

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kondisi optimum produksi antibiotik, identifikasi genus isolat bakteri termofilik TUA-103 berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA, serta profil metabolit sekunder berdasarkan analisis LC-MS/MS untargeted. Hasil tersebut dapat disimpulkan sebagai berikut:

A. Kondisi Optimum untuk Produksi Antibiotik

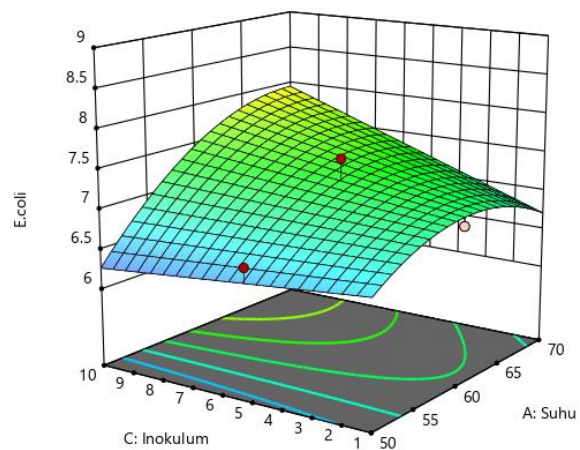
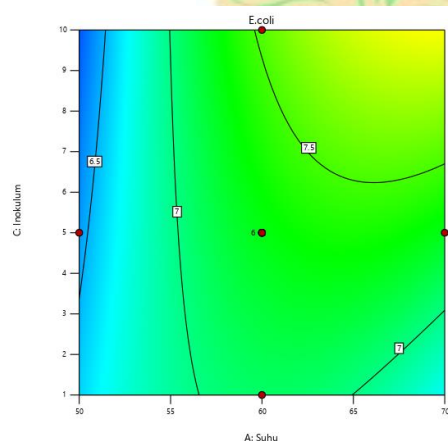
Optimasi produksi senyawa bioaktif antibiotik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kondisi optimum yang diperlukan Isolat TUA-103 dalam menghasilkan zona hambat melalui optimasi faktor suhu (50°C, 60°C, 70°C) pH (6,7,8), dan konsentrasi inokulum (1%, 5%, 10%) terhadap bakteri patogen *E.coli* dan *S.aureus*.

1. Penentuan Kondisi Optimum Melalui Variasi Suhu, Ph, Dan Konsentrasi Inokulum

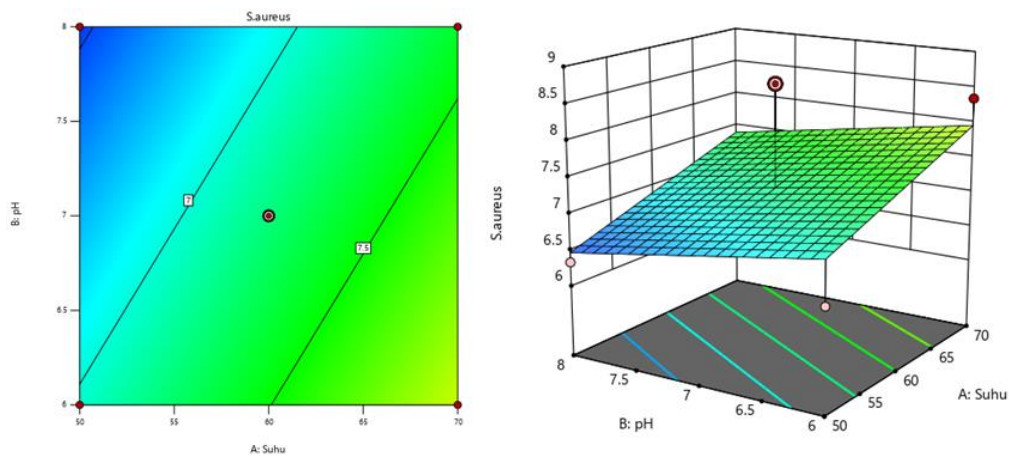
Optimasi suhu, pH dan konsentrasi inokulum dilakukan berdasarkan pengacakan kombinasi yang diatur oleh Response Surface Methodology (RSM) dengan rancangan percobaan tipe Central Composite Design (CCD) pada Software statistic Design Expert 13. Kombinasi suhu (A), pH (B) dan agitasi (C) didapatkan 20 perlakuan dengan 6 ulangan center point (60°C, 6, 5%). Titik optimum juga dipilih berdasarkan desirabilitas nilai yang diselsi oleh Design Expert Hasil pengujian menunjukkan bahwa setiap kombinasi factor suhu, pH, dan konsentrasi inokulum menghasilkan zona hambat yang berbeda, mengindikasikan adanya pengaruh kondisi optimasi terhadap produksi kandidat senyawa antibiotik oleh isolat bakteri termofilik TUA 103 yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1 Hasil optimasi suhu, pH dan agitasi untuk produksi kandidat senyawa antibiotik melalui zona hambat menggunakan *Central Composite Design* (CCD) berdasarkan analisis *Reponse Surface Method* didasarkan pada hasil zona hambat oleh isolat

Run	Suhu	pH	Inokulum	Zona Hambat (mm) ± Std. Error (<i>E.coli</i>)	Zona Hambat (mm) ± Std.Error (<i>S.aureus</i>)
1	70	6	10	7,4±1,34	6,32±0,14
2	60	7	5	7,13±0,45	6,48±0,33
3	70	8	10	8,6±2,8	6,9±0,14
4	50	8	1	6,5±0,05	6,63±0,14
5	50	6	10	6,4±0,30	6,43±0,14
6	50	6	1	6,56±0,14	6,53±0,29
7	60	7	5	7,56±1,43	6,7±0,19
8	60	7	5	7,11±1,01	6,69±0,39
9	60	6	5	7,39±1,35	8,03±1,27
10	60	7	10	7,43±0,79	8,66±1,32
11	60	7	5	6,85±0,33	6,74±0,46
12	60	7	5	7,09±0,37	6,79±0,41
13	70	8	1	6,12±0,04	7,09±0,37
14	60	7	1	6,96±0,06	7,6±0,56
15	50	8	10	6,05±0,02	6,33±0,08
16	60	7	5	6,96±0,32	6,63±0,14
17	70	7	5	7,08±1,01	7,6±0,57
18	60	8	5	8,35±0,96	6,58±0,05
19	50	7	5	6,63±0,17	6,4±0,05
20	70	6	1	7,4±1,37	7,02±0,39



a)



b)

Gambar 2. Response surface plots bentuk contour dan tiga dimensi (3D) a). zona hambat terhadap *E.coli*, b). zona hambat terhadap *S.aureus*

Respond Sufrace Methodology (RSM) adalah metodologi matematis yang melibatkan desain eksperimen statistik dan analisis regresi berganda yang sering diterapkan dalam optimasi proses fermentasi metabolit sekunder. Tujuan utama dari desain RSM adalah untuk meningkatkan banyak faktor secara bersamaan, sehingga mencapai sistem yang optimal. Hasil yang diperoleh dari design RSM adalah representasi plot kontur 2D dan plot permukaan 3D (Singh V, Haque S, 2017). Penelitian ini menggunakan metode RSM tipe *Central Composite Design* (CCD) dimana, variabel zona hambat (y) dipengaruhi oleh tiga variabel independen yaitu suhu (x1), pH (x2) dan konsentrasi inokulum (x3). Nilai variabel-variabel independen (x1, x2 dan x3) yang telah didapatkan dengan menggunakan formulasi model yang tepat menyebabkan nilai zona hambat menjadi optimal.

Response surface plots bentuk tiga dimensi (3D) pada Gambar 2a dan 2b menunjukkan adanya perbedaan warna. Titik optimum pada gambar tersebut ditunjukkan dengan warna kuning dan *desirability selsected* oleh design, yaitu suhu

60°C, pH 7, dan kondisi inokulum 10%. Mengacu pada Montgomery, (2016) dan Zhang et al. (2023), *Response surface plots* 3D mempresentasikan perkiraan tingkat variabel proses yang optimal dengan wilayah yang semakin kuning hingga merah pada permukaan respons maka nilai semakin tinggi, semakin hijau hingga biru wilayah respons menunjukkan respons semakin minimum. Pada diagram Response surface, semakin curam tren kurvanya, semakin signifikan pengaruh faktor penelitian terhadap hasil. Plot kontur merepresentasikan garis-garis yang menunjukkan nilai respons ($\hat{Y}$) dari nilai minimum hingga maksimum. Plot kontur pada gambar 1a berbentuk elips menunjukkan bahwa interaksi antar faktor penelitian, dimana terdapat efek interaksi yang signifikan dan efek kuadratik (kelengkungan) yang kuat antara Suhu dan jumlah Inokulum dalam memengaruhi respon *E. coli*, sedangkan plot kontur pada gambar 1b berbentuk linier diagonal menunjukkan Nilai respon *S. aureus* hanya naik secara konstan tanpa adanya efek kelengkungan kuadratik yang dinamis interaksi antar faktor penelitian.

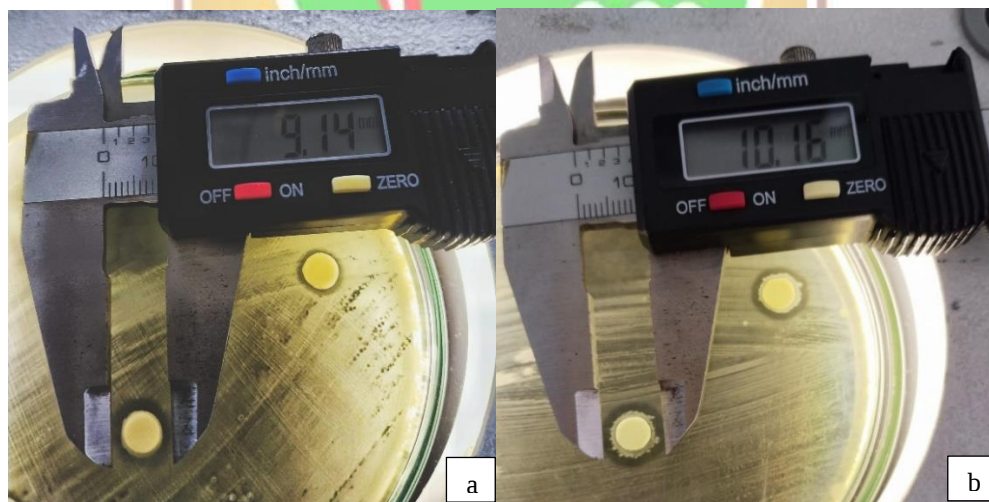
Suhu berperan penting dalam menghasilkan aktivitas biologis pada bakteri termofilik, dimana setiap jenis bakteri termofilik memiliki ambang batas minimum dan maksimum untuk tumbuh. Rafiee dan Maryam Jalili Tabaii (2024), Optimal pertumbuhan dari bakteri termofilik dalam menghasilkan antibiotik bervariasi berdasarkan strain bakteri tertentu. Pada strain *Bacillus* sp memiliki toleran suhu 60°C-75°C, strain *Saccharomonodpora* sp memiliki optimal suhu 45°C. Douglas E. Caldwell (1976), *Therrnothrix thioparus* memiliki optimal pertumbuhan pada suhu 70°C, sedangkan optimal suhu untuk genus *Thermopasma*, *Thermoactinomyces*, *Actinobifida*, dan *Pseudomonads* yaitu dibawah 70°C. Syed Aun Muhammad

(2009), bakteri termofilik strain *Bacillus* sp memiliki suhu optimum 55°C dalam menghasilkan antibiotik yang diukur melalui zona hambat terhadap *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Produksi kandidat senyawa antibiotik dihasilkan oleh isolat pada pH optimum yaitu Ph 7 dalam kategori netral. pH optimum yang dibutuhkan oleh bakteri termofilik dalam menghasilkan antibiotik memiliki variasi yang berbeda, dimana tergantung pada genus dan strain bakteri termofilik. Peteranderl R dan Shotts EB (1990), *Clostridium thermohydrosulfuricum* menghasilkan antibiotik pada pH optimum 7.3. Rafiee and Maryam Jalili Tabaii (2024), bakteri termofilik dari strain *Bacillus* sp menghasilkan antibiotik pada pH optimum yaitu 5. Sonia dkk (2004), thermotoleran bakteri strain *Bacillus licheniformis* menghasilkan antibiotik peptide pada pH optimum 3.5-8.

Konsentrasi Inokulum optimum dalam menghasilkan zona hambat terdapat pada konsentrasi 10%. Waithaka (2022), konsentrasi inokulum optimum dalam menghasilkan antibiotik yaitu 1%, dimana dihasilkan oleh genus Actinomycetes. Jami dkk (2015), memperoleh konsentrasi inokulum sebesar 2% untuk produksi optimum metabolit antibiotik, dimana konsentrasi inokulum menentukan durasi aktinomiset memasuki fase lag sebelum kultur memasuki fase log dan dengan demikian mempengaruhi produksi antibiotik (Wurch dkk, 2016). Selain itu, konsentrasi inokulum yang melebihi tingkat konsentrasi optimum menyebabkan penurunan produksi antibiotik karena nutrisi diarahkan untuk pembentukan biomassa daripada produksi metabolit (Qais dkk, 2016). Tiingkat konsentrasi inokulum berpengaruh terhadap kekeruhan medium untuk produksi metabolit.

Hasil aktivitas antibiotik melalui zona hambat dianalisis menggunakan Analysis of Variance (ANOVA). Analisis pemilihan model dilakukan berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model (*Sequential Model Sum of Squares*), pengujian ketidaktepatan model (Lack of Fit) dan ringkasan model secara statistika (Model Summary Statistics). Analisis ragam menjelaskan Model p-value ($P=0.008$ (*E.coli*) dan $P=0.04$ (*S.aureus*), $P<0.05$) sehingga signifikan terhadap respon (zona hambat). Ibtissem Djinnia et al (2018), melakukan optimasi isolat bakteri termofilik, yaitu *Streptomyces thermoviolaceus* SRC3 strain dengan menggunakan *Response Surface Methode tipe CCD*, didapatkan hasil anova yang signifikan dengan $P<0.05$, guna mengetahui kondisi optimum dalam memproduksi antibiotik streptazolin.



Gambar 3. Zona hambat isolat TUA 103 terhadap bakteri a). *E.coli*, b) *S.aureus*

2. Kondisi produksi antibiotik sebelum dan sesudah optimasi

Pengamatan kondisi produksi antibiotik dari isolat bakteri termofilik TUA-103 sebelum dan sesudah optimasi disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Kondisi produksi antibiotik isolat bakteri termofilik TUA-103 terhadap *E.coli* dan *S.aureus* sebelum dan sesudah optimasi

	Zona Hambat (mm) $\pm$ Std. Error		Peningkatan zona hambat produksi antibiotik
	Sebelum	Sesudah	
<i>E.coli</i>	6,00 $\pm$ 0,00	7,43 $\pm$ 0,79	23,64%
<i>S.aureus</i>	7,63 $\pm$ 0,46	8,66 $\pm$ 1,32	13,50%

Sebelum proses optimasi, produksi kandidat senyawa antibiotik dilakukan pada kondisi suhu 50°C, pH 6, dan konsentrasi inokulum 10%. Berdasarkan data pada Tabel 2, optimasi menggunakan metode *Response Surface Methodology* (RSM) menunjukkan adanya peningkatan produksi kandidat senyawa antibiotik pada kondisi optimum, yaitu suhu 60°C, pH 7, dan konsentrasi inokulum 10%.

Produksi kandidat senyawa antibiotik sesudah dilakukan optimasi dari isolat TUA 103 bakteri termofilik terhadap *E.coli* mengalami peningkatan yaitu sebesar 23,64%. Peningkatan tersebut membuktikan bahwa faktor suhu, pH, dan konsentrasi inokulum memberikan pengaruh terhadap kemampuan isolat dalam mensintesis senyawa antibiotik terkait sensitivitasnya terhadap patogen *E.coli*. Senyawa antibiotik yang dihasilkan isolat menandakan cukup sensitif terhadap patogen gram negatif seperti *E.coli* yang memiliki pertahanan membran sel yang lebih kompleks dibandingkan dengan patogen gram positif. Breijyehet dkk (2020), bakteri Gram negatif umumnya lebih resisten terhadap senyawa antimikroba karena mereka memiliki membran luar yang berfungsi sebagai penghalang permeabilitas, membatasi masuknya banyak agen antibakteri. Penelitian ini menghasilkan anotasi senyawa melalui PASS Online yang menghasilkan antibiotik jenis Aminoglikosida, dimana antibiotik tersebut sensitif terhadap bakteri gram negatif, termasuk *E.coli*. Lang dkk (2023), Aminoglikosida merupakan salah satu golongan antibiotik yang

mampu menembus kedua membran sel bakteri sehingga efektif digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri Gram-negatif. Aminoglikosida merupakan molekul hidrofobik berukuran kecil yang dapat berikatan dengan lipopolisakarida (LPS) pada membran luar bakteri. Ikatan tersebut terjadi melalui interaksi elektrostatik antara gugus bermuatan positif pada molekul antibiotik dengan komponen membran luar yang bermuatan negatif. Setelah berikatan dengan membran luar, aminoglikosida mampu meningkatkan permeabilitas membran sehingga dapat memasuki ruang periplasma. Mekanisme kerja utama aminoglikosida adalah menghambat sintesis protein dengan cara berikatan pada RNA ribosom 16S di dekat lokasi pengodean (decoding site) pada ribosom. Akibatnya, proses translasi protein menjadi melambat. Meskipun demikian, aminoglikosida tidak menghentikan proses translasi secara langsung, melainkan menyebabkan kesalahan translasi (mistranslation). Kesalahan translasi yang diinduksi oleh aminoglikosida diketahui cenderung terjadi secara beruntun. Setelah satu kesalahan translasi terjadi, kesalahan-kesalahan berikutnya akan muncul sehingga menyebabkan terjadinya katastrofi sintesis protein (protein synthesis catastrophe), yang berkontribusi terhadap efek letal antibiotik tersebut. Aminoglikosida menyebabkan kesalahan translasi yang menghasilkan protein salah lipat (*misfolded proteins*). Protein-protein tersebut kemudian terakumulasi pada membran sel sehingga menyebabkan kerusakan membran dan berkontribusi terhadap kematian sel bakteri. Selain itu, pembentukan spesies oksigen reaktif (*reactive oxygen species*, ROS) juga diduga berperan sebagai salah satu mekanisme yang menyebabkan kematian sel bakteri akibat paparan antibiotik aminoglikosida.

Antibiotik sesudah dilakukan optimasi dari isolat TUA 103 bakteri termofilik terhadap *S.aureus* mengalami peningkatan yaitu sebesar 13,50%, yaitu diameter zona hambat sebelum dioptimasi sebesar 7,63 mm menjadi 8,66 mm. Peningkatan zona hambat yang tidak pesat diduga karena sensitivitas alami dari gram positif *S.aureus*. Beberapa penelitian menemukan bahwa, *S.aureus* mampu menghasilkan antimicrobial inhibitor dan antibiotic inhibitor yang menyebabkan resistensi terhadap senyawa metabolit sekunder.

Menurut Bonikowska (2022), pada *Staphylococcus aureus*, telah diketahui beberapa mekanisme resistensi terhadap antibiotik β -laktam, yaitu pembentukan PBP tambahan yang disebut PBP2A (PBP2a atau PBP2'), produksi enzim β -laktamase, serta terjadinya mutasi pada gen penyandi PBP. Kortam dkk (2023), isolat bakteri termofilik berupa *Bacillus licheniformis* memiliki sensitivitas yang rendah terhadap patogen *S.aureus*, dimana zona hambat dari isolat tersebut sebesar 10 mm dan setelah dioptimasi melalui EMS (*Ethyl Methanesulfonate Muthagenesis*) sebesar 11 mm, dimana terjadi peningkatan aktivitas antibakteri sebesar 10%. Hal tersebut memiliki korelasi dengan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat TUA 103 dalam memproduksi antibiotik golongan peptida yang memiliki mekanisme kerja melalui kerusakan tingkat DNA dan terjadinya kesalahan pembacaan translasi protein sehingga sel bakteri gagal membelah, yang menyebabkan proses replikasi dan perbanyakan sel pada bakteri, terutama Gram positif menjadi lisis.

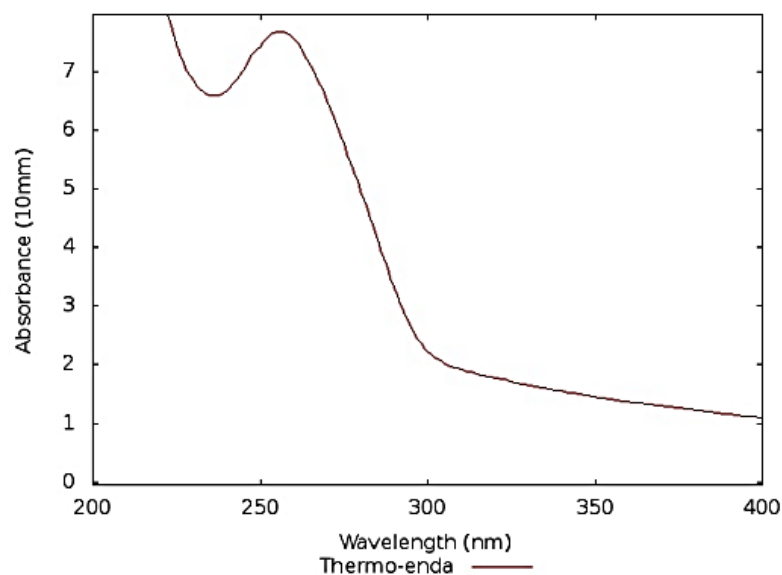
B. Identifikasi berdasarkan Analisis Sekuen Gen 16S rRNA

Identifikasi isolat TUA-103 dilakukan berdasarkan analisis sekuen gen 16S rRNA dengan melakukan isolasi DNA, amplifikasi DNA, sekuensing DNA, analisis penjajaran sekuen dan hubungan kekerabatan (filogenetik).

1. Isolasi DNA Isolat TUA 103

Tabel 3. Hasil pengukuran konsentrasi dan kemurnian DNA isolat TUA-103 menggunakan NanoDrop

No	Parameter	Hasil
1	Konsentrasi DNA	289,85 ng/ μ L
2	A260/A280	1,820



Gambar 4. Spektrum absorbansi DNA isolat TUA-103 menggunakan NanoDrop

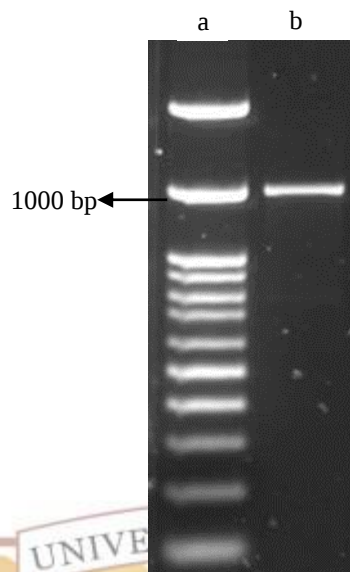
Berdasarkan tabel 3, didapatkan hasil pengukuran menggunakan NanoDrop menunjukkan konsentrasi DNA sebesar 289,85 ng/ μ L dengan rasio A260/A280 sebesar 1,820. Konsentrasi DNA dengan jumlah tersebut memadai untuk digunakan sebagai template pada amplifikasi gen 16S rRNA. Nilai rasio A260/A280 sebesar 1,820 mengindikasikan bahwa DNA yang diperoleh memiliki tingkat kemurnian yang baik dan relatif bebas dari kontaminasi protein, karena berada pada kisaran

DNA murni, yaitu sekitar 1,8. Ningsih dkk (2018), Konsentrasi DNA diukur pada panjang gelombang (λ) 260 nm, sedangkan kemurnian DNA dapat diukur pada absorbansi 260/280.

Gambar 4 diatas menunjukkan bahwa, spektrum absorbansi DNA hasil isolasi menunjukkan puncak absorbansi pada kisaran 260 nm yang menandakan karakteristik utama molekul asam nukleat. Absorbansi menurun secara bertahap hingga mencapai kisaran 400 nm, dimana pola spektrum ini menunjukkan bahwa komponen dominan dalam sampel adalah DNA, karena basa nitrogen penyusun DNA memiliki kemampuan menyerap sinar ultraviolet secara maksimal pada panjang gelombang 260 nm. Menurut Gallagher (2011), spektrum UV pada NanoDrop digunakan tidak hanya untuk menentukan konsentrasi DNA, tetapi juga untuk mengevaluasi kemurnian sampel melalui bentuk kurva absorbansi dan rasio A260/A280 serta A260/A230. DNA murni umumnya memperlihatkan puncak absorbansi yang jelas pada 260 nm dan absorbansi yang semakin menurun pada panjang gelombang di atas 280 nm hingga mendekati baseline.

2. Amplifikasi gen 16S rRNA

Hasil amplifikasi PCR pada isolat bakteri TUA 103 menggunakan primer gen 16S rRNA menunjukkan terbentuknya pita DNA berukuran sekitar 1.000 pasangan basa (bp) (Gambar 4). Produk PCR tersebut kemudian dianalisis lebih lanjut melalui sekuensing metode Sanger untuk menentukan urutan nukleotida DNA hasil amplifikasi. Identifikasi isolat bakteri moonmilk dilakukan dengan membandingkan sekuens genom hasil amplifikasi terhadap sekuens spesies yang telah tersedia dalam basis data GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).



Gambar 5. Amplifikasi gen 16S rRNA isolat TUA-103 a) marker ladder
b) Fragmen PCR isolat TUA 103

Amplifikasi isolat TUA-103 menunjukkan hasil produk PCR yang sama dengan ukuran fragmen dari target primer yang digunakan. Hal ini ditandai dengan adanya terbentuk pita pada fragmen PCR yang menghasilkan ampikon dengan ukuran 1000 bp. Pita hasil PCR yang terlihat mengindikasikan konsentrasi DNA yang dihasilkan cukup tinggi sehingga tervisualisasikan dengan jelas pada UV-transluminator. Alrumma dkk (2018), amplifikasi gen 16S rRNA *Bacillus thermocopriae* strain KKU-AS21 adanya terbentuk pita pada fragmen DNA dengan ukuran 996 bp. Ukuran pita fragmen DNA pada bakteri termofilik cukup bervariasi, hal tersebut berdasarkan jenis atau strain bakteri termofilik. Pada umumnya, panjang pita fragmen DNA pada bakteri termofilik berkisar 800-1500 bp. Komposisi basa nukleutida sangat berpengaruh terhadap panjang pita fragmen DNA yang terbentuk ketika analisis amplifikasi DNA dilakukan. DNA murni umumnya memperlihatkan puncak absorbansi yang jelas pada 260 nm dan absorbansi yang semakin menurun pada panjang gelombang di atas 280 nm hingga mendekati baseline.

3. Analisis Sekuen 16S rRNA isolat bakteri termofilik TUA-103

Analisis sekuen gen 16S rRNA isolat bakteri termofilik TUA-103 penghasil antibiotik diperoleh hasil contig data forward dan reverse sekuensing DNA dengan panjang 1433 bp sebagai berikut :

```
GCCCTTTGGGGCGGGACTATACTGGCAGTCGAGCGAAGTTGATGGAGTGCTT
GCACTCCTGATGCTTATCGCCGGACGGCTGCTAATACGTAGGTAGCCTGCCCT
TAAGACCGGGATAACTCACGGAAAATTGGGCTATTACCGGATAGGCAATTTC
CTCACATGAGGGAATCGGGAAAGGCGCAGCAATCTGCCGCTTATGGATGGAC
CTACGGCGCATTAACTACTTGGTGAGGTAACGGCTCACCACCGCGACGATGC
GTTGCCACCTGACAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAAACACGGCCCAG
ACTCCTACGAGAGGCCCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGCGGTCTGACG
GAACAACACCGCGTGAATGATGAAGGTTTTCTGATCGTAACGCTCTTTTGCCA
GGGAAGAACAGCTTTGGAGAGGTAAGTGTTCATAGGTGACGGTACCTGAGA
AGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTATGGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCATGTAAGT
CTGGTGTTTAAACCCGGGGGCTCAACTCCGGGTCGCATCGGAAACTGTGTGA
CTTGAGCTGCAGAAGAGGAAAGTGGAATTCCACGCTGTAGCGGTTGAAATGC
GTCAGAGATGTGGAGGAACACCACTGGCGAAGGCGACTTTCTGGGCTGTAAC
TGAACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTG
GTAGTCCACGGCCGTAAACGATGGAATGCTAGGTAGTATAGGGGTTTCGATA
CTCCTTGTTGCCGAAGTTAACAAGTTAAGCATTTCGCGCTGGGGGGAGTAC
GGTCGCCAAGAGTTGAAAACCTCAAACGGAATTGAACGGGTGAGCCCGCAGC
AAGCAGATGGAGTATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCCTCTGACCGTCTAGAGATAGGGCTTCCCTTCGGGGCAGAG
GTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAA
GTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCTTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCAC
TCTAGAGTGACTCCCGGAGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
TCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTAACAATGGATGGTACAA
CGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAATCTTATAAATCCAGTCTCAGTTC
GGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCAGGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCCCG
GATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCCCTACACACGGCCCGTC
ACAGGAAGAGAGTGTACAACACGGCTCTAGAGTGACTCCCGGAGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTAACAATGGATGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAG
CGAATCTTATAAATCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
GGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGTCCCCTACACACGGCCCGTCTCTAGAGTGACTCCCGGAGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTAACAATGGATGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAG
CGAATCTTATAAATCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
GGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGTCCCCTACACACGGCCCGTCTCTAGAGTGACTCCCGGAGACAAACC
GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTA
CACACGTAACAATGGATGGTACAACGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAG
CGAATCTTATAAATCCAGTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA
GGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCCCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATA
```

Urutan basa nukleotida yang didapatkan selanjutnya dibandingkan dengan sekuens DNA yang terdapat pada GenBank untuk mengetahui tingkat similaritas sekuens DNA melalui program BLAST (Basic Alignment Search Tools) pada situs NCBI (National Center for Biotechnology Information). Kemudian disejajarkan dengan 10 isolat yang dipilih dari database, dengan mempertimbangkan nilai kemiripan 98-99%, agar memiliki panjang nukleotida yang memiliki selisih normal

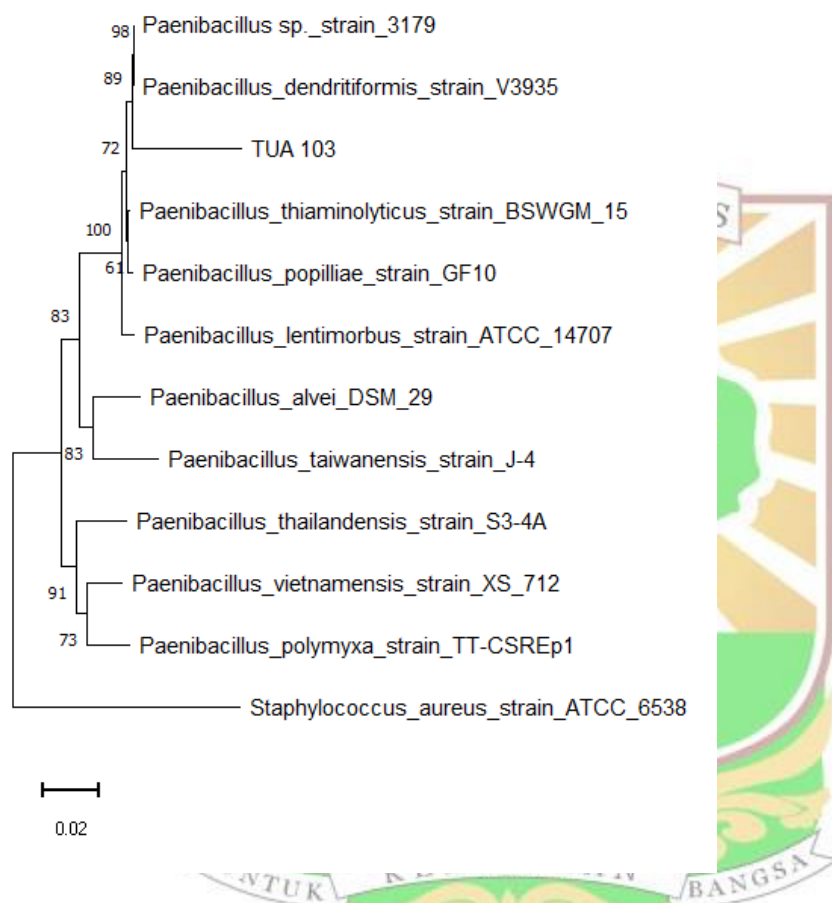
Tabel 4. Hasil analisis BLAST isolat termofilik TUA-103 dengan isolat-isolat yang terdapat di GenBank

No	Deskripsi	Max Score	Total Score	Query Score	E Value	Per. Ident	Accession
1	<i>Paenibacillus</i> sp. strain 3179 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2130	2130	98%	0.0	94.32%	MK616148.1
2	<i>Paenibacillus dendritiformis</i> strain V3935	2078	2078	96%	0.0	94.33%	OL677036.1
3	<i>Paenibacillus vietnamensis</i> strain XS 712	1742	1742	95%	0.0	90.02%	PQ344239.1
4	<i>Paenibacillus thiaminolyticus</i> strain strain_BSWGM_15	2036	2036	95%	0.0	93.87%	OQ410440.1
5	<i>Paenibacillus popilliae</i> strain strain_GF10	2021	2021	95%	0.0	93.71%	KY312804.1
6	<i>Paenibacillus lentimorbus</i> strain ATCC 14707	1951	1951	95%	0.0	92.76%	NR_114457.1
7	<i>Paenibacillus alvei</i> strain DSM 29	1834	1834	99%	0.0	90.22%	NR_042091.1

8	<i>Paenibacillus thailandensis</i> strain S34A	1810	1810	99%	0.0	89.91%	NR_041490.1
9	<i>Paenibacillus taiwanensis</i> strain J4	1783	1783	98%	0.0	98.87%	KR492891.1
10	<i>Paenibacillus polymyxa</i> strain TT CSREp1	1729	1729	95%	0.0	89.88%	PV174840.1
11	<i>Staphylococcus aureus</i> strain ATCC 6538 (Outgroup)						MT573388

Hasil BLAST sekuens nukleotida isolat bakteri termofilik TUA-103 penghasil antibiotik dengan 10 isolat yang terdapat pada GenBank menunjukkan nilai kemiripan 95% - 99%. E-value yang didapatkan bernilai 0.0 yang menunjukkan semakin signifikan penjajaran dengan hasil BLAST. Menurut Sabbathini dkk (2017), nilai 0.0 mengartikan sekuens dari isolat tidak memiliki kemungkinan lain pada penjajaran sekuens yang dilakukan. Apabila semakin tinggi nilai E-value maka tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan semakin rendahnya nilai E-value maka tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Seluruh sekuen isolat bakteri yang telah didapatkan disejajarkan dan dipotong sehingga diperoleh urutan basa. Komposisi basa penyusun gen 16S rRNA isolat bakteri termofilik TUA-103 penghasil kandidat senyawa antibiotik dengan 11 bakteri dari database BLAST yaitu rata-rata persentase T(U)= 20,3%; C= 23,1%; A= 25,3% dan G= 31,2%. Per ident yang diperoleh pada strain *Paenibacillus dendritiformis* sebesar 94,33%, hal tersebut tidak memenuhi kriteria untuk menggolongkan isolat ke dalam strain tersebut. Jika nilai kesamaan <98%, maka

isolat hanya dapat diidentifikasi hingga ke tahap genus. Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa, isolat bakteri termofilik TUA 103 hanya dimasukkan hingga ke tahap genus *Paenibacillus* tanpa menyandingkan strain yang didapatkan melalui *data base* BLAS NCBI pada analisis sequencing dengan 10 isolat monofiletik.



Gambar 6. Pohon filogenetik isolat bakteri termofilik TUA-103 berdasarkan 16S rRNA dengan analisis Neighbor Joining (NJ). Keterangan: skala 0,002 menunjukkan jarak evolusi pada panjang cabang, angka pada cabang menunjukkan nilai bootstrap 1000 (ML/NJ/MP)

Analisis filogenetik pada Gambar 6 dilakukan berdasarkan metode Neighbor Joining (NJ) dengan nilai bootstrap 1000x untuk memperkirakan tingkat kepercayaan sebuah pohon filogenetik pada software MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versi 10.2.2. Hasil analisis BLAST menunjukkan

bahwa isolat TUA-103 memiliki query cover sebesar 96% dan percent identity sebesar 94,33% terhadap *Paenibacillus dendritiformis*. Berdasarkan nilai percent identity tersebut, isolat TUA-103 hanya dapat diidentifikasi hingga tingkat genus, yaitu *Paenibacillus*. Kelompok genus *Paenibacillus* terbukti bersifat monofiletik yang didukung oleh nilai bootstrap yang kuat sebesar 72%, memisahkan seluruh ingroup secara jelas dari outgroup *Staphylococcus aureus* strain ATCC 6538. Mengacu pada laporan Syah (2022), bahwa nilai similaritas gen 16S rRNA pada bakteri $\geq 99\%$ dikelompokkan sebagai spesies yang sama dan nilai similaritas $< 98\%$ cenderung dikelompokkan ke dalam satu genus yang sama. Hal ini juga didukung oleh data p-distance antara isolat TUA-103 dengan bakteri *Paenibacillus dendritiformis* di GenBank tersebut 0,042 (Lampiran) yang menunjukkan hubungan kekerabatan yang cukup dekat. Analisis Neighbor-Joining (NJ) menjadi dasar pembuatan pohon filogenetik berdasarkan perbedaan antara dua sekuen dimana pohon filogenetik dengan nilai bootstrap tinggi setidaknya diatas 70% merupakan pohon filogenetik yang baik (Muzzazinah, 2017).

Spesies *Paenibacillus* awalnya termasuk dalam genus *Bacillus*, yang secara historis didefinisikan berdasarkan karakteristik morfologi yang sama dengan spesies tipe *Bacillus subtilis*, yang diisolasi pada tahun 1872. Nama *Paenibacillus* berasal dari kata keterangan dalam bahasa Latin *paene*, yang berarti hampir; hampir seperti *Bacillus*. *Paenibacillus* adalah salah satu dari delapan genus yang termasuk dalam famili *Paenibacillaceae*. Jumlah spesies baru yang diidentifikasi sebagai *Paenibacillus*, dan spesies yang sudah ada yang diklasifikasikan ulang sebagai spesies tersebut, terus bertambah, dan genus ini saat ini terdiri dari sekitar 200

spesies (Elliot dkk, 2016). *Paenibacillus* berbentuk batang, Gram-positif, motil, fakultatif anaerob atau aerob obligat, dan bergerak dengan menggunakan flagela peritrikhos. Sebagian besar spesies bersifat katalase positif. Koloni biasanya halus, tembus cahaya, coklat muda, putih, atau merah muda. Pertumbuhan optimum biasanya ditemukan pada pH 7,0 dalam rentang suhu 28-40°C, namun beberapa spesies bersifat alkalifilik serta asidofilik. Selain itu, pada sebagian besar spesies *Paenibacillus*, kandungan G + C berkisar antara 45 hingga 54 mol % (Patowary dan Deka, 2020).

Paenibacillus memiliki banyak prospek diberbagai bidang, salah satunya sebagai penghasil antimikroba dan antibiotik. Banyak spesies *Paenibacillus* bersaing dengan mikroorganisme lain melalui produksi berbagai senyawa antimikroba. Dalam satu studi, 25 dari 55 isolat dari air dan tanah menunjukkan spektrum penghambatan yang luas terhadap bakteri dan jamur patogen yang menunjukkan bahwa *Paenibacillus* kemungkinan besar menghasilkan antimikroba. Namun, keragaman tetap ada bahkan dalam spesies yang sama: dari 25 strain *P. polymyxa*, 15 sangat menghambat patogen oomycete *Phytophthora capsici*, sementara 10 menunjukkan efek antimikroba yang lemah atau tidak ada dan pengurutan genom mengonfirmasi keragaman kluster gen pengkode antimikroba di antara strain *P. polymyxa*.

Antimikroba yang diproduksi oleh *Paenibacillus* termasuk peptida, enzim, dan senyawa organik volatil (VOCs). Sementara peptida antimikroba sangat penting untuk pengendalian hayati dalam pertanian, peptida yang dimurnikan atau disintesis juga memiliki penggunaan yang telah direalisasikan dan potensi dalam

bidang kedokteran dan pengolahan makanan. VOCs dapat meningkatkan interaksi antara mikroorganisme yang tinggal di tanah, karena senyawa-senyawa ini berdifusi melalui pori-pori berisi udara di tanah untuk mencapai organisme yang terpisah secara fisik. Senyawanya termasuk benzena, aldehida, keton, dan alkohol, meskipun beberapa di antaranya diproduksi dalam jumlah kecil; dengan benzotiazol, benzaldehida, undecanal, dodekanal, heksadekan, 2-tridekanon, dan fenol menjadi senyawa antijamur utama. VOCs antimikroba memiliki aplikasi untuk biokontrol patogen pertanian, penyakit pasca-panen (terutama pada buah), dan jamur bangunan. (Elliot dkk, 2016).

Paenibacillus polymyxa disolasi dari kondisi ekstrem yaitu sumber air panas Uttarkashi dia India yang menghasilkan senyawa antibiotik. Senyawa tersebut diisolasi selama penyaringan keanekaragaman hayati untuk senyawa anti-infektif. Senyawa fusaricidin B menunjukkan aktivitas yang sangat kuat terhadap strain *Mycobacterium smegmatis* dalam uji difusi agar. Dalam pengujian lebih lanjut, senyawa tersebut menunjukkan aktivitas yang sangat kuat terhadap kedua strain *Mycobacterium tuberculosis* MDR-TB yang resisten terhadap banyak obat (MDR) dan strain *M. tuberculosis* non-MDR. Konsentrasi penghambatan minimum dari senyawa tersebut terhadap strain Non-MDR-TB adalah antara 0,05–1,00 µg/mL dan terhadap strain MDR-TB adalah 1–2 µg/m (Mahajan, 2016).

Penelitian dari Meng dkk (2018), *Paenibacillus alvei* strain DSM 29 menghasilkan senyawa antibiotik golongan peptide, yaitu paenialvin A–D menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri methicillin resistant *Staphalococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Loktanella*

hongkongensis, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Paenialvin A memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri Gram-positif, khususnya *Staphylococcus aureus* UST950701-005. Senyawa ini menunjukkan nilai MIC sebesar 0,8 µg/mL terhadap *S. aureus* UST950701-005

C. Profil Metabolit Sekunder Isolat TUA 103 Berdasarkan Analisis

LCMS/MS Untargeted

Karakterisasi metabolit sekunder isolat TUA-103 dilakukan menggunakan analisis LC-MS/MS untargeted. Data spektrum massa yang diperoleh dianotasi menggunakan basis data MzCloud untuk mengidentifikasi kandidat senyawa berdasarkan nilai kemiripan (assign score). Selanjutnya, prediksi aktivitas biologis masing-masing senyawa dilakukan menggunakan PASS Online sebagai pendekatan awal dalam mengevaluasi potensi bioaktivitas metabolit yang teridentifikasi.

Tabel 5. Hasil Identifikasi Metabolit Sekunder Isolat TUA 103 Menggunakan LC-MS/MS Untargeted

No	Anotasi Senyawa	Formula	Mass	Assign Score	RT	m/z	Response
1	(13E)-13-Docosenamide Golongan Senyawa Fatty acid amide	C ₂₂ H ₄₃ NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
2	6-cis-Docosenamide Golongan Senyawa: Fatty acid amide	C ₂₂ H ₄₃ NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
3	Metamifop Golongan Senyawa: aryloxyphenoxy herbicide	C ₂₃ H ₁₈ ClF N ₂ O ₄	440,09 39	100	1,67	439, 0847	677 562
4	2-Docosenamide	C ₂₂ H ₄₃ NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832

5	(1Z)-1-(1-Azepanyl)-1-hexadecen-1-ol Golongan senyawa: Alkenol	C22H43NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
6	N-Cyclohexyl-N-tetradecylacetamide Golongan senyawa: aliphatic amide	C22H43NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
7	(3S,6R,7E)-N,N,3,6-tetramethyloctadec-7-enamide Golongan senyawa: fatty acid amide	C22H43NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
8	N-[(2E)-6-Ethoxy-3-(2-ethoxyethyl)-1,3-benzothiazol-2(3H)-ylidene]-1-[(4-fluorophenyl)sulfonyl]-4-piperidinecarboxamide Golongan senyawa: Benzothiazole derivative	C25H30FN3 O5S2	535,16 11	100	4367	24,6 56	536 ,16 64
9	N-[(1Z)-1-(4-Ethoxyphenyl)-3-[(4-{[1-(4-fluorophenyl)-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl]sulfanyl}phenyl)amino]-3-oxo-1-propen-2-yl]benzamide Golongan senyawa: Benzamide	C34H28FN3 O5S	609,17 34	81,8	26,0 53	610, 1853	107 650
10	N-[(1Z)-3-[(4-{[1-(4-Ethoxyphenyl)-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl]sulfanyl}phenyl)amino]-1-(4-fluorophenyl)-3-oxo-1-propen-2-yl]benzamide Golongan senyawa: Benzamide	C34H28FN3 O5S	609,17 34	81,8	26,0 53	610, 1853	107 650

11	2,3,4-Tri-O-benzyl-6-O-[(2-methyl-2-propanyl)(diphenyl)silyl]-1-O-(2,2,2-trichloroethanimidoyl)-D-mannopyranose Golongan senyawa: Carbohydrate derivative	C ₄₅ H ₄₈ Cl ₃ NO ₆ Si	831,23 17	88,9	24,4 99	832, 2415	157 883
12	3-[2-(2-[2-[4-({[2-(2,6-dioxopiperidin-3-yl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-isoindol-4-yl]amino}methyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethoxy)ethoxy)ethoxy]-5-[[{(1S,2R)-2-fluoro-1-hydroxy-7-(methanesulfonyl)-2,3-dihydro-1H-inden-4-yl]oxy}benzonitrile Golongan senyawa: Triazole-benzonitrile derivative	C ₃₉ H ₃₈ FN ₇ O ₁₁ S	831,23 34	94,4	24,4 99	832, 2415	157 883
13	[3-(4-Chlorophenyl)-5-({2-[(4-ethoxy-4-oxobutyl)amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]acetic acid Golongan senyawa: Triazole	C ₁₈ H ₂₁ ClN ₄ O ₅ S	440,09 21	100	1,67	439, 0847	677 562
14	(2S)-N-[(2S,3R,4S)-1-Cyclohexyl-3,4-dihydroxy-6-methyl-2-heptanyl]-2-{[(2S)-1-oxo-3-phenyl-1-(1-piperidinyl)-2-propanyl]oxy}propenamide Golongan senyawa: Triazole derivative	C ₃₁ H ₅₀ N ₂ O ₅	530,37 2	83,3	21,3 39	529, 3672	361 08
15	N-Cyclododecyl-3-(2-{{3-(4-morpholinyl)propyl}amino}-4-pyridinyl)-	C ₃₂ H ₄₆ N ₆ O	530,37 33	83,3	21,3 39	529, 3672	361 08

	2,6-naphthyridin-1-amine Golongan senyawa: naphthyridine derivative						
16	N-Cyclohexyl-N-[2-(2-methyl-2-propanyl)-6-{4-[(2E)-3-phenyl-2-propen-1-yl]-1-piperazinyl}-4-pyrimidinyl]-L-prolinamide Golongan senyawa: prolinamide derivative	C32H46N6O	530,3733	83,3	21,339	529,3672	36108
17	N-{2-(4-Ethoxyphenyl)-6-[4-(4-methylbenzyl)-1-piperazinyl]-4-pyrimidinyl}-N',N'-dimethyl-N-propyl-1,3-propanediamine Golongan senyawa: pyrimidine derivative	C32H46N6O	530,3733	83,3	21,339	529,3672	36108
18	(2S,4R,6E,9R)-10-(benzyloxy)-4-{[tert-butyl-di(methyl)silyl]oxy}-1-[(2R,3S)-2,3-dimethyl-3,4-dihydro-2H-pyran-6-yl]-7,9-dimethyldec-6-en-2-ol Golongan senyawa: Polyketide	C32H54O4Si	530,3791	83,3	21,339	529,3672	36108
19	6-ethoxycholesta-2,4,6-trien-3-yl benzoate Golongan senyawa: Steroid	C36H50O3	530,376	83,3	21,339	529,3672	36108
20	5-({7-(Difluoromethyl)-5-[4-(trifluoromethyl)phenyl]pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl}ethynyl)-N-(1-hydroxy-2-methyl-2-propanyl)-2-	C27H23F5N4O4S	594,136	100	12,458	593,1292	79359

methoxybenzenesulfon
amide

Golongan senyawa:
Sulfonamide

21	(3R)-3-([(3R)-3-[[6-Deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy}decanoyl]oxy}decanoic acid Golongan senyawa: Glikolipid	C32H58O13	650,38 77	100	14,7 41	649, 3793	350 43
22	L-Seryl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucine Golongan senyawa: Oligopeptida	C33H62N6O8	670,46 29	100	21,3 05	669, 457	294 46
23	(4R,5R,8R,9R)-1-[(2R,3R)-3-([(2-Methyl-2-propanyl)(diphenyl)silyl]oxy)methyl)-2-oxiranyl]-4,5,8,9-henicosanetetrol Golongan senyawa: Terpenoid	C40H66O6Si	670,46 29	83,3	21,3 05	669, 457	294 46
24	tert-butyl {3-[(tert-butoxycarbonyl)(cyclohexyl)amino]propyl}{3-[4-[(4-[(piperidin-4-yl)amino]pyrimidin-2-yl)amino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl}carbamate Golongan senyawa: Carbamate derivative	C34H58N10O4	670,46 43	100	21,3 05	669, 457	294 46
25	8-Bromo-1-[(3aS,4R,6R,6aR)-6-[[[dianilinophosphoryl]oxy)methyl]-2,2-dimethyltetrahydro-3aH-cyclopenta[d][1,3]dioxol-4-yl]-2',3'-O-	C34H40BrN6O9P	786,17 78	100	14,1 92	785, 1712	339 85

	isopropylideneinosin ol-4-yl]-2',3'-O- isopropylideneinosin Golongan senyawa: nukleosida						
26	3,3-Dimethyl-1-{4-[6- (1-pyrrolidinyl)-3- pyridazinyl]-1- piperazinyl}-1- butanone Golongan senyawa: piperazine-pyridazine derivative	C18H29N5O	331,23 72	100	4,49 4	332, 2441	545 72
27	(2S)-2-[[[(2S)-4- Methyl-2-([[(2- methyl-2- propanyl)oxy]carbonyl]amino)pentyl]oxy}he xanoic acid Golongan senyawa: amino acid derivative	C17H33NO5	331,23 59	100	4,49 4	332, 2441	545 72
28	N-Methyl-N- octadecylacrylamide Fatty acid amide	C22H43NO	337,33 45	100	22,2 86	338, 3421	152 832
29	4-Methoxybenzyl [(2S,3S)-2-[(2S,3S)-1- fluoro-3-hydroxy-4- (1,3,4-thiadiazol-2- ylsulfanyl)-2-butanyl]- 4-oxo-3-[(1R)-1- [(trimethylsilyl)oxy]et hyl]-1- azetidiny](triphenylph osphoranylidene)acetat e Golongan senyawa: Beta lactam derivative	C42H47FN3 O6PS2Si	831,23 97	94,4	24,4 99	832, 2415	157 883

Berdasarkan tabel 5 diatas, analisis metabolit sekunder menggunakan instrumen LC-MS/MS Untargeted menghasilkan 29 senyawa yang memiliki assign score diatas 75%, menunjukkan tingkat kecocokan tinggi terhadap basis data

internal instrumen. Berdasarkan klasifikasi golongan senyawa, isolat TUA 103 dominan menghasilkan golongan amida, terutama fatty acid amide yaitu mencapai 24,14% dari seluruh senyawa metabolit. Selain golongan amida, juga teridentifikasi berbagai metabolit lain, seperti benzamide (6,90%), senyawa heterosiklik yang mengandung nitrogen (20,69%), steroid, terpenoid, poliketida, glikolipid, oligopeptida, serta beberapa turunan triazole dan sulfonamide.

Tabel 6. Hasil profil metabolit sekunder isolat TUA 103 menggunakan LC-MS/MS Untargeted

No	Metabolit	Aktivitas Biologis	Nilai Pa
1	(13E)-13-Docosenamide Golongan Senyawa: fatty acid amide	Antibacterial	0,311
		Antibacterial, ophthalmic	0,013
		Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor	0,199
		Antibiotic	0,148
		Beta lactamase inhibitor	0,127
		Antibiotic	0,094
		Glycopeptide-like	
		Antibacterial, ophthalmic	0,17
		Antiviral (Influenza)	0,657
		Yeast ribonuclease inhibitor	0,62
		Antiviral (Picornavirus)	0,622
		Antiviral (Rhinovirus)	0,528
		Antifungal	0,448
		Rhizopuspepsin inhibitor	0,354
		Antiviral (Herpesvirus 3, Human)	0,013
		Yeast ribonuclease inhibitor	0,262
2	6-cis-Docosenamide Golongan Senyawa: fatty acid amide	Anti-Helicobacter pylori	0,394
		Antibiotic	0,365
		Glycopeptide-like	

		Isopenicillin-N epimerase inhibitor	0,353
		Antibiotic	0,148
		Yeast ribonuclease inhibitor	0,62
		Antiviral (Picornavirus)	0,622
		Antiviral (Rhinovirus)	0,528
		Rhizopuspepsin inhibitor	0,354
		Antiviral (Influenza A)	0,342
3	Metamifop Golongan Senyawa: Aryloxyphenoxy herbicide	Bacterial efflux pump inhibitor	0,117
4	2-Docosenamide Golongan Senyawa: Fatty acid amide	Anti-Helicobacter pylori	0,377
		Antibacterial	0,385
		Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor	0,199
		Antibiotic	0,19
		Antibacterial, ophthalmic	0,181
		Penicillin amidase inhibitor	0,195
		Bacterial efflux pump inhibitor	0,119
		Beta lactamase	0,024
		TEM-1 inhibitor	
		Antiviral (Picornavirus)	0,576
		Yeast ribonuclease inhibitor	0,56
		Aspergillus nuclease S1 inhibitor	0,547
		Antiviral (Influenza)	0,546
		Antifungal	0,496
		Rhizopuspepsin inhibitor	0,354
5	(1Z)-1-(1-Azepanyl)-1-hexadecen-1-ol Golongan Senyawa: Alkenol	Antibiotic	0,105
		Glycopeptide-like	
		Antibiotic	0,106
		Isopenicillin-N synthase inhibitor	0,293
		Penicillin amidase inhibitor	0,234

		Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor	0,154
		Antibacterial	0,232
		Antiviral (Picornavirus)	0,649
		Antiviral (Rhinovirus)	0,599
		Yeast ribonuclease inhibitor	0,447
		Rhizopuspepsin inhibitor	0,317
		Antifungal	0,329
		Antimycobacterial	0,287
		Antiviral (Hepatitis B)	0,177
		Antifungal enhancer	0,103
6	Alkenol	Antibacterial, ophthalmic	0,196
		Anti-Helicobacter pylori	0,241
		Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor	0,087
		Penicillin amidase inhibitor	0,15
		Antibiotic	0,104
		Glycopeptide-like Inhibitor	0,150
7	(3S, 6R, 7E)-N,N,3,6-tetramethyloctadec-7-enamide Golongan Senyawa: Fatty Acid Amide	Antibiotic	0,184
		Antibacterial	0,366
		Anti-Helicobacter Pylori	0,179
		Antifungal	0,594
8	N-[(2E)-6-Ethoxy-3-(2-ethoxyethyl)-1,3-benzothiazol-2(3H)-ylidene]-1-[(4-fluorophenyl)sulfonyl]-4-piperidinecarboxamide Golongan Senyawa: benzothiazole derivative	Antiviral (Rhinovirus)	0,318
9	N-{(1Z)-1-(4-Ethoxyphenyl)-3-[(4-{[1-(4-fluorophenyl)-2,5-dioxo-3-pyrrolidinyl]sulfonyl}phenyl)amino]-3-oxo-1-propen-2-yl}benzamide Golongan Senyawa: Benzamide	Antibacterial	0,168
		Antibiotic beta Lactam-like	0,023
		Antiviral (Hepatitis)	0,138
10	N-{(1Z)-1-[4-(Benzyloxy)phenyl]-3-oxo-3-[(3-{[2-oxo-2-(1,3-thiazol-2-ylamino)ethyl]sulfonyl}phenyl)amino]-1-propen-2-yl}benzamide Golongan Senyawa: Benzamide	Antibiotic beta Lactam-like	0,019
		Antibacterial	0,256
		Anti-Helicobacter pylori	0,214

11	2,3,4-Tri-O-benzyl-6-O-[(2-methyl-2-propanyl)(diphenyl)silyl]-1-O-(2,2,2-trichloroethanimidoyl)-D-mannopyranose Golongan Senyawa: Carbohydrate derivative	Antibiotic Aminoglycoside-like Antibiotic Anthracycline-lik	0,077 0,108 0,102 0,358 0,699
12	Triazole Benzonitile	Antiviral (Hepatitis B)	0,19
13	[3-(4-Chlorophenyl)-5-({2-[(4-ethoxy-4-oxobutyl)amino]-2-oxoethyl}sulfanyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]acetic acid Golongan Senyawa: Triazole Derivative	Anti-Helicobacter pylori Antiviral	0,366 0,482 0,291
14	(2S)-N-[(2S,3R,4S)-1-Cyclohexyl-3,4-dihydroxy-6-methyl-2-heptanyl]-2-{{[(2S)-1-oxo-3-phenyl-1-(1-piperidinyl)-2-propanyl]oxy}propenamide Golongan Senyawa: Triazole derivative	Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor Antiviral (Rhinovirus)	0,065 0,421 0,237 0,158
15	N-Cyclododecyl-3-(2-{{[3-(4-morpholinyl)propyl]amino}-4-pyridinyl)-2,6-naphthyridin-1-amine Golongan Senyawa: naphthyridine derivative	Macrophage colony stimulating factor antagonist	0,092
16	N-Cyclohexyl-N-[2-(2-methyl-2-propanyl)-6-{4-[(2E)-3-phenyl-2-propen-1-yl]-1-piperazinyl}-4-pyrimidinyl]-L-prolinamide Golongan Senyawa: Prolinamide derivative	Antiviral (Hepatitis) Antiviral (Hepatitis C)	0,126 0,108
17	N-{2-(4-Ethoxyphenyl)-6-[4-(4-methylbenzyl)-1-piperazinyl]-4-pyrimidinyl}-N',N'-dimethyl-N-propyl-1,3-propanediamine Golongan Senyawa: Pyrimidine derivative	Antiviral (Rhinovirus)	0,329
19	6-ethoxycholesta-2,4,6-trien-3-yl benzoate Golongan Senyawa: Steroid	Antiviral (Rhinovirus)	0,571
21	(3R)-3-{{[(3R)-3-{{[6-Deoxy-2-O-(6-deoxy- α -L-mannopyranosyl)- α -L-mannopyranosyl]oxy}decanoyl]oxy}decanoic acid Golongan Senyawa: Glikolipid	Antibacterial Antibiotic Anthracycline-like Antibiotic Glycopeptide-like Antifungal Antiviral (Influenza) Aspergillus	0,623 0,24 0,082 0,798 0,645 0,38 0,297 0,237 0,263 0,133

22	L-Seryl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucyl-L-leucine Golongan Senyawa: Oligopeptida	Antibiotic Glycopeptide-like Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor Antibacterial Antibiotik Aspergillopepsin I inhibitor Yeast ribonuclease inhibitor Penicillopepsin inhibitor Fusarinine-C ornithinesterase inhibitor Aspergillus nuclease S1 inhibitor Rhizopuspepsin inhibitor Antiviral (Adenovirus) Candidapepsin inhibitor	0,651 0,84 0,22 0,105 0,751 0,709 0,637 0,606 0,569 0,531 0,52 0,42
23	(4R,5R,8R,9R)-1-[(2R,3R)-3-({[(2-Methyl-2-propanyl)(diphenyl)silyl]oxy}methyl)-2-oxiranyl]-4,5,8,9-henicosanetetrol Golongan Senyawa: Terpenoid	Antiviral Antiviral (HIV) Antifungal Aspergillopepsin I inhibitor	0,849 0,726 0,378 0,307
24	tert-butyl {3-[(tert-butoxycarbonyl)(cyclohexyl)amino]propyl}(3-{4-[(4-[(piperidin-4-yl)amino]pyrimidin-2-yl)amino)methyl]-1H-1,2,3-triazol-1-yl}propyl)carbamate Golongan Senyawa: Carbamate derivative	Antiviral (Influenza A) Antiviral (HIV)	0,212 0,119
25	8-Bromo-1-[(3aS,4R,6R,6aR)-6-{{[(dianilinophosphoryl)oxy]methyl}-2,2-dimethyltetrahydro-3aH-cyclopenta[d][1,3]dioxol-4-yl]-2',3'-O-isopropylideneinosine Golongan Senyawa: Nukleosida	Antiviral Antiviral (Hepatitis B)	0,324 0,236
26	3,3-Dimethyl-1-{4-[6-(1-pyrrolidinyl)-3-pyridazinyl]-1-piperazinyl}-1-butanone Golongan Senyawa: Turunan piperazine-pyridazine	Antibacterial, ophthalmic Antiviral	0,13 0,534 0,274

27	(2S)-2-([(2S)-4-Methyl-2-([(2-methyl-2-propanyl)oxy]carbonyl)amino)pentyl]oxy}hexanoic acid Golongan Senyawa: Amino acid derivative	Bacterial leucyl aminopeptidase inhibitor	0,238 0,145 0,585
		Antibiotic	0,578
		Glycopeptide-like	
		Antibiotik	0,200
28	N-Methyl-N-octadecylacrylamide Golongan Senyawa: Fatty acid amide	Anti-Helicobacter pylori	0,287
		Antibiotic	0,091
		Glycopeptide-like	
		Antiviral	0,446
		Rhinovirus	
		Antiviral (Adenovirus)	0,405
		Antiviral (CMV)	0,329
29	4-Methoxybenzyl [(2S,3S)-2-[(2S,3S)-1-fluoro-3-hydroxy-4-(1,3,4-thiadiazol-2-ylsulfanyl)-2-butanyl]-4-oxo-3-[(1R)-1-[(trimethylsilyl)oxy]ethyl]-1-azetidiny](triphenylphosphoranylidene)acetate Golongan Senyawa: β -Lactam derivative	Candidapepsin inhibitor	0,247
		Antibacterial	0,297
		Antibiotic	0,147
		Antibiotic beta	0,024
		Lactam-like	

Berdasarkan tabel 6, didapatkan 213 senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat TUA 103 menggunakan instrumen LCMS/MS Untargeted, dimana terdapat 29 senyawa metabolit sekunder yang memiliki assign score diatas 75% sehingga memiliki tingkat kepercayaan yang tinggi untuk proses anotasi metabolit. Kandidat senyawa antibiotik yang dihasilkan oleh isolat yaitu antibiotic β -Lactam-like, Antibiotic Glycopeptide-like, Antibiotic Anthracycline-like, dan Antibiotic Aminoglycoside-like. Keragaman kandidat senyawa antibiotik tersebut menunjukkan bahwa, isolat TUA 103 dapat menghasilkan berbagai mekanisme aktivitas biologis. Analisis PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) memberikan prediksi probabilitas terhadap potensi aktivitas biologis metabolit sekunder yang berhasil diidentifikasi menggunakan LC-MS/MS Untargeted, yang dinyatakan dalam bentuk nilai Pa (probability of activity). Nilai Pa yang lebih besar dari 0,50 umumnya menunjukkan bahwa suatu senyawa memiliki probabilitas yang

cukup tinggi untuk menunjukkan aktivitas biologis yang diprediksi (Abdullahi et al., 2023). Spektrum aktivitas yang diprediksi di PASS ditunjukkan dengan probabilitas aktif (P_a) dan tidak aktif (P_i). Kriteria nilai P_a dan P_i menyatakan bahwa senyawa menunjukkan aktivitas apabila $P_a > P_i$. Jika nilai $P_a > 0,7$, maka senyawa secara eksperimental cukup tinggi dan memiliki aktivitas sebagai obat. Jika nilai $0,5 < P_a < 0,7$ maka senyawa secara eksperimental relatif rendah dan kemungkinan aktivitasnya sebagai obat kecil. Namun, jika $P_a < 0,5$ maka senyawa secara eksperimental sangat kecil dan tidak menunjukkan aktivitas sebagai obat (Lagunin et al., 2018) (Basha et al., 2018). Antibiotik yang diperoleh menunjukkan senyawa secara eksperimental rendah dan kemungkinan sebagai obat kecil.

Aktivitas antibiotic β -lactam-like pada isolat TUA 103 diprediksi terdapat pada metabolit yang termasuk dalam golongan senyawa benzamide dan β -lactam derivative. Berdasarkan table 4, Antibiotik beta lactam-like berasal dari golongan senyawa benzamide memiliki nilai $P_a=0,023$ dan $P_a=0,019$. Sedangkan dari golongan senyawa beta-lactam derivative memiliki nilai $P_a=0,024$. Hal tersebut mengindikasikan bahwa antibiotic beta lactam-like memiliki probabilitas rendah dan bersifat spesifik terhadap struktur molekulnya (structure-specific) dan hanya menunjukkan potensi yang signifikan pada beberapa turunan senyawa tertentu. Gambo dkk (2023), Antibiotik β -laktam (β -lactam antibiotics) merupakan golongan antibiotik spektrum luas yang mencakup seluruh agen antibiotik yang memiliki cincin β -laktam dalam struktur molekulnya. Golongan ini meliputi turunan penisilin (penams), sefalosporin (cephems), monobaktam, dan karbapenem. Antibiotik β -laktam bersifat bakterisidal, yaitu mampu membunuh bakteri dengan cara

menghambat sintesis lapisan peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Acar dkk (2019), Benzamide derivative merupakan turunan dari senyawa benzamida yang tersusun atas cincin benzena dan gugus amida sebagai struktur intinya. Modifikasi pada struktur dasar benzamida menghasilkan berbagai turunan dengan aktivitas biologis yang beragam. Berbagai penelitian melaporkan bahwa benzamide derivative memiliki aktivitas farmakologis, seperti antibakteri, antijamur, antivirus, antikanker, antihelmintik, antikonvulsan, serta berperan sebagai inhibitor histone deacetylase (HDAC). Laila Yasein (2026), turunan β -laktam (β -lactam derivatives) merupakan subkelompok senyawa heterosiklik yang dikenal luas karena aktivitas antibakteri serta berbagai aktivitas terapeutiknya. Cincin β -laktam atau cincin azetidin-2-on merupakan amida siklik empat yang menjadi struktur dasar berbagai antibiotik yang telah digunakan secara klinis, seperti penisilin, sefalosporin, karbapenem, dan monobaktam. Struktur cincin tersebut meningkatkan reaktivitas terhadap nukleofil biologis yang bersifat elektrofilik, sehingga mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri secara efektif.

Aktivitas antibiotic Glycopeptide-like pada isolat TUA 103 diprediksi terdapat pada metabolit yang termasuk dalam golongan senyawa fatty acid amide, aliphatic amide, glicolipid, oligopeptide, dan amino acid-derivative. Berdasarkan table 4, Antibiotik glycopeptide-like berasal dari golongan senyawa fatty acid amide memiliki nilai $P_a=0,094$; $P_a=0,365$, golongan senyawa alkenol memiliki nilai $P_a=0,105$, golongan senyawa aliphatic amide memiliki nilai $P_a=0,104$, golongan senyawa glikolipid memiliki nilai $P_a=0,082$, golongan senyawa oligopeptide memiliki nilai $P_a=0,651$, dan golongan senyawa amino acid derivative memiliki

nilai $P_a=0,585$. Hal tersebut mengindikasikan bahwa antibiotic Glycopeptide-like memiliki probabilitas moderate pada golongan senyawa oligopeptide dan aminoacid derivative, dimana memiliki potensial sebagai kandidat metabolit dengan aktivitas menyerupai antibiotik glikopeptida (glycopeptide-like). Daina dkk (2016), Antibiotik glikopeptida merupakan kelompok peptida nonribosomal terglykosilasi yang memiliki struktur siklik atau polisiklik dan dikenal efektif terhadap bakteri Gram-positif. Mekanisme kerjanya adalah menghambat biosintesis dinding sel bakteri dengan mencegah proses pembentukan ikatan silang (cross-linking) pada lapisan peptidoglikan. Penghambatan tersebut terjadi melalui ikatan spesifik antara antibiotik glikopeptida dengan residu D-alanil-D-alanin (D-Ala-D-Ala) pada prekursor lipid II, sehingga sintesis dinding sel tidak dapat berlangsung secara normal dan akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri. Anvir dan Javeed (2018), Fatty acid amide pada bakteri mengacu sistem FAS tipe II yang terlibat, di mana protein yang berbeda mengatalisis setiap reaksi. Senyawa ini berfungsi sebagai bioregulator untuk lipid dan terbentuk melalui amidasi asam lemak jenuh dan tidak jenuh berantai panjang. Fatty acid amide memiliki aktivitas bioaktif yang luas terhadap strain bakteri patogen, kapang, dan khamir. Serah dkk (2007), aliphatic amide bakteri secara umum dikelompokkan menjadi dua kelompok utama. Kelompok pertama merupakan amidase yang memiliki kemiripan struktur dengan enzim dari superfamili nitrilase, sedangkan kelompok kedua termasuk dalam famili amidase signature yang secara struktural berbeda dan tidak berkerabat dengan nitrilase. Perbedaan struktur tersebut menunjukkan bahwa amidase alifatik bakteri memiliki keragaman evolusioner dan mekanisme katalitik yang berbeda dalam

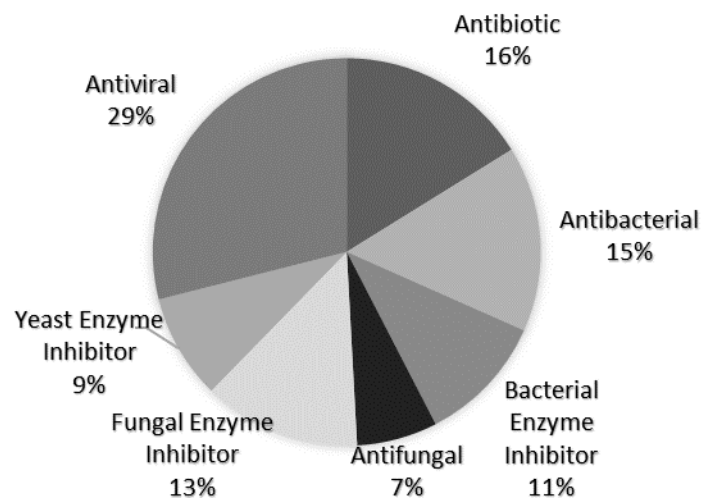
menghidrolisis senyawa amida. Ahmad M dan Abdel M (2017), glikolipid merupakan kelompok senyawa biologis dengan keragaman struktur yang tinggi dan diproduksi oleh berbagai organisme, termasuk bakteri dan fungi. Berdasarkan struktur kimianya, glikolipid mikroba diklasifikasikan ke dalam beberapa kelompok yang memiliki karakteristik gugus glikosil dan/atau gugus lipid yang berbeda. Keragaman struktur tersebut berkontribusi terhadap berbagai aktivitas biologis yang dimiliki glikolipid, di antaranya sebagai antivirus, antimikroba, antiinflamasi, dan antikanker. Ge dkk (2024), oligopeptida merupakan peptida pendek yang tersusun atas 2 hingga 20 residu asam amino. Proses pembentukan struktur melalui mekanisme self-assembly pada oligopeptida sebagian besar dipengaruhi oleh struktur primer dan struktur sekundernya. Struktur primer, yang ditentukan oleh urutan spesifik residu asam amino, menjadi dasar terbentuknya proses self-assembly. Selanjutnya, struktur sekunder, seperti α -heliks dan β -sheet, terbentuk melalui proses pelipatan (folding) serta interaksi antarrasidu asam amino. Selain itu, oligopeptida memiliki kemampuan membentuk struktur self-assembly dan secara alami memiliki sifat antimikroba, sehingga menjadi kandidat yang menjanjikan untuk pengembangan agen antimikroba dalam mengatasi infeksi mikroba.

Aktivitas antibiotic anthracycline-like pada isolat TUA 103 diprediksi terdapat pada metabolit yang termasuk dalam golongan senyawa carbohydrate derivative dan glycolipid. Berdasarkan tabel 4, Antibiotic anthracycline-like berasal dari golongan senyawa carbohydrate derivative memiliki nilai $P_a=0,108$. Sedangkan dari golongan senyawa Glycolipid memiliki nilai $P_a=0,240$. Hal tersebut

mengindikasikan bahwa antibiotic anthracycline-like memiliki probabilitas rendah dan bersifat spesifik terhadap struktur molekulnya (structure-specific) dan hanya menunjukkan potensi yang signifikan pada beberapa turunan senyawa tertentu Antibiotic Anthracycline-like yang dihasilkan. Atlee (2007), antibiotik antrasiklin (anthracycline antibiotics) beserta turunannya terdiri atas Daunorubisin (Cerubidine, daunomycin, rubidomycin) dan doksorubisin (Rubex, Adriamycin) yang pertama kali diisolasi dari bakteri *Streptomyces peucetius*. Senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antibakteri yang relatif sebanding serta diperkirakan bekerja melalui mekanisme yang sama, yaitu dengan cara berinterkalasi ke dalam heliks DNA. Proses interkalasi ini mengganggu fungsi DNA, sehingga menghambat proses replikasi dan transkripsi yang penting bagi kelangsungan hidup bakteri. Antibiotik antrasiklin memiliki tiga mekanisme biokimia utama, pertama antrasiklin berperan sebagai akseptor dan donor elektron. Senyawa ini dapat berinterkalasi ke dalam heliks DNA sehingga mengganggu berbagai fungsi DNA. Interkalasi tersebut menyebabkan terjadinya pemutusan untai tunggal maupun untai ganda DNA serta pertukaran kromatid saudara (sister chromatid exchange), yang menghambat proses transkripsi RNA dan replikasi DNA. Akibatnya, efek toksik terutama terjadi pada fase S siklus sel, sedangkan kematian sel berlangsung ketika sel memasuki fase G₂. Kedua, antibiotik antrasiklin mampu menghasilkan radikal bebas yang selanjutnya membentuk senyawa pengalkilasi yang sangat reaktif yang dapat merusak DNA. Ketiga, antibiotik antrasiklin berinteraksi dengan membran sel sehingga memicu pembentukan peroksida lipid. Senyawa peroksida tersebut

mengubah fungsi membran sel dan pada akhirnya mengganggu fungsi sel secara keseluruhan.

Aktivitas antibiotic aminoglycoside-like pada isolat TUA 103 diprediksi terdapat pada metabolit yang termasuk dalam golongan senyawa carbohydrate derivative dan polycetide. Berdasarkan tabel 4, Antibiotic anthracycline-like berasal dari golongan senyawa carbohydrate derivative memiliki nilai $P_a=0,077$. Sedangkan dari golongan senyawa Polycetide memiliki nilai $P_a=0,073$. Hal tersebut mengindikasikan bahwa antibiotic anthracycline-like memiliki probabilitas rendah dan bersifat spesifik terhadap struktur molekulnya (structure-specific) dan hanya menunjukkan potensi yang signifikan pada beberapa turunan senyawa tertentu. Michael dkk (2023), aminoglikosida (aminoglycosides, AGs) merupakan salah satu golongan antibiotik yang pertama kali ditemukan pada pertengahan tahun 1940-an dan hingga saat ini masih digunakan secara luas untuk pengobatan infeksi bakteri yang berat. Streptomisin, sebagai antibiotik aminoglikosida pertama, awalnya dikembangkan sebagai agen antituberkulosis. Seiring perkembangan penelitian, berbagai antibiotik aminoglikosida lainnya berhasil diidentifikasi, termasuk tiga senyawa yang hingga kini masih banyak digunakan dalam praktik klinis, yaitu gentamisin (1963), tobramisin (1967), dan amikasin. Aktivitas bakterisidal yang kuat dari antibiotik aminoglikosida disebabkan oleh kemampuannya berikatan secara spesifik dengan subunit ribosom 30S bakteri, sehingga menghambat sintesis protein intraseluler yang esensial bagi pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri.



Gambar 7. Distribusi aktivitas biologis metabolit sekunder isolat TUA 103 berdasarkan hasil PASS WayToDrug

Berdasarkan gambar 7, persentase aktivitas biologis yang dihasilkan oleh isolat TUA 103 yaitu antibiotik 16%, antibakterial 15%, bacterial enzyme inhibitor 11%, antifungal 7%, fungal enzyme inhibitor 13%, yeast enzyme inhibitor 9%, dan antiviral 29%. Hal tersebut menunjukkan bahwa isolat TUA 103 menghasilkan senyawa bioaktif yang relevan sebagai kandidat antibiotik. Penelitian oleh Kortam dkk (2023), Isolat yang diisolasi dari perairan sumber air panas diketahui memiliki potensi yang lebih besar dalam memproduksi antibiotik. Penelitian tersebut mengelompokkan seluruh isolat ke dalam 35 profil produksi antibiotik, yang terdiri atas 24 profil dari perairan sumber air panas dan 11 profil dari tanah yang dipengaruhi oleh air panas serta salinitas. Penelitian oleh Fandi dan Tawaha (2024), potensi bioaktif strain *Bacillus* termofilik yang diisolasi dari sumber air panas di Yordania melalui pendekatan komprehensif dalam analisis metabolit. Atlee (2007), antibiotik antrasiklin (anthracycline antibiotics) beserta turunannya terdiri atas Daunorubisin (Cerubidine, daunomycin, rubidomycin).