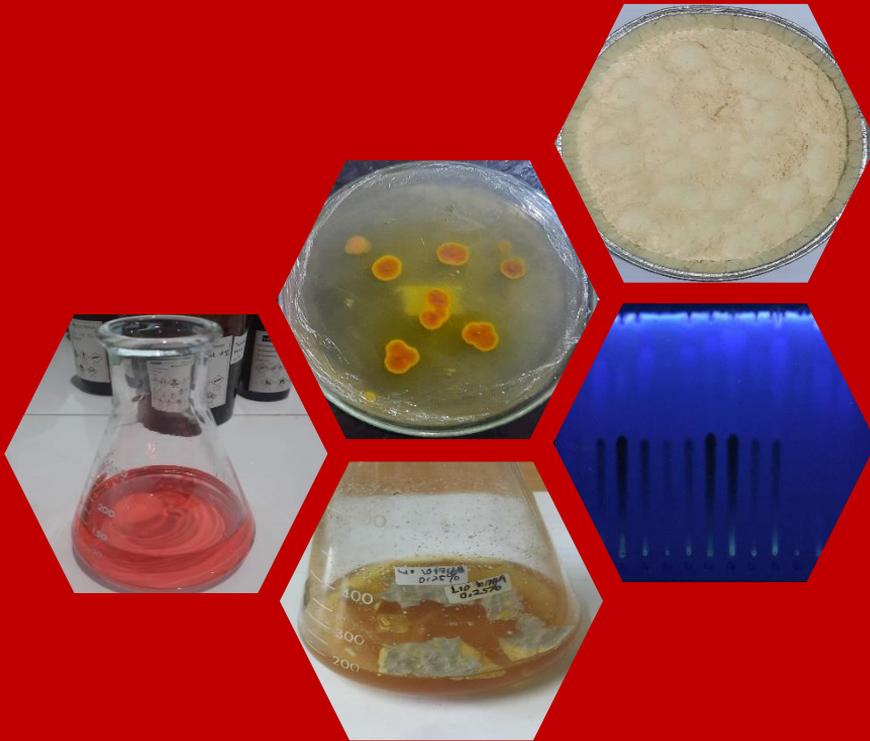


**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT *Streptomyces* sp.
ASAL TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER KARBON
ORGANIK LIMBAH AMPAS TAHU**



**VERELIO WIDANA PASALU
N011201035**



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

**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT *Streptomyces sp.*
ASAL TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER KARBON
ORGANIK LIMBAH AMPAS TAHU**

**VERELIO WIDANA PASALU
N011201035**



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

**PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT *Streptomyces sp.*
ASAL TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER KARBON
ORGANIK LIMBAH AMPAS TAHU**

VERELIO WIDANA PASALU
N011201035

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

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

SKRIPSI

PRODUKSI METABOLIT SEKUNDER DARI ISOLAT *Streptomyces sp.* ASAL TANAMAN KARST MENGGUNAKAN SUMBER KARBON ORGANIK LIMBAH AMPAS TAHU

VERELIO WIDANA PASALU
N011201035

Skripsi

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 21
November 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada



Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

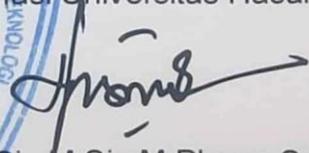
Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping


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


Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin


Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc, Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul “Produksi Metabolit Sekunder Dari Isolat *Streptomyces sp.* Asal Tanaman Karst Menggunakan Sumber Karbon Organik Limbah Ampas Tahu” adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun 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, 21-11-2024



VERELIO WIDANA PASALU
N011201035

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur peneliti ucapkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkah dan karunia-Nya yang telah memberikan ilmu pengetahuan, kekuatan, kesabaran, dan kesempatan kepada peneliti sehingga mampu menyelesaikan skripsi ini. Skripsi ini berjudul “Produksi Metabolit Sekunder Dari Isolat *Streptomyces sp.* Asal Tanaman Karst Menggunakan Sumber Karbon Organik Limbah Ampas Tahu”. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini mengalami berbagai hambatan. Namun, berkat kegigihan, usaha dan doa. Akhirnya, skripsi ini dapat terselesaikan.

Dalam penyelesaian studi dan penulisan skripsi ini juga tidak terlepas dari bantuan, doa, dorongan, semangat serta bimbingan dari berbagai pihak. Untuk itu saya menyampaikan penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga kepada pihak-pihak yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini, antara lain:

1. Orang tua saya, Ayahanda Daniel Pasalu, Ibunda Marcelina Marthen dan kakanda Valendion Pradana Pasalu yang tak henti-hentinya mendoakan dan memberikan dukungan baik motivasi maupun materi kepada penulis hingga tahap penyelesaian skripsi ini. Terima kasih atas segala kasih sayang serta dorongan dan perhatian sehingga saya dapat terus berjuang. Kesuksesan dan segala hal baik yang akan datang kepada saya untuk kalian berdua.
2. Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. dan dan Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan memberikan bimbingan, gagasan serta ide-ide dalam penyelesaian skripsi ini.
3. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku dosen penguji yang banyak memberikan masukan dan saran guna menyempurnakan tugas akhir ini.
4. Bapak Dr. Alimuddin Ali, S.Si, M.Si. dan Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt. yang telah membimbing dan memberikan fasilitas penelitian kepada penulis demi keberhasilan skripsi ini.
5. Bapak Aminullah, S.Si., M.Pharm.Sc., Apt. selaku penasehat akademik yang telah memberikan arahan dan nasehat selama penulis menempuh pendidikan.
6. Seluruh dosen, staf pengajar serta pegawai Fakultas Farmasi atas segala ilmu, bantuan dan kemudahan yang diberikan selama menempuh proses perkuliahan.
7. Faizah Nurul Inayah, Afifah Ghaliyah Salsabila dan teman-teman HE20IN yang telah membersamai penulis selama di Universitas Hasanuddin.

Penulis,

Verelio Widana Pasalu

ABSTRAK

VERELIO WIDANA PASALU. **Produksi Metabolit Sekunder Dari Isolat *Streptomyces sp.* Asal Tanaman Karst Menggunakan Sumber Karbon Organik Limbah Ampas Tahu** (dibimbing oleh Herlina Rante dan Gemini Alam).

Latar belakang. Antibiotika merupakan golongan senyawa alami, semi sintetis atau sintetis yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, khususnya digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Antibiotik yang dikenal saat ini sebagian besar awalnya diisolasi dari Actinomycetes, terutama dari genus *Streptomyces* yang memiliki potensi produksi antibiotik dan identifikasi antibiotik baru. Ampas tahu kering memiliki kandungan protein (sumber nitrogen) yang cukup tinggi yang dapat mencapai 17,08% dan karbohidrat (sumber karbon) yang mencapai 22,75%. Dengan jumlah karbohidrat dan protein yang terkandung di dalam ampas tahu dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan nitrogen alternatif untuk pertumbuhan *Streptomyces sp.* dan produksi senyawa metabolit sekunder. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi limbah ampas tahu sebagai media dalam produksi senyawa metabolit sekunder oleh *Streptomyces sp.* yang diisolasi dari tanaman karst, serta mengetahui konsentrasi (%) limbah ampas tahu yang menunjukkan produksi senyawa metabolit sekunder paling tinggi. **Metode.** Pada penelitian ini dilakukan fermentasi isolat *Streptomyces sp.* dengan media ampas tahu yang terbagi menjadi 5 formula, yaitu Formula A (0,25%), B (0,5%), C (1%), D (2%) dan E (4%) selama 14 hari. Hasil fermentasi disonikasi dan diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat (1:1) untuk cairan fermentasi dan maserasi menggunakan etil asetat (1:10) untuk biomassa. Selanjutnya, ekstrak cair dievaporasi dan dilakukan pengujian KLT-Densitometri. **Hasil.** Perubahan warna pada media fermentasi setelah inkubasi selama 14 hari dari kuning menjadi kuning kecoklatan. Bobot ekstrak etil asetat dari cairan fermentasi pada media K (tanpa perlakuan) memiliki nilai terbesar, diikuti media ampas tahu B (0,5%), E (4%), D (2%), A (0,25%) dan C (1%). Hasil analisis KLT senyawa metabolit sekunder dominan terdeteksi pada nilai Rf 0,4 dan berwarna kuning. Hasil analisis densitometri menunjukkan nilai AUC tertinggi diperoleh pada media C (1%), diikuti oleh media A (0,25%), D (2%), B (0,5%), K (tanpa perlakuan), dan E (4%). **Kesimpulan.** Limbah ampas tahu dapat digunakan sebagai media untuk merangsang produksi senyawa metabolit sekunder oleh *Streptomyces sp.* strain MRK01PY yang diisolasi dari tanaman karst dengan karakteristik pigmen warna yang terbentuk. Media ampas tahu konsentrasi 1% untuk fermentasi *Streptomyces sp.* strain MRK01PY menghasilkan senyawa metabolit sekunder (Rf 0,45 dan 0,44) lebih banyak dibandingkan dengan media ampas tahu pada konsentrasi 0,25%, 0,5%, 2%, 4% dan ISP2.

Kata kunci: *Streptomyces*; ampas tahu; produksi.

ABSTRACT

VERELIO WIDANA PASALU. **Secondary Metabolite Production From *Streptomyces sp.* Isolates From Karst Plants Using Organic Carbon Sources From Tofu Dregs Waste** (supervised by Herlina Rante and Gemini Alam).

Background. Antibiotics are a group of natural, semi-synthetic, or synthetic compounds that can kill or inhibit the growth of bacteria, especially used to treat bacterial infections. Most of the antibiotics known today were originally isolated from actinomycetes, especially from the genus *Streptomyces*, which has the potential for antibiotic production and identification of new antibiotics. Dried tofu dregs have a fairly high protein content (nitrogen source), which can reach 17.08%, and carbohydrates (carbon source), which reach 22.75%. With the amount of carbohydrates and proteins contained in tofu dregs, it can be used as an alternative carbon and nitrogen source for the growth of *Streptomyces sp.* and the production of secondary metabolite compounds. **Aim.** This study aimed to determine the potential of tofu dregs as a medium for the production of secondary metabolite compounds by *Streptomyces sp.* isolated from karst plants and to determine the concentration (%) of tofu dregs that showed the highest production of secondary metabolite compounds. **Methods.** In this study, fermentation of *Streptomyces sp.* isolates was carried out with tofu dregs media, which were divided into 5 formulas, namely Formula A (0.25%), B (0.5%), C (1%), D (2%), and E (4%), for 14 days. The fermentation results were sonicated and extracted by the liquid-liquid extraction method using ethyl acetate (1:1) for fermentation liquid and maceration using ethyl acetate (1:10) for biomass. Furthermore, the liquid extract was evaporated and tested with TLC-Densitometry. **Results.** The color change in the fermentation media after incubation for 14 days was from yellow to brownish yellow. The weight of ethyl acetate extract from fermentation liquid in K media (without treatment) had the highest value, followed by tofu dregs media B (0.5%), E (4%), D (2%), A (0.25%), and C (1%). The results of TLC analysis of dominant secondary metabolite compounds were detected at an R_f value of 0.4 and were yellow. The results of densitometric analysis showed that the highest AUC value was obtained in media C (1%), followed by media A (0.25%), D (2%), B (0.5%), K (without treatment), and E (4%). **Conclusion.** Tofu dregs waste can be used as a medium to stimulate the production of secondary metabolite compounds by *Streptomyces sp.* strain MRK01PY isolated from karst plants with the characteristics of the color pigments formed. Tofu dregs media with a concentration of 1% for fermentation of *Streptomyces sp.* strain MRK01PY produced more secondary metabolite compounds (R_f 0.45 and 0.44) compared to tofu dregs media at concentrations of 0.25%, 0.5%, 2%, 4% and ISP2.

Keywords: *Streptomyces*; tofu dregs; production.

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR.....	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	3
1.3. Tujuan Penelitian	3
BAB II METODE PENELITIAN.....	4
2.1 Bahan dan alat.....	4
2.2 Metode penelitian.....	4
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	7
4.1 Hasil.....	7
4.2 Pembahasan.....	13
BAB IV KESIMPULAN	16
DAFTAR PUSTAKA.....	17
LAMPIRAN.....	19

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Hasil perolehan bobot ekstrak etil asetat hasil fermentasi	9
2. Nilai Rf senyawa dari ekstrak etil asetat	11
3. Komposisi Media Starch Nitrate Agar (SNA).....	20
4. Komposisi Media Starch Nitrate Agar (SNB)	20
5. Komposisi Media International Streptomyces Project 2 (ISP 2)	20
6. Komposisi Media Produksi.....	20

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Struktur <i>Actinomycin D</i>	1
2. Isolat <i>Streptomyces sp.</i> strain MRK01PY	7
3. Serbuk ampas tahu	7
4. Media fermentasi pada hari ke-0	8
5. Media fermentasi pada hari ke-14.....	9
6. Profil bobot ekstrak etil asetat hasil fermentasi.....	10
7. Profil kromatografi ekstrak etil asetat	10
8. Hasil densitogram ekstrak etil asetat isolat <i>Streptomyces sp.</i>	11
9. Perolehan nilai AUC ekstrak etil asetat hasil fermentasi	12
10. Uji karbohidrat dan protein total ampas tahu	32
11. Sentrifuge hasil fermentasi	32
12. Inokulasi Isolat ke medium starter	32
13. Ekstraksi cair-cair	32
14. Inokulasi starter ke medium produksi	32
15. Penguapan ekstrak	32
16. Sonikasi media produksi	32
17. Analisis KLT-Densitometri	32

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema kerja	19
2. Komposisi media	20
3. Profil KLT-Densitometri	21
Lampiran 3a. Gelombang 254 nm	21
Lampiran 3b. Gelombang 366 nm	25
4. Perhitungan	30
Lampiran 4a. Perhitungan karbohidrat total	30
Lampiran 4b. Perhitungan protein total	30
Lampiran 4c. Perhitungan volume totalan KLT	31
5. Dokumentasi penelitian.....	32

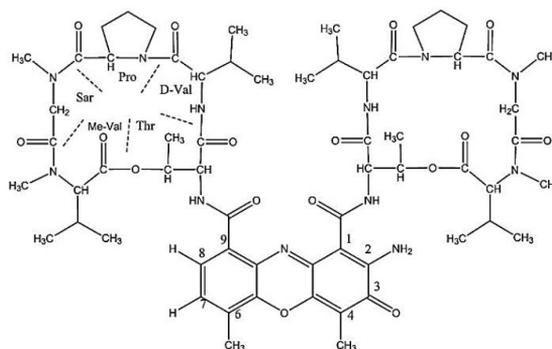
BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antibiotika merupakan golongan senyawa alami, semi sintetis atau sintetis yang mampu membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, khususnya digunakan untuk mengobati infeksi bakteri (Utami, 2012). Melihat dari banyaknya kasus infeksi yang terjadi di Indonesia, sehingga kebutuhan antibiotik juga meningkat. Kebutuhan antibiotik akan sejalan dengan kebutuhan bahan bakunya. Menurut Permenkes No. 21 Tahun 2020, lebih dari 90% bahan baku obat merupakan produk impor. Hal tersebut dapat menjadi masalah terhadap kualitas bahan baku yang tidak terjamin, harga yang berubah-ubah dan ketersediaan bahan baku yang tidak menentu. Perlu adanya kemandirian dalam bidang produksi bahan baku obat, salah satunya *Streptomyces* sebagai pemasok bahan baku antibiotik.

Antibiotik yang dikenal saat ini sebagian besar awalnya diisolasi dari Actinomycetes. Actinomycetes merupakan kelompok mikroba yang menghasilkan senyawa bioaktif antibiotik terbanyak (70%), selanjutnya disusul jamur (20%), dan bakteri (10%). Actinomycetes sangat penting dalam lingkungan karena mampu melakukan biotransformasi dan proses metabolisme dalam rentang yang sangat luas (Rante, 2020). *Actinomycin* menjadi antibiotik pertama yang diisolasi dari Actinomycetes, terutama dari genus *Streptomyces* yang memiliki potensi produksi antibiotik dan identifikasi antibiotik baru (Mast & Stegmann, 2019). *Actinomycin* adalah golongan lakton kromopeptida bisiklik yang berbagi asam fenoxazinon dikarboksilat kromoforik yang melekat pada dua lakton pentapeptida yang berasal dari nonribosom. Salah satu senyawa Actinomycin ialah *Actinomycin D* yang bertindak sebagai penghambat transkripsi, mengikat dupleks DNA pada kompleks inisiasi transkripsi dan mencegah pemanjangan RNA polymerase (Singh, 2010).



Gambar 1. Struktur *Actinomycin D* (Charoenwiwattanakij dkk., 2020)

Karst merupakan suatu kawasan dengan kondisi hidrologi yang khas terbentuk dari batuan yang larut dan porositas sekunder yang berkembang dengan baik. Sebagian besar kawasan karst di Indonesia tersusun dari batuan karbonat, dan hampir tidak ada yang tersusun dari batuan lain seperti gipsium, batuan garam, atau batuan evaporit (Aprilia dkk., 2021). Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Ali dkk. (2024) berhasil mengisolasi bakteri *Streptomyces sp.* strain MRK01PY asal kawasan karst dari tumbuhan *Poikilospermum suaveolens* yang menghasilkan metabolit sekunder khas bakteri Actinomycetes, yaitu *Actinomycin D*.

Streptomyces sp. membutuhkan karbohidrat sebagai sumber karbon dan protein sebagai sumber nitrogen yang cukup selama pertumbuhan dan produksi metabolit sekundernya. Pada penelitian sebelumnya oleh Ali dkk. (2024) menunjukkan *Streptomyces sp.* dapat ditumbuhkan menggunakan media *Starch Nitrate Broth* dan ISP2. Sumber karbon berperan penting dalam produksi metabolit sekunder *Streptomyces sp.* (Ruiz dkk., 2010). Pati dapat memicu produksi senyawa Actinomycin yang banyak pada Actinomycetes (Hamza dkk., 2013). 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.

Ampas tahu diperoleh dari proses penyaringan sari kedelai masak. Ampas tahu yang dihasilkan sekitar 8,2% dari total sari kedelai masak (Sjafruddin dkk., 2022). Kedelai yang berkualitas baik dibersihkan dari kotoran sebelum direndam 8-12 jam. Kemudian, kedelai dikupas dan digiling dengan penambahan air panas dengan suhu 80-100°C. Bubur kedelai disaring, filtratnya digunakan untuk pembuatan tahu sedangkan ampas padatnya atau ampas kedelai sudah tidak digunakan dalam pembuatan tahu. Ampas padat tahu jika tidak dimanfaatkan akan mencemari lingkungan sehingga perlu adanya inovasi dalam pengolahannya (Purwaningsih, 2007). Ampas tahu memiliki kandungan protein (sumber nitrogen) yang cukup tinggi yang dapat mencapai 17,08% dan karbohidrat (sumber karbon) yang mencapai 22,75%. Dengan jumlah karbohidrat dan protein yang terkandung di dalam ampas kedelai dapat dimanfaatkan sebagai sumber karbon dan nitrogen alternatif untuk pertumbuhan dan produksi senyawa metabolit sekunder *Streptomyces sp.* strain MRK01PY. Oleh karena itu, tujuan utama penelitian ini adalah optimasi media produksi menggunakan limbah ampas tahu yang berupa kedelai sisa pengolahan dari pembuatan tahu untuk menumbuhkan dan metabolisme *Streptomyces sp.* yang diisolasi dari tanaman karst. Selain itu, penelitian ini merupakan salah satu upaya pemanfaatan limbah yang memiliki potensi mencemari lingkungan.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah limbah ampas tahu dapat digunakan sebagai media untuk merangsang produksi senyawa metabolit sekunder oleh *Streptomyces sp.* yang diisolasi dari tanaman karst?
2. Pada konsentrasi berapa persen (%) limbah ampas tahu menunjukkan produksi senyawa metabolit sekunder paling tinggi?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk mengetahui apakah limbah ampas tahu dapat digunakan sebagai media untuk merangsang produksi senyawa metabolit sekunder oleh *Streptomyces sp.* yang diisolasi dari tanaman karst.
2. Untuk mengetahui konsentrasi (%) limbah ampas tahu yang menunjukkan produksi senyawa metabolit sekunder paling tinggi.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam riset ini, autoklaf (One Med[®]), ayakan no. 60 mesh, blender (Miyako[®]), *biosafety cabinet* (Thermo scientific[®]), *destillation unit K-355* (Büchi[®]), *incubator shaker*, lemari asam (B-ONE[®]), oven (Ecocell[®]), pipet mikro (Dragonlab[®]), *shaker* (B-ONE[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), *hot plate* (Oxone[®]), corong pisah, alat-alat gelas (Pyrex[®]), ose bulat steril, ose lurus steril dan *TLC Scanner 3* (Camag[®]).

Bahan yang digunakan dalam riset ini, yaitu akuades, amonium hidroksida, isolat bakteri *Streptomyces sp.* strain MRK01PY koleksi Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt., limbah ampas tahu (ampas kedelai), etil asetat, H₂SO₄ (Supelco[®]), kertas saring (Whatman[®]), media ISP2, media SNA, metanol, reagen dragendorff dan *TLC silica gel 60 F₂₅₄* (Supelco[®]).

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Penyiapan alat dan bahan

Alat-alat berbahan gelas dicuci bersih dengan menggunakan sabun, kemudian dibilas dengan menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Sterilisasi alat-alat yang berbahan gelas dan memiliki skala dilakukan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Sterilisasi untuk alat-alat yang tahan terhadap pemanasan dan tidak berskala dapat disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam.

2.2.2 Penyiapan ampas tahu

Limbah ampas tahu berupa sisa ampas kedelai diambil dari pabrik pembuatan tahu. Kemudian dikeringkan menggunakan hidrator pada suhu 60°C hingga diperoleh serbuk kering, lalu diblender hingga diperoleh serbuk halus (Hamida & Nasution, 2019).

2.2.3 Uji karbohidrat total

Limbah ampas tahu diambil sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL. Kemudian, dihidrolisis (polisakarida menjadi monosakarida) dengan HCl 3% dicukupkan hingga 100 mL hingga ampas tahu agak larut. Campuran didinginkan dan ditambahkan NaOH 30% sedikit demi sedikit hingga diperoleh pH 5,5 (jika pH berlebih diturunkan dengan asam asetat 50%). Larutan dicukupkan hingga 200 mL, kemudian disaring. Diambil 10 mL sampel ditambahkan 15 mL akuades dan 25 mL reagen Luff (cairan warna biru) yang terbuat dari tembaga (II) sulfat (CuSO₄), kalium sodium tartrat (KNaCH₄O₆) dan NaOH. Kemudian,

dipanaskan hingga mendidih selama 15 menit. Setelah cairan dingin ditambahkan 5 mL KI 30% dan 25 mL H₂SO₄ 25%. Dititrasi (titrasi redoks) dengan Natrium Tiosulfat 0,1 N hingga berwarna kuning muda. Ditambahkan amilum 0,25% sebanyak 10 tetes. Dilanjutkan titrasi hingga amilum tidak berwarna gelap.

2.2.4 Uji protein total

Limbah ampas tahu ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 mL. Kemudian, ditambahkan dengan 1 sendok *selenium reagen mixture* dan dipanaskan dengan H₂SO₄ 95% hingga berwarna jernih. Larutan ditambahkan 100 mL akuades, 1 mL indikator fenolftalein dan NaOH pellet hingga berwarna merah muda (pH 8,3). Larutan dipindahkan ke labu destilasi dan didestilasi hingga 100 mL (Destilat ditampung dalam Erlenmeyer yang berisi 20 mL H₃BO₃ 1%. Sebelum dititrasi larutan ditambahkan indikator BCG (*Bromocresol Green*) 3 tetes hingga berwarna hijau atau biru (pH 9,5) dan dititrasi (titrasi asam basa) dengan HCl 0,1 N hingga berubah warna menjadi merah mudah atau ungu.

HCl 0,1 N dibuat dengan cara memasukkan HCl 37% (setara 12 N) sebanyak 8,33 mL ke dalam labu ukur 1000 mL. Kemudian, dicukupkan dengan aquadest secara perlahan hingga 1000 mL.

2.2.5 Pembuatan media *Starch Nitrate Agar (SNA)*

Media *Starch Nitrate Broth* dibuat dengan komposisi *Starch* 20 g, K₂HPO₄ 1 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄ 0,5 g, CaCO₃ 3,0 g, NaCl 100 g, akuades 1000 mL dengan pH diatur menjadi 7,2-7,4. Selanjutnya dipanaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larut, kemudian disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.6 Pembuatan media *Starch Nitrate Broth (SNB)*

Media *Starch Nitrate Broth* dibuat dengan komposisi *Starch* 20 g, K₂HPO₄ 1 g, KNO₃ 2 g, MgSO₄ 0,5 g, CaCO₃ 3,0 g, NaCl 100 g, akuades 1000 mL dengan pH diatur menjadi 7,2-7,4. Selanjutnya dipanaskan sambil diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larut, kemudian disterilkan ke dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.7 Pembuatan media produksi

Media produksi yang digunakan sebagai kontrol adalah media ISP 2 (International Streptomyces Project) dengan komposisi: *Yeast extract* 4 g, *malt extract* 10 g, *dextrose* 4 g, akuades 1000 mL dengan diatur menjadi pH 7,2, sedangkan media produksi limbah ampas tahu adalah media ISP2 yang sumber karbonnya (*malt extract*) digantikan oleh limbah ampas tahu. Media produksi limbah ampas tahu dibuat dalam 150 mL dengan macam 5 formula, yaitu Formula A (0,375

g ; 0,25%), B (0,75 g ; 0,5%), C (1,5 g ; 1%), D (3 g ; 2%), E (6 g ; 4%). Kemudian, disterilkan dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

2.2.8 Peremajaan isolat

Peremajaan isolat *Streptomyces sp.* strain MRK01PY dilakukan dengan metode pour plate menggunakan media SNA dalam cawan petri.

2.2.9 Sporulasi starter

Sporulasi isolat *Streptomyces sp.* strain MRK01PY dilakukan dengan menginokulasikan sebanyak 1 ose lurus ke dalam Erlenmeyer 500 mL yang berisi 150 mL ISP2. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu kamar selama 3 hari (Rante, 2020).

2.2.10 Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan cara fermentasi media cair. Prekultur diinokulasikan sebanyak 10% ke dalam 150 mL media tanpa perlakuan dan media perlakuan ISP2 termodifikasi dengan mengganti *malt extract* yang berisi ampas tahu dengan berbagai konsentrasi. Kemudian, diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang menggunakan *incubator shaker* dengan kecepatan 150 rpm (Rante, 2020).

2.2.11 Ekstraksi

Setelah proses fermentasi media produksi disonikasi selama 15 menit. Kemudian, disentrifuge dengan kecepatan 10000 Rpm selama 15 menit (jika belum terpisah dilakukan pengulangan) untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi beberapa kali dengan pelarut etil asetat dalam corong pisah selama 15 menit. Biomassa juga diekstraksi untuk memastikan semua metabolit sekunder didapatkan, biomassa diekstraksi dengan etil asetat menggunakan metode maserasi. Ekstrak yang diperoleh ditimbang dan diuapkan. Selanjutnya, dilakukan perhitungan bobot ekstrak yang diperoleh.

2.2.12 Analisis Kromatografi Lapis Tipis-Densitometri

Ekstrak etil asetat dari cairan fermentasi dan biomassa dibuat dalam 5% larutan dan ditotolkan sebanyak 5 µL pada lempeng silika gel F-254 dengan ukuran 10 cm x 13 cm. Kemudian, dielusi dengan fase gerak etil asetat : methanol : ammonium hidroksida = 9 mL : 0,1 mL : 2 tetes. Lempeng diamati dengan diamati pada UV 254 nm dan 366 nm. Kemudian, lempeng dianalisis di TLC Scanner.

2.2.13 Analisis Data

Data hasil penelitian yang didapatkan dibuat dalam bentuk diagram untuk memvisualisasikan hasil metabolit sekunder yang diproduksi.