dihasilkan relatif stabil, dimana laju pertumbuhan sel seimbang dengan laju kematian sel (Prayitno, 2016).

4. Fase kematian

Fase kematian ditandai dengan kematian sel-sel dalam jumlah besar, sedangkan pembelahan sel hampir tidak terjadi (Prayitno, 2016).



Gambar 2. Fase Pertumbuhan Mikroalga (Creswell, 2010).

2.4 Faktor Pertumbuhan Mikroalga

Struktur uniseluler mikroalga memungkinkan mengubah energi matahari menjadi energi kimia dengan mudah. Pertumbuhan mikroalga dipengaruhi oleh berbagai faktor, termasuk faktor abiotik seperti cahaya, suhu, nutrisi, O_2 , CO_2 , pH, dan salinitas. Selain itu, faktor biotik seperti keberadaan bakteri, virus, dan jamur, serta teknik pemanenan yang digunakan. Mikroalga dapat berkembang dengan sangat cepat dalam kondisi iklim yang sesuai, dengan laju pembelahan yang dapat mencapai 24 jam atau bahkan hanya 3,5 jam selama fase pertumbuhan eksponensial (Masojidek *et al.*, 2013). Ketersediaan nutrisi dalam medium kultivasi memiliki peran penting dalam mempengaruhi jumlah biomassa yang dihasilkan dari mikroalga. Selain itu, faktor-faktor seperti cahaya, suhu, karbon dioksida (CO_2), pH, aerasi, dan salinitas juga berkontribusi terhadap pertumbuhan mikroalga. Cahaya mempunyai peranan penting dalam proses fotosintesis yaitu sebagai sumber cahaya yang dimanfaatkan oleh organisme autotrof menjadi energi kimia oleh aktivitas klorofil (Gultom, 2010). Peningkatan suhu pada kisaran optimum akan meningkatkan laju metabolisme dan aktivitas fotosintesis mikroalga (Asriyana dan Yuliana, 2012). Suhu optimum untuk kultivasi mikroalga berkisar 24-30°C dan dapat berubah tergantung komposisi media yang digunakan serta jenis mikroalga yang dikultivasi (Rafeelina *et al.*, 2016).

Derajat keasaman (pH) salah satu parameter penting yang mempengaruhi pertumbuhan mikroalga. Selama fotosintesis pada siang hari, mikroalga menggunakan CO₂ dari perairan sehingga hal ini mengakibatkan pH perairan meningkat sedangkan pada malam hari fotosintesis tidak berlangsung tetapi respirasi tetap berlangsung sehingga menurunkan pH perairan. Aerasi memiliki peran penting dalam mencegah pengendapan biomassa, membantu pencampuran nutrisi, serta meningkatkan difusivitas gas CO₂ (Nirwawan *et al.*, 2014). Salinitas mengacu pada konsentrasi garam dalam air laut, yang mempengaruhi tekanan osmotik sel-sel dalam tubuh. Tingkat salinitas yang ekstrim dapat menghambat pertumbuhan dan meningkatkan mortalitas mikroalga. Mikroalga dapat bertahan hidup dalam air laut dengan salinitas diatas 20 ppt (*part per thousand*), tetapi untuk spesies diatom salinitas optimalnya berkisar antara 22 hingga 37 ppt (Siahaya dan Murad, 2022).

2.5 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

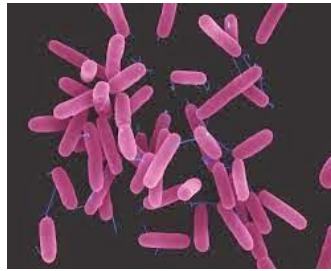
Pseudomonas aeruginosa menjadi koloni bakteri penting dan sering diisolasi dari isolat klinis. *P. aeruginosa* menjadi salah satu bakteri yang ditemui pada tubuh manusia normal, tetapi pada orang-orang imunokompromais dapat bersifat sebagai patogen (Murray *et al.*, 2016). Bakteri mampu menginfeksi nosokomial berat terutama pada pasien dengan kategori tingkat penyakit parah dan pada pasien imunokompromais (Juan *et al.*, 2017). Kolonisasi *P. aeruginosa* lebih banyak ditemukan pada sebagian besar manusia yang sedang dirawat di rumah sakit, sedangkan pada orang sehat hanya ditemukan pada 2-10 % dari tenggorokan dan feses. Infeksi *P. aeruginosa* jarang terjadi pada orang sehat, tetapi bakteri ini menjadi penyebab penting infeksi invasif pada pasien dengan penyakit berat seperti leukemia, sistik fibrosis (CF) serta luka bakar. Selain itu, *P. aeruginosa* juga berpotensi menimbulkan infeksi saluran kemih, saluran napas bagian bawah, dan organ lainnya.

Prevalensi *Pseudomonas aeruginosa* dari keseluruhan infeksi mencapai lebih dari 30%. Pada media kultur, *P. aeruginosa* bersifat obligat aerob, tumbuh di berbagai media, serta tipe koloni dapat bersifat mukoid maupun tidak tergantung produksi eksopolisakarida.

Menurut Toyofuku *et al.*, (2012) *Pseudomonas aeruginosa* terklasifikasikan sebagai:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Familiae	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Berdasarkan pernyataan Shrivastava *et al.*, (2018) telah diketahui bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri resisten terhadap antibiotik *carbapenem* sekaligus berperan dalam kasus MDR (*Multi Drug Resistance*). *P. aeruginosa* termasuk dalam patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai infeksi akut dan kronis. *P. aeruginosa* menjadi sangat sulit diatasi akibat adanya peristiwa resistensi intrinsik tinggi berbagai macam antibiotik. Kemampuan adaptasi yang luar biasa terhadap perubahan kondisi dan tekanan lingkungan, termasuk paparan antibiotik menyebabkan *P. aeruginosa* berperan dalam pengembangan resistensi adaptif antimikroba. Penyebab lain yang dapat meningkatkan terjadinya resistensi yaitu adanya pembentukan biofilm oleh bakteri. Fenomena pembentukan biofilm oleh bakteri patogen merupakan salah satu faktor penyebab peningkatan resistensi bakteri patogen terhadap berbagai jenis antibiotik (Penesyan *et al.*, 2020).



Gambar 3. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Amin, 2019).

2.6 Biofilm

Akumulasi kompleks dari koloni mikroba yang mengarah pada pembentukan matriks dengan lapisan pelindung polisakarida yang sangat terstruktur dikenal sebagai biofilm. Biofilm tumbuh pada permukaan dengan karbohidrat yang menyelimuti bakteri. Karbohidrat tersebut merupakan hasil produksi oleh bakteri. Keseluruhan sel dalam biofilm bertahan dalam kondisi pertumbuhan yang keras karena biofilm dikelilingi oleh zat polimer ekstraseluler (EPS) dengan berat molekul tinggi yang melekatkan sel (Flemming and Wingender, 2010). Pembentukan struktur biofilm berimplikasi pada peningkatan resistensi bakteri terhadap sistem kekebalan tubuh inang dan agen antimikroba, salah satunya peningkatan ketahanan terhadap antibiotik hingga 1000 kali dosis normal (Lebeaux *et al.*, 2014). Biofilm *P. aeruginosa* telah meningkatkan toleransi antibiotik dan lebih tahan terhadap respons inang daripada dalam keadaan planktoniknya, sehingga biofilm yang sulit diatasi akan menyebabkan infeksi kronis (Maurice *et al.*, 2018).

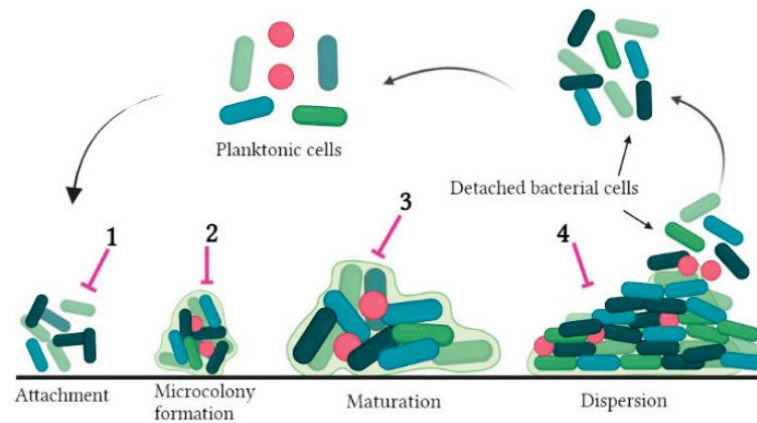
Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm, antara lain efisiensi proses perlekatan, faktor genetik, substratum, sumber nutrisi, faktor mekanik dan gaya geser, dan kondisi fisikokimia lingkungan (Lehman *et al.*, 2015). Biofilm mampu melindungi bakteri dari berbagai ancaman, termasuk antibiotik. Bakteri yang berada dalam biofilm memiliki tingkat resistensi yang lebih tinggi dibandingkan bakteri patogen yang tidak berada dalam biofilm (Bowler, 2018). Terbentuknya biofilm menimbulkan masalah baru, yaitu menurunnya efektivitas antibiotik terhadap

bakteri. Biofilm memberikan resistensi tambahan karena sifat sel sesil dan struktur biofilm itu sendiri. Kondisi kekurangan nutrisi dalam biofilm dapat memicu dormansi sel, yang menyebabkan sel menjadi kurang responsif terhadap antibiotik karena laju metabolisme yang rendah (Raissa *et al.*, 2020).

2.7 Antibiofilm

Senyawa antibiofilm merupakan agen senyawa yang mampu menghambat pembentukan matriks polimer, menekan adhesi, perlekatan sel, serta menghalangi jaringan *quorum sensing* (Lu *et al.*, 2019). Senyawa antibiofilm berperan mengganggu jalur penginderaan kuorum, gangguan zat polimer ekstraseluler, dan mekanisme adhesi. Senyawa antibiofilm dapat menghambat pertumbuhan biofilm yang mengakibatkan suatu bakteri menjadi resisten terhadap antibiotik (Bhattacharya *et al.*, 2015). Secara garis besar ada lima kelas senyawa alami yang memiliki sifat antibiofilm yang tinggi. Kelima senyawa tersebut adalah fenolat minyak atsiri, terpenoid, alkaloid, polipeptida, dan poliasetilen. (Yong *et al.*, 2019).

Produk antibiofilm yang berasal dari tumbuhan yang dapat diidentifikasi melawan bakteri *P. aeruginosa* diantaranya alkaloid, steroid, senyawa organosulfur, flavonoid, senyawa fenolik, dan terpenoid. Sejumlah produk alami telah diuji potensi anti-biofilmnya terutama menggunakan metode pewarnaan kristal violet, atau safranin, evaluasi aktivitas antivirulen terkait *quorum sensing*, serta kapasitas gangguan terhadap pembentukan struktur biofilm (perusakan biofilm). Bakteri mengalami proliferasi sekaligus melakukan *quorum sensing*, yaitu proses di mana bakteri mengeluarkan sinyal kimia untuk berkomunikasi dengan bakteri di sekitarnya. Proses ini bertujuan untuk memastikan bahwa jumlah sel yang dibutuhkan untuk membentuk biofilm terpenuhi (Nocelli *et al.*, 2016).



Gambar 4. Skema proses pembentukan biofilm dan strategi antibiofilm. (1) Modifikasi permukaan dan pelapisan antimikroba; (2) Memodulasi gen adhesi sel dan menghambat pembentukan matriks (EPS); (3) Mencegah ekspresi pompa eflux; (4) Penghambatan penginderaan kuorum. (Zeineldin *et al.*, 2023).

2.8 Ekstraksi

Ekstraksi adalah metode pemisahan untuk memisahkan komponen target dari suatu bahan, sehingga menghasilkan zat yang terpisah secara kimia atau fisik. Tujuan utama ekstraksi adalah untuk mengisolasi senyawa bioaktif dari sampel yang kompleks, meningkatkan selektivitas dalam metode analisis, serta meningkatkan konsentrasi senyawa target untuk meningkatkan sensitivitas dalam uji bioassay. Berbagai teknik ekstraksi digunakan untuk memperoleh senyawa yang terkandung dalam tumbuhan. Pemilihan metode ekstraksi dapat berpengaruh besar pada aktivitas biologis ekstrak, sehingga penting untuk memilih metode yang tepat (Ćujić *et al.*, 2016). Efisiensi ekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti jenis pelarut, durasi ekstraksi, ukuran partikel sampel, rasio sampel terhadap pelarut, dan suhu ekstraksi (Garavand *et al.*, 2019). Pelarut yang sering digunakan dalam ekstraksi meliputi metanol untuk mendapatkan senyawa alkaloid (Pudi *et al.*, 2016), etanol untuk mengekstraksi senyawa fenolik dan flavonoid (Gonfa *et al.*, 2020), heksana untuk ekstraksi senyawa non-alami seperti metil ester (Erukainure *et al.*, 2016), n-butana untuk senyawa terpenoid (Shapira *et al.*, 2019), petroleum eter untuk mengekstraksi asam lemak tak jenuh ganda (Tian *et al.*, 2018), serta air sebagai pengganti pelarut organik dalam

ekstraksi senyawa bioaktif seperti kitooligosakarida (Widyastuti dkk., 2022). Berdasarkan prinsip "*like dissolves like*", pelarut dengan polaritas serupa atau mendekati zat terlarut dipilih untuk meningkatkan hasil ekstraksi (Zhang *et al.*, 2016). Beberapa metode ekstraksi yang sering digunakan sebagai berikut:

a. Maserasi

Maserasi adalah metode ekstraksi sederhana yang dilakukan dengan merendam biomaterial dalam pelarut tertentu pada suhu ruang, dengan pelarut diganti secara berkala. Selama proses maserasi, jaringan menjadi lunak dan senyawa yang terkandung di dalamnya larut ke dalam pelarut. Setelah ekstraksi selesai, pelarut dipisahkan melalui penguapan menggunakan vakum untuk menghasilkan ekstrak yang lebih pekat. Ekstrak yang dihasilkan mengandung berbagai senyawa metabolit sekunder (Nn, 2015).

b. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)

Ekstraksi cair-cair atau partisi adalah teknik pemisahan yang memanfaatkan perbedaan kelarutan zat antara dua fase cairan yang tidak saling larut, biasanya fase air dan fase organik seperti diklorometana, toluena, dan kloroform. Prinsip dasar dari ekstraksi cair-cair melibatkan pencampuran dua pelarut yang tidak saling bercampur, di mana salah satu pelarut akan menarik senyawa target dari pelarut lain. Setelah campuran dibiarkan mengendap, dua fase akan terbentuk, dan senyawa target akan terkonsentrasi di salah satu fase. Proses ini banyak digunakan untuk memisahkan dan memurnikan senyawa organik, terutama dalam industri kimia dan farmasi.

Penggunaan corong pisah dalam ekstraksi cair-cair membuat proses ini lebih mudah diimplementasikan dalam skala laboratorium. Senyawa polar akan terbawa dalam pelarut polar, senyawa semi polar akan terbawa dalam pelarut semi polar, dan senyawa non polar akan terbawa dalam pelarut non polar (Almohasin *et al.*, 2023).

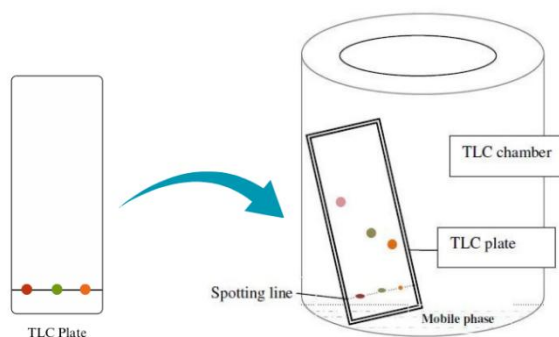
2.9 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah metode analisis yang berfungsi untuk memisahkan senyawa berdasarkan perbedaan kepolaran. Metode ini melibatkan dua fase utama, yaitu fase diam (umumnya silika gel) yang dilapisi pada pelat kaca, dan fase gerak (eluen) yang bergerak ke atas melalui prinsip kapilaritas. Campuran yang akan dipisahkan ditotolkan di bagian bawah pelat, kemudian fase gerak bergerak ke atas melarutkan komponen campuran berdasarkan polaritasnya. Setiap komponen akan menempuh jarak yang berbeda tergantung pada interaksi antara fase diam, fase gerak, dan sifat komponen tersebut (Fitrianasari dkk., 2023). Pelarut yang digunakan pada KLT bersifat mudah menguap, viskositasnya rendah, dapat membasahi lapisan lempeng dan tidak melarutkan sampel secara sempurna. Pelarut (eluen) yang memiliki polaritas lebih rendah akan cenderung berada di bagian atas pada plat silika, sedangkan eluen yang memiliki polaritas lebih tinggi akan cenderung berada di bagian bawah pada plat silika. Kejenuhan chamber memiliki pengaruh yang besar terhadap pemisahan yang terjadi, karena kejenuhan ini dapat mempengaruhi pergerakan eluen dan interaksinya dengan fase diam serta sampel (Ebere *et al.*, 2019).

Sifat setiap senyawa dalam KLT ditandai dengan suatu kuantitas yang dikenal dengan R_f (*Retention/Retardation Factor*). Nilai R_f didefinisikan sebagai rasio antara jarak yang ditempuh oleh senyawa pada permukaan fase diam dibandingkan dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut sebagai fase gerak. Nilai maksimum R_f adalah 1, sedangkan nilai minimumnya adalah 0, yang terlihat jika noda tetap berada di titik awal pada fase diam. Nilai R_f bervariasi tergantung pada sifat eluen yang digunakan serta senyawa yang dipisahkan. Pemisahan senyawa terjadi berdasarkan distribusi senyawa antara fase diam dan fase gerak. Untuk menentukan nilai posisi noda setiap zat terlarut pada plat KLT dapat menggunakan perhitungan nilai R_f dengan rumus sebagai berikut:

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

Hasil pemisahan yang baik biasanya ditunjukkan oleh nilai R_f yang berada dalam kisaran 0,2 hingga 0,8, yang menunjukkan bahwa senyawa tersebut telah terpisah dengan cukup efektif dalam sistem kromatografi (Darmawansyah dkk., 2023).



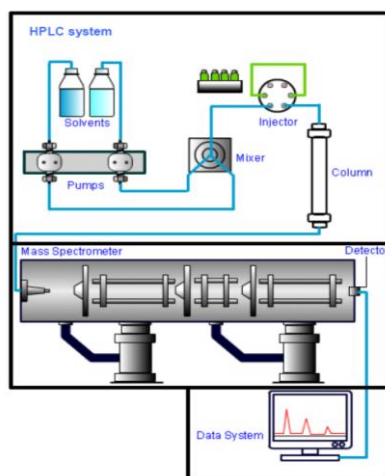
Gambar 5. Prinsip Kerja Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

2.10 *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*

Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair (HPLC) dengan kemampuan analisis spektrometri massa untuk pemisahan, identifikasi, dan kuantifikasi senyawa dalam sampel yang kompleks (Ovidio *et al.*, 2023). LC-MS/MS salah satu metode analitik yang sangat efektif untuk mengidentifikasi dan mengukur metabolit sekunder dalam sampel biologis. LC-MS/MS berperan penting dalam pemisahan dan identifikasi senyawa-senyawa metabolit sekunder dari ekstrak tumbuhan. Prinsip LC-MS/MS dalam analisis metabolit sekunder diawali dengan proses pemisahan senyawa melalui kromatografi cair, di mana senyawa-senyawa dalam ekstrak dipisahkan berdasarkan polaritasnya. Setelah itu, senyawa yang terpisah diidentifikasi melalui spektrometri massa, yang mendeteksi ion-ion berdasarkan rasio massa-muatan (m/z) dari molekul tersebut. Tahap MS/MS memberikan analisis lebih mendalam, di mana senyawa dipecah

menjadi fragmen-fragmen ion untuk memberikan informasi struktural lebih lanjut tentang metabolit yang dianalisis (Syarpin dkk., 2023).

Hasil dari analisis data LC/MS-MS adalah kromatogram dengan alur tinggi peak dan bobot molekul dari senyawa yang ada dalam ekstrak sehingga jumlah setiap sampel mengandung senyawa. Data LC-MS dapat memberikan informasi mengenai berat molekul, struktur, identitas, serta kuantitas bagian tertentu dari sampel. Interaksi yang terjadi dapat memecah senyawa saat dibandingkan dengan lapisan kimia yang terdiri atas partikel – partikel (fase diam) dan elusi pelarut yang mengalir melalui kolom (Mangurana dkk., 2019). Teknik ini bekerja dengan memisahkan senyawa berdasarkan sifat fisikokimia dalam fase cair (LC), kemudian menganalisis ion – ion hasil pemisahan tersebut berdasarkan rasio massa terhadap muatan (m/z) menggunakan spektrometri massa. LC-MS/MS memiliki komponen utama berupa sumber ion, penganalisis massa, dan detektor yang terhubung dengan komputer untuk menghasilkan spektrum massa. Beberapa metode ionisasi yang sering digunakan, seperti *Electrospray Ionization* (ESI) dan *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), mengionisasi molekul dalam fase gas dan memungkinkan deteksi spesifik dari senyawa target (Pavithra *et al.*, 2022). Analisis LC-MS/MS memiliki beberapa keunggulan signifikan, termasuk sensitivitas tinggi yang memungkinkan deteksi senyawa pada konsentrasi sangat rendah (ng/mL), serta selektivitas yang unggul karena kemampuannya membedakan senyawa dengan struktur serupa. Selain itu, metode ini memiliki kecepatan analisis yang tinggi dan efisiensi dalam memproses sampel yang kompleks dengan sedikit langkah persiapan (Ovidio *et al.*, 2023).



Gambar 6. Skema alat LC MS/MS (Kailasam, 2021).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober 2024 – Maret 2025 di Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi dan Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung Kota Bandar Lampung. Karakterisasi *Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) akan dilakukan di Laboratorium Forensik Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah erlenmeyer, gelas ukur, gelas beaker, labu ukur, pipet tetes, tabung reaksi, corong kaca, corong pisah, bunsen, pengaduk kaca, spatula, jarum ose, botol vial, aluminium foil, kapas, tisu, saringan, plastik wrap, vial gelap, botol boles, aerator, selang, lampu TL (Tube Light) 36 watt, oven, neraca analitik Wigggen Hauser JD 300-3, tabung evendop, *magnetic stirrer* Wigggen Hauser HPS 630, autoklaf Tomy SX-700 High-Pressure Steam Sterilizer, *centrifuge* seri HITACHI CF16RXII, mikropipet Wigggen Hauser 100-1000 μL , mikroskop Zeiss Axioo imager A1, *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, seperangkat alat KLT dan kromatografi kolom, *microplate reader* Hospitex-Italy, *microplate* 96-well, dan *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel (mikroalga yang diambil di Lampung Timur), air laut buatan steril 26 ppt, akuades, KNO_3 , Na_2SiO_3 , pupuk TSP, Na_2CO_3 (media pertumbuhan mikroalga), media *Tryptic Soy Broth* (TSB), bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, akuades, diklorometana (DCM), metanol, etanol dan plat silika F₂₅₄.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Kultivasi Mikroalga

Kultivasi mikroalga diatom dilakukan dengan mensterilkan air laut, nutrisi dan alat menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C pada 1,2 Mpa untuk mencegah kontaminasi dan kultur dipertahankan pada suhu 24°C (Bochenski, 2019). Mikroalga diatom ditumbuhkan pada medium air laut buatan dengan salinitas 26 ppt (*part per thousand*) yang telah steril dengan penambahan nutrisi diantaranya larutan FeCl_3 1,8 mL/1000 mL, KNO_3 1,8 mL/1000 mL, TSP 2,3 mL/1000 mL dan Na_2SiO_3 1,38 mL/1000 mL dalam 700 mL air laut buatan dan 200 mL inokulum mikroalga dengan pencahayaan selama 24 jam menggunakan lampu 36 watt. Aerasi dilakukan secara terus menerus selama proses kultivasi dengan mengalirkan udara dari aerator menggunakan selang dengan kecepatan konstan.

3.3.2 Pemanenan dan Ekstraksi Biomassa Mikroalga

Diatom yang telah dikultur selama 14 hari dilakukan pemanenan menggunakan teknik sentrifugasi selama 5 menit pada suhu 4°C pada kecepatan 4000 rpm, sehingga diperoleh biomassa basah kemudian ditimbang menggunakan neraca analitik (Wanimbo dkk., 2023). Biomassa yang telah dipanen dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut diklorometana (DCM) : metanol (3:1) dengan rasio biomassa : pelarut adalah 1:5 untuk memisahkan supernatan dengan biomassa, kemudian

disonikasi dengan frekuensi 20 kHz selama 30 menit (Rykebosch *et al.*, 2012). Ekstrak selanjutnya dilarutkan dalam larutan partisi DCM-air (3:1) dalam corong pisah. Larutan dikocok beberapa kali dan didiamkan hingga terbentuk dua fase. Hasil akhir tahapan partisi akan diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi DCM dan fraksi air. Kedua fraksi tersebut dipekatkan menggunakan mesin *Rotary Vacuum Evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat yang digunakan untuk uji bioaktivitasnya.

3.3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) dilakukan untuk pemisahan senyawa yang terdapat pada sampel dengan mengetahui pola kromatogram yang dihasilkan. Ekstrak kasar dianalisis dengan KLT menggunakan plat silika F₂₅₄ sebagai fase diam dan eluen yang digunakan sebagai fase gerak yaitu kombinasi dari DCM dan MeOH (3 : 1). Setelah dilakukan elusi terhadap plat KLT, bercak atau noda dilihat di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya dilakukan visualisasi lanjutan untuk mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam sampel dengan menggunakan reagen *Dragendorff*, serum sulfat dan ninhidrin, kemudian dihitung nilai R_f nya untuk mengukur seberapa jauh senyawa bergerak pada plat KLT relatif terhadap pelarut.

3.3.4 Peremajaan Isolat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri yang digunakan untuk pengujian antibiofilm dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Isolat bakteri diperoleh dari koleksi yang ada di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Sebelum dilakukan pengujian, bakteri diremajakan agar tetap aktif. Peremajaan dilakukan dengan menggunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB) yang disiapkan dengan melarutkan 3 g TSB ke dalam 100 mL air suling, ditambah 2% (w/w) agar, dan disterilkan menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu

121°C. Setelah sterilisasi, media dituangkan ke cawan petri dan dibiarkan mengeras di bawah sinar UV selama 20 menit di dalam *laminar air flow*. Kemudian, sedikit bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diambil dengan jarum ose steril dan dimasukkan pada media TSB. Bakteri kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C sebelum digunakan untuk pengujian bioaktivitas (Missiakas dan Schneewind, 2013).

3.3.5 Uji Aktivitas Antibiofilm

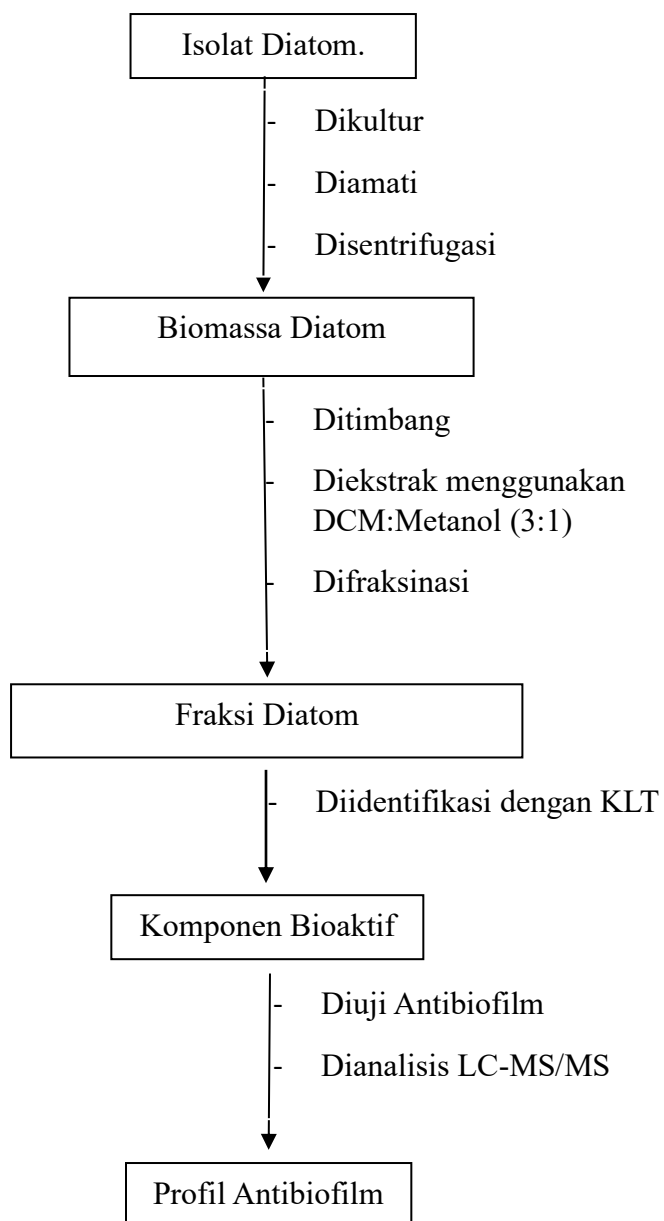
Pengujian ini mengacu pada (Wibowo *et al.*, 2023) dengan beberapa modifikasi. Pembentukan biofilm menggunakan *microplate 96-well*. Bakteri *P. aeruginosa* dikultur pada 3% TSA yang dilarutkan dalam akuades dan diinkubasi selama 24 jam. Inokulum dibuat dengan mengambil seujung ose *P. aeruginosa* dan dimasukkan ke dalam media cair berisikan TSB, kemudian inokulum diinkubasi semalaman kemudian diencerkan 1:100 dalam media uji. Media sebanyak 100 µL dan 100 µL inokulum dipindahkan ke *well* sebagai kontrol untuk pertumbuhan biofilm. Pada senyawa uji ditambahkan 100 µL ekstrak 0,5 g/mL dan inokulum. Dilakukan inkubasi selama 16-18 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, media dibuang dan dihilangkan bakteri yang tidak melekat dengan cara mencuci tiap *well* 3-4 kali dengan akuades. Pewarnaan dilakukan dengan menambahkan 200 µL larutan kristal violet 0,1% (b/v) (Blando *et al.*, 2019) dan didiamkan selama 5-15 menit. Setelah reaksi pewarnaan selesai, dihilangkan sisa noda dengan pencucian 3-4 kali dengan akuades. Kemudian ditambahkan 200 µL etanol, dibiarkan pewarnaan dilakukan minimal 60 menit. Nilai OD diukur menggunakan *hospitex diagnostic* pada 630 nm. Nilai % hambatan biofilm dihitung mengacu pada Blando *et al.*, (2019) dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Hambatan Biofilm} = \frac{\text{OD kontrol} - \text{OD sampel} \times 100\%}{\text{OD kontrol}}$$

3.3.6 Analisis *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS)

Sampel dengan kemurnian tertinggi serta aktivitas terbaik dalam menghambat pembentukan biofilm oleh *P. aeruginosa* selanjutnya dianalisis menggunakan instrument *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Bogor. Spektrometri massa merupakan metode analisis untuk mengidentifikasi senyawa yang tidak diketahui, senyawa yang diketahui, dan untuk menjelaskan strukturnya. Prinsip LC-MS/MS dalam analisis metabolit sekunder dimulai dengan memisahkan senyawa melalui kromatografi cair berdasarkan polaritasnya. Setelah pemisahan, senyawa- senyawa tersebut diidentifikasi menggunakan spektrometri massa yang mendeteksi ion-ion berdasarkan rasio massa muatan (m/z). Proses MS/MS kemudian memberikan analisis yang lebih mendalam dengan memecah senyawa menjadi fragmen ion untuk mendapatkan informasi struktural lebih lanjut tentang senyawa metabolit sekunder yang dianalisis (Syarpin dkk., 2023).

3.3.7 Diagram Alir



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa mikroalga diatom asal Lampung Timur berhasil dikultivasi dan menghasilkan biomassa dengan konsentrasi 7 g/L dan produktivitas 0,3 g/L.d yang mengandung senyawa metabolit sekunder.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, penulis memberikan saran untuk penelitian selanjutnya perlu dilakukan ke tahap pemurnian senyawa metabolit.

DAFTAR PUSTAKA

- Amin, O. M. 2019. Perspectives on Pathogenic Bacteria Infections in the Skin, Urine and Mucoïd Surfaces of Humans. *EC Microbiology*. 15(10): 1116-1125.
- Behzadnia, A., Nasab, M. M., and Oliyai, N. 2024. Anti-Biofilm Activity of Marine Algae-Derived Bioactive Compounds. *Frontiers in Microbiology*. 15:1270174.
- Bhattacharya, S., Bir, R., and Majumdar, T. 2015. Evaluation of Multidrug Resistant *Staphylococcus Aureus* and Their Association With Biofilm Production in A Tertiary Care Hospital, Tripura, Northeast India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 9(9).
- Blando, F., Russo, R., Negro, C., Bellis., D., and Frassinetti, S. 2019. Antimicrobial and Antibiofilm Activity Against *Staphylococcus Aureus* of *Opuntia Ficusindica* (L.) Mill. Cladode Polyphenolic Extracts. *Antioxidant*. 8, 117.
- Bochenski, T., Chaturvedi, T., Thomsen, M. H. and Schmidt, J. E. 2019. Evaluation of Marine Synechococcus For An Algal Biorefinery in Arid Regions. *Energies*. 12. 12:2233.
- Bowler, P. G. 2018. Antibiotic Resistance and Biofilm Tolerance: A Combined Threat in The Treatment of Chronic Infections. *J. Wound Care*. 27(5):273-277.
- CDC. 2024. *Antimicrobial Resistance*. Centres for Disease Control and Prevention: Atlanta, GA, USA.
- Creswell, L. 2010. *Phytoplankton culture for aquaculture feed*. Southern Regional Aquaculture Center. University Florida of Seagrass. 16 pp.
- Ćujić, N., Šavikin, K., Jankovic, T., Pljevljakušić, D., Zdunic, G., and Ibric, S. 2016. Optimization of Polyphenols Extraction from Dried Chokeberry Using Maceration As Traditional Technique. *Food Chemistry*. 194: 135-142.

- Darmawansyah, Nurlansi, dan Haeruddin. 2023. Pemisahan Senyawa Terpenoid Ekstrak N-Heksan Daun Kaembu-Embu (*Blumea Balsamifera*) Menggunakan Kromatografi Kolom Gravitasi. *Jurnal Kimia dan Pendidikan Kimia*. 12(1): 24-30.
- Erukainure, O. L., Ebuehi, O. A. T., Iqbal, C. M., Mesaik, M. A., Shukralla, A., Muhammad, A., Zaruwa, M. Z., and Elemo, G. N. 2016. Orange Peel Ekstracts: Chemical Characterization, Antioxidant, Antioxidative Burst, and Phytotoxic Activities. *Journal of Dietary Supplements*. 1-10.
- Fitrianasari, R. D. P., Haresmita, P. P., dan Agusta, H. F. 2023. Qualitative Analysis of Drug Substances in Rheumatic Jamu Samples Using Thin Layer Chromatography. *Medical Sains*. 8(3): 999-1008
- Flemming, H. C. and Wingender, J. 2010. The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*. 8(9). 623-633.
- Garavand, F., Rahae, S., Vahedikia, N., and Jafari, S. M. 2019. Different Techniques for Extraction and Micro/Nanoencapsulation of Saffron Bioactive Ingredients. *Trends in Food Science and Technology*. 89: 26-44.
- Gonfa, T., Teketle, S., And Kiros, T. 2020. Effect of Extraction Solvent on Qualitative and Quantitative Analysis of Major Phyto-Constituents and in Vitro Antioxidant Activity Evaluation of *Cadaba Rotundifolia* Forssk Leaf Extracts. *Cogent Food and Agriculture*. 6(1): 1-12.
- Gultom, S. O. 2018. Mikroalga : Sumber Energi Terbarukan Masa Depan. *Jurnal Kelautan*. 11(1):95-103.
- Hadiyanto, Widayat, and Kumoro, A. C. 2012. Potency of Microalgae as Biodiesel Source in Indonesia. *International Journal of Renewable Energy Development*. 1(1):3-27.
- Imron, Duryati, Irawan, S. E., Maryono, T., and Rodiani. 2024. Zoning Patterns of Mangrove Forests in Lampung Timur Regency. *Journal of Sylva Indonesiana*. 7(1): 40-47.
- Indrayani. 2022. Pengaruh Penggunaan Sumber Silika Berbeda Terhadap Pertumbuhan dan Produktivitas Biomassa Diatom *Skeletonema sp.* (*Bacillariophyceae*). *Jurnal Pendidikan Teknologi Pertanian*. 8(2): 2015-224.
- Juan, C., Pena, C., and Oliver, A. 2017. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas Aeruginosa* Infections. *Journal of Infectious Diseases*. 215(Suppl 1):S44-S51.

- Lebeaux, D. , Ghigo, J. M., and Beloin, C. 2014. Biofilm-Related Infections: Bridging The Gap Between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance Toward Antibiotics. *Microbiology And Molecular Biology*. 78(3): 510-543.
- Lopez, Y., and Soto, S. M. 2019. The Usefulness of Microalgae Compounds for Preventing Biofilm Infections. *Antibiotics*. 9(1). 9: 1-16.
- Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., And Li, M. 2019. Developing Natural Products As Potential Anti-Biofilm Agents. *Chinese Medicine*. 14(1): 1-17.
- Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., and Maltseva, S. 2021. Influence of Light Conditions on Microalgae Growth and Content of Lipids, Carotenoids, and Fatty Acid Composition. *Biology*. 10(10). 1060: 1-24.
- Masojidek, J., Torzillo, G., and Koblizsek, M. 2013. *Photosynthesis in Microalgae Handbook of Microalgal Culture*. John Wiley and Sons. Us.
- Maurice, N. M., Bedi, B., and Sadikot, R. T. 2018. *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 58(4): 428-439.
- Min, K. H., Kim, D. H., Youn, S., and Pack, S. P. 2024. Biomimetic Diatom Biosilica And its Potential for Biomedical Applications and Prospects: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*. 25(4): 1-17.
- Missiakas, D. M., and Schneewind, O. 2013. Growth and Laboratory Maintenance of *Staphylococcus*. *Cell and Molecular Biology*. 58(4): 428-439.
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., and Praller, M. A. 2016. *Medical Microbiology 18th Edition*. Military Medicine.
- Nieri, P., Carpi, S., Esposito, R., Costantini, M., and Zupo, V. 2023. Bioactive Molecules from Marine Diatoms and Their Value for The Nutraceutical Industry. *Nutrients*. 15(2). 464: 1-23.
- Nirwawan, R., Kussuryani, Y. dan Hanupurti, D. A. 2014. Reduksi Gas CO₂ oleh Mikroalga *Scenedesmus* sp. Pada Fotobioreaktor Tertutup dengan Variasi Konsentrasi Gas CO₂. *Lembaran Publikasi Minyak dan Gas Bumi*. 48:55-62.
- Nn, A. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medicinal and Aromatic Plants*. 4(3): 1-6.

- Ovidio, C., Locatelli, M., Perrucci, M., Ciriolo, L., Furton, K., Gazioglu, I., Kabir, A., Merone, G. M., Grazia, U., Ali, I., Catena, A.M., Treglia, M., Marsella, L., and Savini, F. 2023. LC-MS/MS Application in Pharmacotoxicological Field: Current State and New Applications. *Molecules*. 28(5): 1-12.
- Panesyan, A., Paulsen, I. T., Gillings, M. R., Kjelleberg, S. and Manefield, M. J. 2020. Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilm. *Front Microbial*. 11:2109.
- Prayitno, J. 2016. Pola Pertumbuhan dan Pemanenan Biomassa dalam Fotobioreaktor Mikroalga untuk Penangkapan Karbon. *Jurnal Teknologi Lingkungan*. 17(1): 45-52.
- Rafeelina, M., Rustam, Y. dan Amini, S. 2016. Pertumbuhan dan Aktivitas Antioksidan dari Mikroalga. *BIOMA*. 12:12-21.
- Raissa, G., Waturangi, D. E., and Wahjuningrum, D. 2020. Screening of Antibiofilm and Anti-Quorum Sensing Activity of Actinomycetes Isolates Extracts Against Aquaculture Pathogenic Bacteria. *BMC Microbiology*. 20(1): 1-11.
- Ryckebosch, E., Muylaert, K., and Foubert, I. 2012. Optimization of an Analytical Procedure for Extraction of Lipids from Microalgae. *Journal of The American Oil Chemists' Society*. 89(2):189–198.
- Sapagh, S., Shenody, R., Pereira, L., and Elshobary, M. 2023. Unveiling the Potential of Algal Extracts as Promising Antibacterial and Antibiofilm Agents Against Multidrug-Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: in Vitro and in Silico Studies Including Molecular Docking. *Plants*. 12(18). 3324: 1-28.
- Sharma, S., Chauhan, A., Ranjan, A., Mathkor, D. M., Haque, S., Ramniwas, S., Tuli, H. S., Jindal, T., and Yadav, V. 2024. Emerging Challenges in Antimicrobial Resistance: Implications for Pathogenic Microorganisms Novel Antibiotics, and their Impact on Sustainability. *Frontiers in Microbiology*. 15:1403168.
- Sherma, J. and Fried, B. 2005. Thin Layer Chromatographic Analysis of Biological Sampel. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 28. 2297-2314.
- Shirvani, M. A., Honarvar, M., Jahadi, M., and Mizani, M. 2023. Biochemical Profile of Dunaliella Isolates from Different Regions of Iran with a Focus on Pharmaceutical and Nutraceutical Potential Applications. *Food Science and Nutrition*. 1-13.
- Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S. and Ramasamy, J. 2018. World Health Organization Releases Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to

- Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. *Journal of Medical Society*. 32(1): 76-77.
- Syarpin, Permatasari, S., dan Pujiyanto, D. A. 2023. Analysis of Phytochemical Constituents and Antioxidant Activity from the Fractions of Luvunga Sarmentosa Root Extract Using LCMS/MS. *BIODIVERSITAS*. 24(2): 733-740.
- Tang, K. W. K., Millar, B. C., and Moore, J. E. 2023. Antimicrobial Resistance (AMR). *British Journal of Biomedical Science*. 80(11387).
- Toyofuku, M., Uchiyama, H., and Nomura, N. 2012. Social Behaviours Under Anaerobic Conditions in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Microbiology*. 2012.
- Verni, M., Demarinis, C., Rizzello, C. G., and Pontonio, E. 2023. Bioprocessing to Preserve and Improve Microalgae Nutritional and Functional Potential: Novel Insight and Perspectives. *Foods*. 12(5). 983: 1-23.
- Vuuren, S. J. V., Taylor, J., Ginkel, C. V., and Gerber, A. 2006. *Easy Identification of the Most Common Freshwater Algae*. North-West University noorowes-universitiet. South African.
- Wanimbo, E., Krithopolus, K. R., Imam, M., Lolita, T., dan Calvin, P. 2023. Analisis Potensi *Chlorella sp.* di Pantai Base-G sebagai Bahan Biodiesel dengan Uji Proksimat. *Biopendix*. 10(1): 73-79.
- Wibowo, J. T., Bayu, A., Aryati, W. D., Fernandes, C., Yanuar, A., Kijjoa, A., and Putra, M. Y. 2023. Secondary Metabolites from Marine-Derived Bacteria with Antibiotic and Antibiofilm Activities Against Drug-Resistant Pathogens. *Marine Drugs*. 21(1). 50: 1-26.
- Yong, Y. Y., Dykes, G. A. and Choo, W. S. 2019. Biofilm Formation by Staphylococci in Health-Related Environments and Recent Reports on their Control Using Natural Compounds. *Critical Reviews in Microbiology*. 45(2): 201–222.
- Yu, Z., Hong, Y., Xie, K., and Fan, Q. 2022. Research Progresses on the Physiological and Pharmacological Benefits of Microalgae-Derived Biomolecules. *Foods*. 11(18).
- Yuliasamaya, Darmawan, A., and Hilmanto, R. 2014. Perubahan Tutupan Hutan Mangrove di Pesisir Kabupaten Lampung Timur. *Jurnal Sylva Lestari*. 2(3): 111-124.