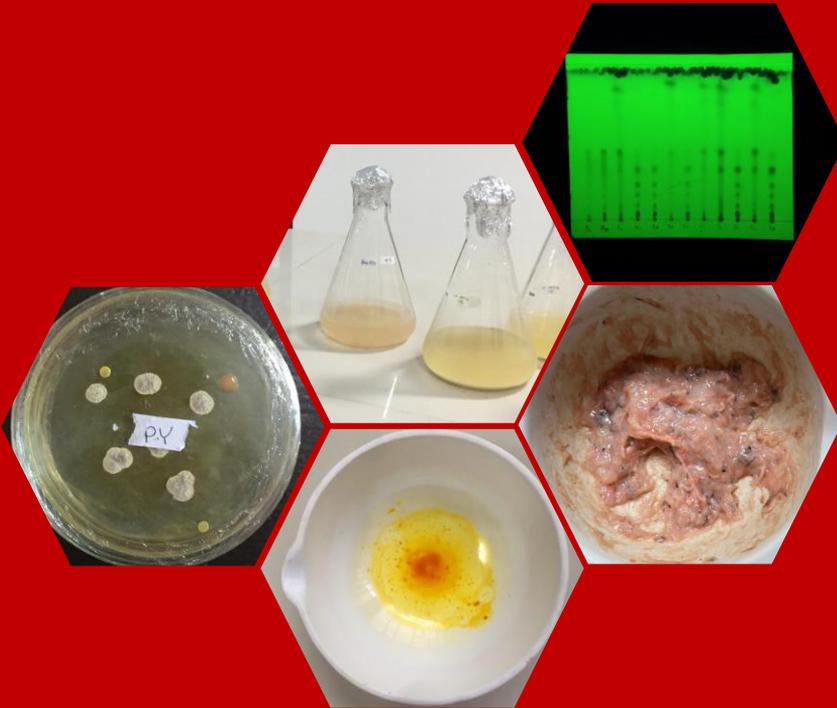


**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT ACTINOMYCETES ASAL  
TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN ORGANIK  
LIMBAH KEPALA UDANG**



**AFIFAH GHALIYAH SALSABILA  
N011201094**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT ACTINOMYCETES ASAL  
TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN ORGANIK LIMBAH  
KEPALA UDANG**

**AFIFAH GHALIYAH SALSABILA  
N011201094**



**PROGRAM STUDI FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT ACTINOMYCETES ASAL  
TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN ORGANIK LIMBAH  
KEPALA UDANG**

AFIFAH GHALIYAH SALSABILA  
N011201094

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI FARMASI  
DEPARTEMEN FARMASI  
FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2024**

SKRIPSI

PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT ACTINOMYCETES ASAL  
TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER NITROGEN ORGANIK LIMBAH  
KEPALA UDANG

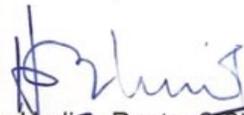
AFIFAH GHALIYAH SALSABILA  
N011201094

Skripsi

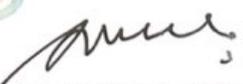
telah dipertahankan dihadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 22 November  
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan  
pada



Pembimbing Utama

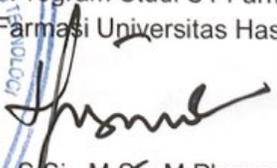
  
Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.  
NIP. 19771125 200212 2 003

Pembimbing Pendamping

  
Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.  
NIP. 19561011 198603 2 002



Ketua Program Studi S1 Farmasi,  
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

  
Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc, Ph.D., Apt.  
NIP. 198601162010122009

## PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Produksi Metabolit Sekunder Dari Isolat Actinomycetes Asal Tanaman Karst Menggunakan Sumber Nitrogen Organik Limbah Kepala Udang" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 22 November 2024



Affah Ghaliyah Salsabila  
N011201094

## UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirabbil'alamin, puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT. atas limpahan rahmat, berkat, dan hidayah-Nya maka penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai syarat untuk lulus dan memperoleh gelar sarjana dengan baik. Penyelesaian skripsi ini tidak terlepas dari keterbatasan pengetahuan penulis dan penulis menyadari bahwa tanpa adanya bantuan dan dorongan dari berbagai pihak, skripsi ini tidak akan terselesaikan. Oleh karena itu, dengan ketulusan dan kerendahan hati, penulis ingin mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan setinggi-tingginya kepada :

1. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping atas segala bimbingan dan arahan yang telah diberikan kepada penulis dalam proses penyusunan skripsi ini.
2. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Ermina Pakki, M.Si., Apt. selaku penguji yang telah memberikan masukan dan saran untuk menyempurnakan skripsi ini.
3. Bapak Rangga Meidianto Asri, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. selaku pembimbing akademik atas arahan dan nasihat selama proses penyelesaian studi.
4. Dekan, seluruh dosen dan staff Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan ilmu pengetahuan serta kemudahan dalam pengurusan berkas administrasi selama studi dan penyelesaian skripsi ini.
5. Ibu Haslia, S.Si., selaku Laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi FF-UH yang telah membantu dan memudahkan penulis dalam penelitian untuk penyelesaian skripsi ini.
6. Kedua orang tua penulis, Bapak Mustari Abbas dan Ibu Sulha Kuba serta adik penulis Muh. Ghiyats Abid Khalifah yang selalu memberikan doa, semangat dan dukungan bagi penulis.
7. Sepupu – sepupu penulis, Kakak Dila, Kakak Ulfa dan Kakak Imam yang senantiasa memberikan dukungan dan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
8. Sahabat penulis “GC”, Ajeng, Mita, Eka, Nurfa, Kiki, Sekar, Rayza dan Fiko serta Alya, Nabila, Ais, Izzah, dan Adilah yang selalu memberikan hiburan dan menjadi tempat berbagi keluh kesah bagi penulis selama penyelesaian skripsi ini.
9. Korps. Asisten Mikrobiologi Farmasi, khususnya Micro20 yang senantiasa membantu dan memberikan semangat kepada penulis dalam melakukan penelitian.
10. Saudara Verelio Widana Pasalu sebagai *partner* penelitian yang selalu mendukung dan membantu penulis dalam melakukan penelitian serta penyelesaian skripsi ini.
11. Kawan – kawan Farmasi 2020 (He20in) yang telah kebersamai penulis dalam menjalani studi selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
12. Seluruh pihak yang telah membantu dan tidak dapat disebutkan satu persatu.

Semoga Allah SWT. Membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis. Penulis menyadari bahwa penyusunan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat dan dapat menjadi dasar bagi penelitian – penelitian selanjutnya.

Penulis,

Afifah Ghaliyah Salsabila

## ABSTRAK

Afifah Ghaliyah Salsabila. **Produksi Metabolit Sekunder Dari Isolat *Actinomycetes* Asal Tanaman Karst Menggunakan Sumber Nitrogen Organik Limbah Kepala Udang** (dibimbing oleh Herlina Rante dan Rosany Tayeb).

**Latar belakang.** Antibiotik merupakan zat yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang dapat menghambat atau membunuh mikroba lain yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen. Antibiotik sebagian besar dihasilkan oleh *Actinomycetes*. Kepala udang mengandung protein yang cukup tinggi sebesar 50,72%. Dengan jumlah protein yang terkandung dalam kepala udang tersebut, maka dapat dimanfaatkan sebagai sumber nitrogen alternatif untuk pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder berupa antibiotik dari isolat *Actinomycetes*. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh limbah kepala udang dalam media pertumbuhan *Actinomycetes* serta pengaruh konsentrasi (%) limbah kepala udang terhadap produksi metabolit sekunder dari isolat *Actinomycetes* asal karst. **Metode.** Pada penelitian ini dilakukan fermentasi isolat *Actinomycetes* dengan ISP 2 termodifikasi dengan mengganti *yeast extract* (sumber nitrogen) dengan limbah kepala udang yang terbagi menjadi 5 konsentrasi, yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, dan 4% selama 14 hari. Hasil fermentasi diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan etil asetat (1:1 v/v) dan biomassa diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat (1:10). Selanjutnya, ekstrak cair dievaporasi lalu ditimbang bobot ekstraknya. Setelah itu, dilakukan pengujian kromatografi lapis tipis-densitometri lalu dihitung nilai Rf dan AUC nya. **Hasil.** Hasil fermentasi media produksi setelah diinkubasi selama 14 hari yaitu terjadi perubahan pada warna media menjadi warna kuning kecokelatan dan semakin keruh. Bobot ekstrak tertinggi ekstrak etil asetat adalah ekstrak etil asetat cairan fermentasi tanpa perlakuan (K) sebesar 769,6 mg, hasil tersebut lebih tinggi dibandingkan kelima media produksi yang menandakan bahwa media dengan limbah kepala udang tidak menghasilkan pengaruh yang lebih baik dalam memproduksi bobot ekstrak jika dibandingkan dengan media tanpa perlakuan. Pada hasil KLT-Densitometri didapatkan hasil yaitu spot noda berwarna kuning, dengan nilai Rf 0,4. Adapun nilai AUC yang diperoleh pada media produksi dengan konsentrasi 4% menghasilkan nilai yang tertinggi dibandingkan media tanpa perlakuan (K) dan media produksi dengan konsentrasi 0,25%, 0,5%, 1% dan 2% dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder dari isolat *Actinomycetes* asal tanaman karst. **Kesimpulan.** Limbah kepala udang sebagai media produksi tidak memberikan pengaruh yang lebih baik dalam memproduksi bobot ekstrak jika dibandingkan dengan media tanpa perlakuan (K). Tetapi, berdasarkan KLT-Densitometri konsentrasi 4% dapat memproduksi metabolit sekunder tertinggi ditandai dengan nilai AUC tertinggi.

Kata kunci: *Actinomycetes*; karst; metabolit sekunder; *Actinomycin D*; limbah kepala udang

## ABSTRACT

Afifah Ghaliyah Salsabila. **Production of Secondary Metabolites from Actinomycetes Isolates from Karst Plants Using Organic Nitrogen Sources from Shrimp Head Waste** (supervised by Herlina Rante and Rosany Tayeb).

**Background.** Antibiotics are substances produced by microorganisms that can inhibit or kill other microbes caused by pathogenic bacterial infections. Most antibiotics are produced by *Actinomycetes*. Shrimp heads contain a relatively high protein content, amounting to 50.72%. With this protein content, shrimp heads can be utilized as an alternative nitrogen source for biomass growth and secondary metabolite production by *Actinomycetes*. **Aim.** This research aims to determine the effect of shrimp head waste in the growth medium of *Actinomycetes* and the impact of shrimp head waste concentration (%) on the production of secondary metabolite from *Actinomycetes* isolates from karst regions. **Methods.** In this study, fermentation of *Actinomycetes* isolates was carried out using modified ISP 2 by replacing yeast extract (a nitrogen source) with shrimp head waste, divided into 5 concentrations: 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, and 4% for 14 days. The fermentation results were extracted using the liquid-liquid extraction method with ethyl acetate (1:1 v/v) and biomass were extracted using the maceration method with ethyl acetate (1:10). The liquid extract and biomass was then evaporated and then measured its weight. Afterward, thin-layer chromatography (TLC)-densitometry testing was performed. **Results.** The highest extract weight of ethyl acetate extract was from the fermentation liquid without treatment (K), amounting to 769.6 mg. This result is higher than the five production media, indicating that media with shrimp head waste did not yield better extract weight compared to the untreated media. The AUC value obtained from the production medium with a 4% concentration produced the highest value compared to the untreated medium (K) and the production media with concentrations of 0.25%, 0.5%, 1%, and 2% in producing Actinomycin metabolites and *Actinomycetes* isolates from karst plants. **Conclusion.** Shrimp head waste as a production medium did not have a better effect on producing extract weight compared to the untreated medium (K). However, shrimp head waste at a 4% concentration as a medium was able to produce the highest secondary metabolite production

Keywords: *Actinomycetes*; karst; *sedoncary metabolite*; Actinomycin D; head shrimp waste

## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI .....	ix
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	3
1.3. Rumusan Masalah .....	3
BAB II METODE PENELITIAN.....	4
2.1 Tempat dan Waktu.....	4
2.2 Bahan dan Alat.....	4
2.3 Metode Kerja.....	4
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	7
3.1 Hasil.....	7
3.2 Pembahasan.....	13
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN.....	17
4.1 Kesimpulan.....	17
3.2 Saran.....	17
DAFTAR PUSTAKA.....	18
LAMPIRAN.....	21

**DAFTAR TABEL**

Nomor urut	Halaman
1. Bobot ekstrak etil asetat cairan fermentasi hasil fermentasi.....	10
2. Data nilai Rf senyawa ekstrak etil asetat.....	12
3. Komposisi media Starch Nitrate Agar (SNA).....	23
4. Komposisi media Starch Nitrate Broth (SNB).....	23
5. Komposisi media International Streptomyces Project 2 (ISP 2).....	24
6. Komposisi media produksi.....	24

## DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Isolat <i>Actinomyces</i> strain MRK01PY.....	7
2. Kultur starter isolat <i>Actinomyces</i> .....	7
3. Media produksi hari ke-1.....	8
4. Media produksi hari ke-14.....	8
5. Ekstrak etil asetat cairan fermentasi hasil fermentasi.....	9
6. Ekstrak etil asetat biomassa hasil fermentasi.....	9
7. Grafik hubungan antara konsentrasi dan bobot ekstrak sampel.....	10
8. Hasil KLT ekstrak etil asetat cairan dan biomassa hasil fermentasi.....	11
9. Hasil identifikasi densitometri ekstrak etil asetat cairan dan biomassa hasil fermentasi.....	12
10. Nilai AUC ekstrak etil asetat cairan fermentasi dan biomassa.....	13
11. Inokulasi isolat ke media starter.....	25
12. Inokulasi isolat ke media produksi.....	25
13. Sentrifugasi hasil fermentasi.....	25
14. Ekstraksi cair-cair.....	25
15. Penguapan ekstrak.....	25
16. Uji KLT.....	25

**DAFTAR LAMPIRAN**

Nomor urut	Halaman
1. Skema Kerja.....	21
2. Perhitungan.....	23
3. Komposisi Media.....	23
4. Profil KLT Densitometri.....	25
Lampiran 4a. Gelombang 254 nm.....	25
Lampiran 4b. Gelombang 366 nm.....	29
5. Dokumentasi Penelitian.....	33

## BAB I

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan jenis penyakit atau masalah kesehatan yang paling banyak dialami terutama di negara berkembang termasuk di Indonesia. Infeksi mudah menyerang anak-anak maupun dewasa yang disebabkan oleh bakteri, virus maupun parasit. Berdasarkan Survei Kesehatan Rumah Tangga Tahun 2007, penyakit infeksi merupakan salah satu penyumbang angka kematian terbesar di Indonesia, yaitu sebanyak 28,1%. Angka tersebut lebih tinggi dibandingkan dari penyakit vaskuler sebanyak 18,9% dan penyakit pernapasan sebanyak 15,7% (Mutsaqof *et al.*, 2015).

Antibiotik merupakan zat yang dihasilkan oleh suatu mikroorganisme yang dapat menghambat atau membunuh mikroba lain yang disebabkan oleh infeksi bakteri patogen (Burhamzah & Rante, 2020). Antibiotik berperan penting untuk pengobatan infeksi yang menjadikan antibiotik sebagai salah satu kelompok obat yang memiliki kebutuhan paling besar dibandingkan kelompok obat lainnya di Indonesia, tetapi besarnya kebutuhan tersebut masih terkendala karena tidak didukung oleh perkembangan sektor bahan baku yang masih bergantung dengan bahan baku impor untuk produksi obat. Berdasarkan data dari (Kementerian Perindustrian, 2016) menyatakan bahwa China (60%), India (30%) dan Eropa (10%) merupakan sumber pemasok bahan baku obat (BBO) terbesar untuk Indonesia. Ketergantungan terhadap BBO ini dapat memberikan banyak dampak dalam produksi antibiotik. Sehingga, dibutuhkan suatu solusi seperti penemuan sumber antibiotik baru khususnya dari bahan alam.

*Actinomycetes* merupakan salah satu mikroorganisme penghasil antibiotik yang banyak terdapat di alam. Sekitar 70% antibiotika, didapatkan dari *Actinomycetes*. Jumlah tersebut lebih banyak dari mikroorganisme lain seperti jamur (20%) dan bakteri (10%) (Burhamzah & Rante, 2020). *Actinomycetes* merupakan mikroba tanah kelompok bakteri gram positif dari genus *Streptomyces* yang banyak memproduksi metabolit sekunder berupa antibiotik (Wahyuningrum *et al.*, 2021). Belakangan ini, *Actinomycetes* banyak diteliti selain karena sebagai penghasil antibiotik, juga memiliki banyak manfaat seperti, antivirus, agen antikanker (kemoterapeutik), enzim, antifungi, dan imunosupresan (Alwi *et al.*, 2020). *Actinomycetes* banyak ditemukan pada habitat yang cukup luas misalnya pada tanah, batuan karst, minyak mentah, sedimen air tawar dan air laut. Sejauh ini, *Actinomycetes* telah banyak diisolasi dari tanah, asosiasi spons laut (Rante *et al.*, 2010), rizosfer pinus (Hashary *et al.*, 2021), dan tanaman karst (Ali *et al.*, 2024). Berdasarkan hasil isolasi *Actinomycetes* dari tanaman karst, diperoleh isolat yang memberikan aktivitas antimikroba terhadap beberapa mikroba uji (Ali *et al.*, 2024).

Karst merupakan permukaan yang terbentuk akibat pelarutan batuan karbonat, seperti batu kapur. Tanah karst mengandung nutrisi seperti kalsium karbonat (CaCO<sub>3</sub>), magnesium dan fosfor yang mendukung pertumbuhan

*Actinomycetes* (Ali, 2017). Berdasarkan penelitian oleh Ali, *et al.* (2024) menyebutkan bahwa *Actinomycetes* yang diisolasi dari tanaman *Poikilospermum suaveolens* yang tumbuh pada kawasan karst memberikan aktivitas antimikroba. Selain itu, salah satu isolat yang dihasilkan yaitu MRK01PY terbukti menghasilkan metabolit sekunder berupa *Actinomycin D*.

Salah satu hasil isolat *Actinomycetes* dari genus *Streptomyces* yang banyak digunakan sebagai produk antibiotik adalah *Actinomycin D*. *Actinomycin* merupakan antibiotik pertama yang diisolasi dari *Streptomyces antibioticus* (Rai & Bai, 2022) dan telah banyak digunakan dalam praktik klinis sejak tahun 1954 khususnya sebagai antibiotik dan obat antikanker (Finocchiaro, 2020). Aktivitas biologis dari *Actinomycin D* sebagai antibiotik yaitu berkaitan dengan kemampuannya untuk berikatan dengan dupleks DNA sehingga mengakibatkan penghambatan sintesis RNA (Charousuva *et al.*, 2019).

Bagi mikroba penghasil antibiotik, ketersediaan sumber karbon dan nitrogen dalam medium produksi sangat penting untuk pembentukan metabolit sekundernya. (Wulandari & Sulistyani, 2016). Berdasarkan penelitian oleh Kurniawan *et al.*, (2020) digunakan media *Starch Nitrate Broth* (SNB) sebagai media pertumbuhan *Actinomycetes*. Selain media SNB, media ISP2 juga sering digunakan sebagai media fermentasi *Actinomycetes*. Media ISP2 memberikan pertumbuhan yang baik bagi *Actinomycetes* karena mampu memanfaatkan bahan-bahan organik yang terdapat pada media ISP2 yaitu *yeast extract* sebagai sumber nitrogen (Listiana *et al.*, 2018). Berdasarkan penelitian oleh Dharmaraj *et al.*, (2010), nitrogen dalam bentuk asam amino atau protein terbukti berdampak positif terhadap pertumbuhan isolat *Streptomyces*. Asam amino tersebut berperan sebagai sumber nitrogen esensial bagi *Actinomycetes* untuk sintesis seluler serta prekursor yang dibutuhkan dalam jalur biosintesis untuk pembentukan metabolit sekunder berupa antibiotik (Ali, 2017), namun menurut Hamida & Nasution (2019) penggunaan sumber nitrogen anorganik menyebabkan konsentrasi amonium yang tinggi dalam media kultur dan menekan produksi antibiotik pada mikroorganisme sehingga penting menggunakan sumber nitrogen organik lain, seperti kepala udang.

Indonesia merupakan negara penghasil udang terbesar ketiga di dunia. Tingginya industri pengolahan udang di Indonesia menyebabkan kemungkinan tingginya limbah yang dihasilkan. Berdasarkan Soeka & Triana (2016), limbah yang dihasilkan dari pengolahan tersebut mencapai 60-70% dari berat udang. Limbah tersebut mudah sekali busuk yang berpotensi menimbulkan pencemaran lingkungan, sehingga diperlukan pemanfaatan untuk mengatasi masalah tersebut. Salah satu bagian dari udang yang banyak menjadi limbah adalah kepala udang. Kepala udang memiliki kandungan yang baik karena mengandung protein yang cukup tinggi sebesar 50,72% dibandingkan dengan cangkang udang sebesar 46,20% (Belandria & Morillo, 2013). Berdasarkan penelitian Randriamahatody *et al.* (2011) menyebutkan bahwa kandungan asam amino pada kepala udang sekitar 60%, dimana asam amino tersebut dibentuk oleh asam glutamat (14-17%), asam aspartat (10-15%), glisin, alanin, dll. Kandungan tersebut baik untuk pertumbuhan biomassa dan produksi antibiotik dari strain *Actinomycetes* (Singh *et al.*, 2009).

Oleh karena itu, tujuan utama penelitian ini yaitu memanfaatkan limbah kepala udang sebagai sumber nitrogen organik untuk produksi metabolit sekunder dari *Actinomyces* yang diisolasi dari tanaman karst.

### **1.2 Rumusan Masalah**

1. Bagaimana efek limbah kepala udang sebagai media pertumbuhan isolat *Actinomyces* asal tanaman karst dalam memproduksi metabolit sekunder?
2. Bagaimana efek konsentrasi limbah kepala udang terhadap produksi metabolit sekunder dari isolat *Actinomyces* asal tanaman karst?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui bagaimana efek limbah kepala udang sebagai media pertumbuhan isolat *Actinomyces* asal tanaman karst dalam memproduksi metabolit sekunder.
2. Untuk mengetahui efek konsentrasi limbah kepala udang terhadap produksi metabolit sekunder yang berasal dari isolat *Actinomyces* asal tanaman karst.

## BAB II

### METODE PENELITIAN

#### 2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin pada rentang waktu Maret 2024 – September 2024.

#### 2.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu *Biosafety Cabinet* (Thermo®), autoklaf (*All American Model 25x-2*®), *shaker*, corong pisah, timbangan analitik (*Sartorius*®), alat gelas (*Pyrex*®), pinset, spuit (*Merck*®), lumpang dan alu, ose bulat, Erlenmeyer, cawan petri, cawan porselen, vial, *micropipette*, waterbath dll.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu isolat *Actinomyces* strain MRK01PY, limbah kepala udang, medium *Starch Nitrate Agar* (SNA), medium *Starch Nitrate Broth* (SNB), medium ISP2, *malt extract*, dekstrosa, lempeng silika G60 F254 (*Merck*®), *aquadest*, etil asetat, metanol, Amonia dll.

#### 2.3 Metode Kerja

##### 2.3.1 Penyiapan Alat

Alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu dengan menggunakan sabun lalu dibilas menggunakan air mengalir kemudian dikeringkan. Setelah dikeringkan, alat dibungkus untuk proses sterilisasi. Alat yang terbuat dari gelas dan berskala disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sedangkan alat-alat yang tidak berskala dan tahan pada pemanasan disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

##### 2.3.2 Penyiapan Bahan

###### 2.3.2.1 Preparasi Kepala Udang

Sampel kepala udang diambil dari PT. South Suco, Makassar, Sulawesi Selatan. Kepala udang yang mengandung cangkang dibuang, lalu diambil bagian daging kemudian dibersihkan menggunakan *aquadest*. Daging kepala udang yang telah bersih kemudian digerus hingga membentuk pasta.

###### 2.3.2.2 Medium Starch Nitrate Agar (SNA)

Medium SNB dibuat dengan cara melarutkan 20 g *soluble starch*, 20 g agar, 1 g KNO<sub>3</sub>, 0,5 g NaCl, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 4 g CaCO<sub>3</sub> NaCl 0,05 g dan 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ke dalam 1000 mL *aquadest* pada labu Erlenmeyer 1000 mL. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

###### 2.3.2.3 Medium Starch Nitrate Broth (SNB)

Medium SNB dibuat dengan cara melarutkan 20 g *soluble starch*, 2 g KNO<sub>3</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub>, 0,5 NaCl, 3 g CaCO<sub>3</sub>, dan 0,01 g FeSO<sub>4</sub> g ke dalam 1000 mL *aquadest*. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 2.3.2.4 Media Produksi

Media produksi digunakan sebagai tanpa perlakuan adalah media ISP 2 (*International Streptomyces Project*) dibuat dengan cara melarutkan *Yeast extract* 4 g, *malt extract* 10 g, *dextrose* 4 g ke dalam 1000 mL *aquadest* pada labu Erlenmeyer 1000 mL dan diatur menjadi pH 7.2. Sedangkan media produksi limbah kepala udang yaitu menggunakan media ISP2 yang sumber nitrogennya (*yeast extract*) digantikan oleh pasta limbah kepala udang. Media produksi limbah kepala udang dibuat dalam 5 konsentrasi, yaitu 0,25%, 0,5%, 1%, 2%, dan 4%. Selanjutnya, media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### 2.3.2.5 Pembuatan Kultur Starter

Pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose lurus isolat *Actinomycetes* MRK01PY ke dalam media SNA ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi 250 mL medium SNB dan diinkubasi dalam keadaan tergojog dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *shaker* pada suhu ruang selama 7 hari (Burhamzah & Rante, 2020).

#### 2.3.2.6 Fermentasi Isolat *Actinomycetes*

Fermentasi isolat *Actinomycetes* dilakukan dengan cara fermentasi media cair. Fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan 10% isolat *Actinomycetes* (starter) ke dalam masing-masing 150 mL media tanpa perlakuan dan media produksi ISP2 termodifikasi dengan mengganti *yeast extract* dengan pasta limbah kepala udang dengan berbagai konsentrasi. Fermentasi dilakukan pada suhu ruang selama 14 hari dalam keadaan tergojog dengan kecepatan 150 rpm menggunakan *shaker* (Burhamzah & Rante, 2020).

#### 2.3.2.7 Ekstraksi Isolat *Actinomycetes*

Setelah dilakukan fermentasi selama 14 hari, dilakukan sonikasi selama 10 menit menggunakan sonikator lalu disentrifugasi untuk memisahkan antara biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi disentrifugasi pada kecepatan 10.000 Rpm selama 15 menit. Hasil cairan fermentasi, dipindahkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL kemudian diekstraksi sebanyak 2 kali menggunakan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah selama 15 menit. Ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *Rotary Evaporator* untuk menghilangkan pelarut yang ada (Burhamzah & Rante, 2020). Sedangkan, biomassa diekstraksi dengan metode maserasi selama 5 hari menggunakan pelarut etil asetat (1:10). Hasil ekstraksi dari masing-masing konsentrasi, ditimbang bobot ekstraknya.

#### 2.3.2.8 Uji Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan dengan ekstrak etil asetat dan biomassa isolat *Actinomycetes* ditotolkan sebanyak 5 µL pada lempeng silika 60 GF-254 berukuran 12 x 10 cm menggunakan mikropipet dengan batas bawah 1 cm dan batas atas 0,5 cm. Kemudian dielusi menggunakan fase gerak etil asetat : metanol : Amonia (9 mL : 0,1 mL : 2 tetes). Setelah itu, lempeng diamati di bawah sinar UV 254 dan 366 nm. Selanjutnya, lempeng dianalisis menggunakan alat densitometer dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm lalu dihitung nilai Rf dan AUC nya.