

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ALKALOID FUNGI  
SEDIMENT MANGROVE SERTA UJI AKTIVITASNYA TERHADAP  
*Staphylococcus aureus* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

**(Skripsi)**

**Oleh**

**REYZKA AULIA WIHARDINI  
NPM 1817011007**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## **ABSTRAK**

### **ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ALKALOID FUNGI SEDIMEN MANGROVE SERTA UJI AKTIVITASNYA TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

**Oleh**

**REYZKA AULIA WIHARDINI**

Resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi permasalahan global dan menimbulkan kebutuhan mendesak untuk mencari senyawa metabolit baru dari bahan alam. Ekosistem mangrove memiliki karakteristik lingkungan yang unik sehingga mikroba yang mampu bertahan dalam kondisi tersebut memiliki bioaktivitas salah satunya sebagai antibakteri. Pada penelitian ini sedimen mangrove diambil secara acak di kawasan ekowisata hutan mangrove Gebang Petengoran Kabupaten Pesawaran dengan titik koordinat -5.570759°LS 105.240765°BT, dan kawasan pantai Dewi Mandapa dengan titik koordinat -5.571883°LS 105.243494°BT. Hasil isolasi diperoleh empat isolat fungi yang difermentasi menggunakan media beras padat. Isolat terpilih RSM1 dengan indikasi genus *Rhizidium*, ekstrak hasil ko-kultivasi menunjukkan nilai % inhibisi sebesar 21.2% terhadap *Staphylococcus aureus* dan 26.8% terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Analisis FTIR menunjukkan adanya serapan pada bilangan gelombang 1371.7 cm<sup>-1</sup> menunjukkan serapan gugus C-N yang merupakan gugus fungsi senyawa alkaloid. Serapan pada bilangan gelombang 1744,4 cm<sup>-1</sup> dan 2922.2 cm<sup>-1</sup> menunjukkan adanya serapan C=O dan C-C alifatik. Analisis LC-MS senyawa fraksi RSM1 diperoleh komponen alkaloid berupa *best peak* dengan m/z 365 dengan formula molekul C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>N<sub>8</sub>O hasil analisis mengindikasi struktur alkaloid dengan kerangka dasar *triazine*.

**Kata kunci :** Sedimen mangrove, fungi, antibakteri, alkaloid.

## **ABSTRACT**

### **ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN ALKALOID COMPOUND FUNGI SEDIMENT MANGROVE AND THE ACTIVITY AGAINST *Staphylococcus aureus* AND *Pseudomonas aeruginosa***

**By**

**REYZKA AULIA WIHARDINI**

Bacterial resistance to antibiotics is a global problem and creates an urgent need to look for new metabolites from natural ingredients. Mangrove ecosystems have unique environmental characteristics so that microbes that are able to survive in these conditions have bioactivity, one of which is antibacterial. In this study, mangrove sediments were taken randomly in the ecotourism area of the Gebang Petengoran mangrove forest, Pesawaran Regency with the coordinates of -5.570759°S 105.240765°E, and the Dewi Mandapa beach area with the coordinates of -5.571883°S 105.243494°E. The results of the isolation obtained four isolates of fungi that were fermented using solid rice media. The selected isolate RSM1 with an indication of the genus *Rhizidium*, the extract from the co-cultivation method an inhibition value of 21.2% against *Staphylococcus aureus* and 26.8% against *Pseudomonas aeruginosa*. FT-IR analysis showed an absorption at wave number of 1371.7 cm<sup>-1</sup> indicating the absorption of the C-N group which is a functional group of alkaloid compounds. Absorption at wave numbers 1744.4 cm<sup>-1</sup> and 2922.2 cm<sup>-1</sup> indicates aliphatic C=O and C-C absorption. LC-MS analysis of RSM1 fraction compounds obtained alkaloid components in the form of the best peak with m/z 365 with the molecular formula C<sub>17</sub>H<sub>33</sub>N<sub>8</sub>O. The results of the analysis indicated the structure of the alkaloids with base structure of triazine.

**Key words :** Mangrove sediment, fungi, antibacterial, alkaloid.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA ALKALOID FUNGI  
SEDIMENT MANGROVE SERTA UJI AKTIVITASNYA TERHADAP  
*Staphylococcus aureus* DAN *Pseudomonas aeruginosa***

Oleh

**Reyzka Aulia Wihardini**

**Skripsi**

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar  
**SARJANA SAINS**

Pada

Jurusan Kimia  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

Judul Skripsi

: ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA  
ALKALOID FUNGI SEDIMENT MANGROVE SERTA  
UJI AKTIVITASNYA TERHADAP *Staphylococcus aureus*  
DAN *Pseudomonas aeruginosa*

Nama Mahasiswa

: Reyeka Aulia Wihardini

Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011007

Jurusan

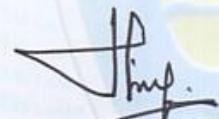
: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI,

1. Komisi Pembimbing

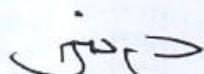


Syaiful Bahri, M.Si.  
NIP 19730825 200003 1 001



Andi Setiawan, Ph.D.  
NIP 19580922 198811 1 001

2. Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Universitas Lampung



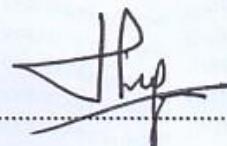
Mulyono, Ph.D.  
NIP 19740611 200003 1 002

**MENGESAHKAN**

1. Tim Pengaji

Ketua

: Syaiful Bahri, M.Si.



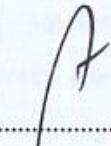
Sekretaris

: Andi Setiawan, Ph.D.



Pengaji

Bukan Pembimbing : Dra. Aspita Laila, M.S.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Suripio Dwi Yuwono, S.Si., M.T.

NIP 19740705 200003 1 001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 02 Agustus 2022

**SURAT PERNYATAAN  
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Reyzka Aulia Wihardini  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1817011007  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul "**Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Fungi Sedimen Mangrove serta Uji Aktivitasnya Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa***" adalah benar hasil karya saya sendiri, baik ide, hasil penelitian, maupun analisisnya.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 10 Agustus 2022

Yang menyatakan,



Reyzka Aulia Wihardini  
NPM1817011007

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis bernama Reyzka Aulia Wihardini, lahir di Gedong Tataan, 22 Oktober 2000. Penulis merupakan putri dari pasangan Bapak Basuki Rahmat dan Ibu Juneni. Penulis merupakan anak pertama dari dua bersaudara. Penulis menempuh pendidikan di TK Way Berulu, SDN 20 Gedong Tataan, SMPN 1 Pesawaran, dan sekolah menengah atas di SMAN 1 Gedong Tataan. Penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN) pada tahun 2018.

Penulis mengikuti berbagai organisasi selama di perguruan tinggi, baik himpunan mahasiswa jurusan kimia (HIMAKI) kepengurusan tahun 2018 sebagai pengurus muda hingga kepengurusan 2019 sebagai pengurus inti. Selama kepengurusan penulis aktif mengikuti kegiatan yang diadakan himpunan baik tingkat jurusan hingga tingkat nasional dan berperan sebagai anggota Biro Usaha Mandiri, penulis juga mengikuti organisasi fakultas yaitu ROIS FMIPA Unila pada tahun 2018 hingga 2019 sebagai anggota Biro Kemuslimahan. Selama mengikuti organisasi fakultas penulis mengikuti berbagai kegiatan yang diadakan.

Pada tahun 2021, penulis mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) Putra Daerah di Desa Kebagusan, Kecamatan Gedong Tataan, Kabupaten Pesawaran. Penulis menyelesaikan Praktek Kerja Lapangan di UPT-LTSIT Universitas Lampung dengan Judul “Skrining Bioaktivitas Antibakteri Mikroba Sedimen Mangrove Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” dan dilanjutkan hingga ke penulisan laporan akhir atau skripsi. Penulis menyelesaikan penelitian skripsi yang berjudul “Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Fungi Sedimen Mangrove serta Uji Aktivitasnya Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*” di UPT-LTSIT Universitas Lampung.

## **MOTTO**

"Takdir Allah itu mengikuti prasangka hambanya, bismillah yakin pasti bisa"  
(penulis)

"Andai saja kamu tahu bagaimana Allah mengatur urusan-urusanmu,  
hatimu akan luluh karena begitu mencintaiNya."  
(Imam Syafi)

"Berdoalah kepada-Ku, niscaya akan kuperkenankan bagimu."  
(QS. Al-Mu'min: 60)

"Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan"  
(QS. Al Insyirah: 6)

Nikmati prosesnya dan ikuti alur ceritaNya.  
(anonim)

"Keberhasilan bukanlah milik orang yang pintar, keberhasilan adalah milik  
mereka yang senantiasa berusaha"  
(B.J. Habibie)

## **PERSEMBAHAN**



Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang

Dengan mengucap *Alhamdulillahi robbil 'alamin* atas ridho Allah dengan segala rasa syukur kupersembahkan karya kecil ini kepada:

### **Keluargaku tercinta**

Mamah, Papah, Adik, dan keluargaku yang selalu mendoakan, mendukung, dan percaya kepada anaknya.

Dengan rasa hormat kepada:

**Bapak Syaiful Bahri, M.Si., Bapak Andi Setiawan, Ph.D.,  
Ibu Dra. Aspita Laila M.S., dan Bapak Dr. Eng. Heri Satria M.Si., serta  
seluruh dosen Kimia FMIPA Unila yang telah membimbing dan memberikan ilmu  
serta nasehatnya hingga penulis mencapai gelar sarjana.**

Sahabat-sahabatku dan semua orang baik yang telah mendoakan dan memberikan semangat.

Almamater Universitas Lampung.

Dan untuk diriku sendiri yang telah semangat berjuang.

## SANWACANA

*Alhamdulillahi robbil 'alamin* segala puji bagi Allah *subhanahu wa ta'ala* atas segala nikmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan judul "**Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid Fungi Sedimen Mangrove serta Uji Aktivitasnya Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa***". Sholawat serta salam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad *Shalallahu 'alaihi wassalam*, serta kepada keluarga dan para sahabatnya.

Skripsi ini dapat terselesaikan tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari banyak pihak. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Kedua orang tua dan keluarga penulis, yang telah mendoakan dan mensupport penulis untuk dapat menyelesaikan penelitian ini.
2. Bapak Syaiful Bahri, M.Si., selaku Dosen Pembimbing I saya yang telah membimbing, menasehati, dan selalu memotivasi saya dalam menyelesaikan penelitian ini.
3. Bapak Andi Setiawan, Ph.D selaku Dosen Pembimbing II saya, yang telah memberikan banyak arahan dan nasehat selama menyelesaikan penelitian skripsi ini.
4. Ibu Dra. Aspita Laila M.S. selaku dosen pembahas saya, yang telah memberikan banyak masukan hingga terselesaiannya skripsi ini.
5. Bapak Dr. Eng. Heri Satria M.Si., selaku dosen Pembimbing Akademik saya, yang selalu mendukung proses penelitian ini.
6. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, yang telah memberikan arahan selama perkuliahan.

7. Teman-teman perjuangan “Syaiful Bahri *Research*” yang telah memberikan banyak motivasi dan tempat berkeluh-kesah penulis selama menyelesaikan penelitian ini
8. Kakak-kakak peneliti di UPT LTSIT Universitas lampung yang telah mengajarkan saya banyak hal di laboratorium, tentang penelitian maupun pelajaran kehidupan.
9. Teman-teman seperjuangan pejuang S.Si-ku yang selalu memberikan do'a, dukungan dan semangat kepada penulis.
10. Dan sahabat-sahabatku yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu yang selalu memberikan semangat kepada penulis.

Penulis menyadari terdapat kekurangan dari laporan akhir ini baik dalam isi maupun cara penyajian. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca. Aamiin.

Bandar lampung, Agustus 2022

Penulis

## DAFTAR ISI

	halaman
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>iv</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>v</b>
<b>I. PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	3
1.3. Manfaat Penelitian .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
2.1. Ekosistem Mangrove .....	4
2.2. Sedimen Mangrove .....	5
2.3. Fungi Sedimen Mangrove.....	6
2.4. Identifikasi Mikroskopis Fungi Sedimen Mangrove .....	7
2.5. Potensi Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Sedimen Mangrove .....	9
2.6. Alkaloid.....	10
2.7. Alkaloid Fungi Sedimen Mangrove.....	11
2.8. Metode Isolasi dan Ekstraksi .....	12
2.8.1. Kultivasi dan Ko-kultivasi.....	12
2.8.2. Maserasi .....	13
2.9. Bakteri Uji.....	14
2.9.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	14
2.9.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	15
2.10. Skrining Bioaktivitas Antibakteri.....	16
2.11. Metode Pemisahan.....	16
2.11.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	16

2.11.2. Kromatografi Kolom .....	17
2.11.3. <i>Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)</i> .....	18
2.12. Karakterisasi senyawa .....	18
2.12.1. <i>Mass Spectroscopy (MS)</i> .....	18
2.12.2. <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)</i> .....	19
<b>III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>20</b>
3.1. Waktu dan Tempat.....	20
3.2. Alat dan Bahan.....	20
3.3. Prosedur Penelitian .....	21
3.3.1. Sampling Material .....	21
3.3.2. Isolasi Mikroba Sedimen Mangrove.....	21
3.3.3. Pemurnian Mikroba Endofit .....	21
3.3.4. Identifikasi Mikroskopis Menggunakan Metode <i>Slide Culture</i> .....	22
3.3.5. Kultivasi dan Ko-kultivasi Fungi Sedimen Mangrove .....	22
3.3.6. Ekstraksi Senyawa dari Fungi Sedimen Mangrove .....	23
3.3.7. Analisis Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis .....	23
3.3.8. Uji Skrining bioaktivitas .....	23
3.3.9. Ko-kultivasi ( <i>Scaling up</i> ).....	24
3.3.10. Ekstraksi ( <i>Scaling up</i> ).....	25
3.3.11. Fraksinasi menggunakan metode kromatografi .....	25
3.3.12. Karakterisasi Senyawa.....	26
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>27</b>
4.1. Sedimen Mangrove .....	27
4.2. Isolasi Mikroba Sedimen Mangrove .....	28
4.3. Identifikasi Mikroba Secara Mikroskopis.....	30
4.4. Kultivasi dan ko-kultivasi .....	31
4.4.1. Kultivasi.....	31
4.4.2. Ko-kultivasi .....	33
4.5. Skrining Bioaktivitas Antibakteri .....	35
4.5.1. Skrining Bioaktivitas Ekstrak Kultivasi .....	35
4.5.2. Skrining Bioaktivitas Ekstrak Ko-Kultivasi .....	36

4.6. Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	37
4.7. Ko-kultivasi dan Ekstraksi ( <i>scaling up</i> ).....	40
4.8. Pemurnian Senyawa Alkaloid dari Ekstrak RSM1 .....	40
4.8.1. Kromatografi Kolom RSM1 .....	40
4.8.2. Pemurnian menggunakan metode <i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i> (MPLC) .....	42
4.9. Karakterisasi senyawa alkaloid fraksi isolat RSM1.....	44
4.9.1. Karakterisasi menggunakan <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i> (LCMS) .....	44
4.9.2. Karakterisasi menggunakan <i>Fourier Transform Infrared Spectrometer</i> (FTIR).....	47
<b>V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>49</b>
5.1. Kesimpulan .....	49
5.2. Saran .....	49
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>50</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>57</b>

## **DAFTAR TABEL**

Tabel	halaman
1. Hasil isolasi mikroba sedimen mangrove .....	29
2. Indikasi genus isolat fungi sedimen mangrove .....	30
3. Nilai Rf ekstrak kasar isolat fungi hasil kultivasi dibawah sinar UV 254 nm, pereaksi serum sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ), dan pereaksi <i>Dragendorff</i> .....	38
4. Nilai Rf ekstrak kasar isolat fungi hasil ko-kultivasi dibawah sinar UV 254 nm, pereaksi serum sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ), dan pereaksi <i>Dragendorff</i> .....	39
5. Analisis puncak TIC senyawa alkaloid fraksi isolat RSM1.....	44

## **DAFTAR GAMBAR**

Gambar	halaman
1. Ekosistem mangrove .....	4
2. Mikroskopis fungi Chytridiomycota (Hasset <i>et al.</i> , 2017).....	8
3. Ciri Mikroskopis fungi (a) <i>Aspergillus</i> , (b) <i>Penicillium</i> .....	8
4. Struktur dasar alkaloid .....	11
5. Kerangka dasar 1,3,5-triazine .....	11
6. Reduksi resazurin menjadi resorufin.....	16
7. Lokasi sampling material sedimen mangrove.....	27
8. Karakteristik sedimen (a) titik koordinat A, (b) titik koordinat B .....	28
9. Isolat mikroba sedimen mangrove (a) koloni campuran, (b) koloni tunggal....	28
10. Identifikasi mikroskopis (a)RSM1; (b)RSM2; (c)RSM3; dan (d)RSM4.....	30
11. Fungi yang ditumbuhkan pada media <i>Nutrient Broth</i> (a) 0 hari (b) 7 hari. ...	31
12. Kultivasi (a)RSM1 (b)RSM2 (c)RSM3 (d)RSM4 pada media beras padat....	32
13. Ekstrak kasar kultivasi (a)RSM1, (b)RSM2, (c)RSM3, dan (d)RSM4 .....	33
14. Ko-kultivasi (a)RSM1 (b)RSM2 (c)RSM3 (d)RSM4 pada media beras padat .....	34

15. Ekstrak kasar ko-kultivasi (a)RSM1, (b)RSM2, (c)RSM3, dan (d)RSM4 .....	34
16. Grafik skrining antibakteri <i>crude</i> ekstrak hasil kultivasi terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>P. aeruginosa</i> .....	35
17. Grafik skrining antibakteri <i>crude</i> ekstrak hasil ko-kultivasi terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>P. aeruginosa</i> .....	36
18. Hasil KLT ekstrak kasar hasil kultivasi (a) UV 254 nm, (b) reagen serum sulfat, dan (c) reagen <i>Dragendorff</i> .....	37
19. Hasil KLT ekstrak kasar hasil ko-kultivasi (a) UV 254 nm, (b) reagen serum sulfat, dan (c) reagen <i>Dragendorff</i> .....	38
20. Hasil uji KLT RSM1 menggunakan beberapa gradien pelarut (a) n-Heksana 100%, dan (b) n-Heksana:etil asetat (1:1).....	40
21. Fraksinasi menggunakan kromatografi kolom.....	41
22. Kromatogram KLT hasil kolom RSM1 (a) UV 254 nm, (b) reagen serum sulfat, dan (c) reagen <i>Dragendorff</i> .....	41
23. Kromatogram MPLC .....	42
24. Hasil KLT fraksi 4 dan 5 isolat RSM1 (a) UV 254 nm, (b) reagen serum sulfat, dan (c) reagen <i>Dragendorff</i> Rf 0.6 .....	43
25. <i>Total Ion Chromatogram</i> (TIC) fraksi isolat RSM1 .....	44
26. Kromatogram LC-MS fraksi isolat RSM1 pada waktu retensi 9.85 menit....	46
27. Perkiraan struktur senyawa alkaloid fraksi RSM1 .....	46
28. Struktur dasar <i>triazine</i> .....	47
29. Spektrum IR fraksi isolat RSM1 .....	47

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

*Bacterial resistance* atau resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi masalah utama kesehatan global selama satu dekade terakhir. Pada tahun 2050 diperkirakan akan ada sekitar 10 juta orang terancam meninggal disebabkan oleh resistensi mikroba (O'Neill, 2016). WHO dalam laporannya yang berjudul *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*, melaporkan bahwa Asia Tenggara memiliki angka tertinggi dalam kasus kejadian resistensi mikroba (WHO, 2017), juga dalam sebuah laporan dan profil kesehatan Indonesia tahun 2018, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melaporkan tingginya angka kejadian kasus infeksi di Indonesia sebanyak 1.249.958 kasus (Hardhana *et al.*, 2018). Mikroba resisten yang termasuk ke dalam golongan bakteri ‘ESKAPE’ yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* menjadi penyebab utama kasus infeksi, serta meningkatnya masalah resistensi terhadap antibiotik (Pendleton, *et al.*, 2013).

Meningkatnya resistensi mikroba terhadap berbagai antibiotik menimbulkan kebutuhan mendesak untuk mencari sumber senyawa baru potensial sebagai antimikroba. Berbagai upaya dilakukan untuk mencari senyawa metabolit dalam pengembangan obat baru melawan mikroorganisme patogen yang resisten terhadap banyak obat. Pencarian senyawa baru diarahkan pada tanaman yang tumbuh di lingkungan yang unik atau lokasi yang menarik karena diharapkan berpotensi dapat menghasilkan senyawa metabolit baru. Sekitar 40% -50% obat yang sekarang ada di dunia mulai diformulasikan dari produk alami, termasuk mikroorganisme laut seperti mikroorganisme yang berasosiasi dengan lingkungan mangrove (Strobel and Daisy, 2003).

Ekosistem mangrove tersebar luas di daerah tropis dan subtropis pada garis pantai, ekosistem laut ini menarik perhatian peneliti karena ekosistemnya yang ekstrem dan khas dengan karakteristik lingkungan berupa kelembaban tinggi, berlumpur atau tanah berpasir, dan salinitas tinggi membuat populasi mikroba yang mampu bertahan dalam kondisi tersebut menjadi sangat berpotensi menjadi sumber produk alami bioaktif baru yang kaya secara struktural (Carroll *et al.*, 2019). Namun sebagian besar senyawa metabolit tersebut diperoleh dari endofit tanaman mangrove, sedangkan jumlah penelitian tentang keanekaragaman kimiawi mikroba yang berasal dari sedimen mangrove lebih sedikit.

Sedimen mangrove berperan dalam mendukung pembentukan lingkungan mikro aerobik dan anaerobik, sehingga keanekaragaman komunitas mikroorganisme di dalam sedimen sangat tinggi (Bissett, *et al.*, 2007). Secara khusus, fungi yang berasal dari sedimen mangrove berperan penting dalam degradasi bahan organik yang berasal dari tumbuhan mangrove sehingga menjadikan tumbuhan mangrove tumbuh subur, mikroba fungi juga telah terbukti menjadi sumber produk alami yang aktif secara biologis (Gofar, 2013). Fungi laut telah dianggap sebagai sumber senyawa bioaktif dan berperan penting dalam penemuan senyawa bioaktif baru yang potensial sebagai antimikroba (Choudhary, *et al.*, 2017).

Senyawa baru yang dihasilkan dari mikroba yang berasosiasi dengan ekosistem mangrove sangat menarik perhatian dan terdapat lebih dari 100 senyawa baru telah berhasil ditemukan setiap tahun (Carroll, *et al.*, 2019). Senyawa alkaloid termasuk kelompok molekul metabolit sekunder fungi yang memiliki keunikan secara struktural sehingga berpotensi sebagai senyawa bioaktif terutama antimikroba, yang keberadaannya tersebar luas di alam dan banyak juga ditemukan dalam biota laut. Salah satunya, fungi yang diisolasi dari sedimen mangrove diketahui mengandung senyawa alkaloid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.

Berdasarkan uraian di atas, penelitian ini telah dilakukan isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid fungi sedimen mangrove yang berpotensi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri tersebut dipilih

karena termasuk bakteri resisten yang menjadi prioritas secara global untuk ditemukannya sumber antibiotik baru.

### **1.2. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Memperoleh isolat fungi dari sedimen mangrove,
2. Mengetahui aktivitas antibakteri senyawa alkaloid fungi dari sedimen mangrove terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, dan
3. Melakukan karakterisasi senyawa alkaloid fungi sedimen mangrove.

### **1.3. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan dalam bidang kesehatan, dan kemajuan di bidang kimia organik bahan alam mengenai karakterisasi senyawa alkaloid fungi sedimen mangrove yang diisolasi dari kawasan pesisir pantai Pesawaran, Lampung serta potensinya terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Ekosistem Mangrove

Ekosistem mangrove merupakan ekosistem hutan yang terletak di antara daratan dan lautan (**Gambar 1**). Ekosistem mangrove global tersebar di Asia (42%), Afrika (20%), Amerika Utara dan Tengah (15%), Oceania (12%) dan Amerika Selatan (11%) (Giri *et al.*, 2011), di wilayah Asia Selatan dan Tenggara sendiri diketahui mencakup hingga 41,4% dari ekosistem mangrove global (Singh, *et al.*, 2014) dan mencakup sekitar 60% -75% garis pantai tropis dan subtropis. Kurang lebih seperempat garis pantai dunia didominasi oleh mangrove yang tersebar di 112 negara dan wilayah yang terdiri dari total area sekitar 181.000 km<sup>2</sup>.



**Gambar 1.** Ekosistem mangrove

Terdapat 70 spesies spesies mangrove yang termasuk ke dalam 17 famili yang berbeda. Famili mangrove terbesar, yaitu Rhizophoraceae, terdiri dari empat genus mangrove: *Bruguiera*, *Ceriops*, *Kandelia*, dan *Rhizophora* (Tomlinson, 2016). Dari genus tersebut, genus *Rhizophora* merupakan genus mangrove yang persebaran terluas dan banyak ditemukan tumbuh di daerah pesisir tropis dan subtropis, dan sebagian besar dikaitkan dengan garis lintang antara 30°N dan

30°S, dari spesies bakau tersebut telah banyak dilaporkan senyawa hasil ekstraksi dari tanaman ini menunjukkan aktivitas antimikroba (Patra and Mohanta, 2014).

Ekosistem mangrove memiliki fungsi sebagai penyeimbang ekosistem laut dan penyedia berbagai kebutuhan yang penting bagi kelangsungan makhluk hidup. Kata mangrove mempunyai arti sebagai komunitas tumbuhan di pesisir pantai yang hidup dengan kondisi lingkungan yang ekstrem karena salinitas air, arus pasang surut yang relatif tinggi, angin kencang, suhu rata-rata tinggi dan tanah anaerob berlumpur atau berpasir (Wu *et al.*, 2008). Kondisi tersebut membuat populasi tanaman secara spesifik yang mampu bertahan hidup dalam kondisi tersebut yaitu tanaman mangrove (Kathiresan and Bingham, 2001). Mikroorganisme yang berasosiasi dengan mangrove dapat mentolerir beberapa fluktuasi kondisi fisikokimia, terutama lingkungan salinitas sedang.

Sekitar 80% dari seluruh biomassa hidup di lingkungan mangrove didominasi oleh bakteri dan 20% berupa fungi, protozoa, dan mikroalga (Alongi, 2005). Mikroba yang hidup dalam ekosistem mangrove terutama fungi memainkan peran penting dalam ekosistem laut. Kondisi lingkungan yang bervariasi dalam ekosistem mangrove membuat mikroba yang hidup di dalamnya harus mampu beradaptasi dengan perubahan lingkungan yang cukup intens termasuk oksigen, keterbatasan nutrisi, pasang surut air laut, suhu dan cahaya yang tinggi menyebabkan adaptasi tumbuhan mangrove dalam jalur metabolisme mengarah pada biosintesis metabolit bioaktif yang unik secara struktural (Thatoi, *et al.*, 2013).

## 2.2. Sedimen Mangrove

Sedimen mangrove umumnya dianggap sebagai lingkungan anaerobik yang kaya dengan kandungan sulfat dan bahan organik. Sedimen mangrove mendukung dan membantu pembentukan lingkungan mikro aerobik dan anaerobik, sehingga keanekaragaman komunitas mikroorganisme di dalam sedimen sangat tinggi (Bissett *et al.*, 2007). Karakteristik sedimen pada ekosistem mangrove berbeda-beda, yaitu sedimen berpasir dan lumpur. Formasi hutan khas daerah tropika dan

sedikit subtropika, terdapat di pantai rendah dan tenang, berlumpur, sedikit berpasir serta mendapat pengaruh pasang surut air laut (Arief, 2003).

Sedimen laut merupakan salah satu habitat terbesar di planet bumi, namun penelitian yang dikhkususkan mengenai keanekaragaman mikroba masih terbatas. Sedimen mangrove merupakan dasar kehidupan bagi hutan mangrove dan segala makhluk hidup yang ada di dalamnya. Keanekaragaman komunitas mikroba dalam sedimen laut juga merupakan salah satu keanekaragaman mikroba tertinggi di semua habitat yang diteliti (Lozupone and Knight, 2007). Hutan mangrove dapat menjadi pusat keanekaragaman hayati mikroba terutama fungi.

### **2.3. Fungi Sedimen Mangrove**

Komunitas mikroba total yang terdapat pada hutan mangrove tropis diketahui terdiri dari bakteri dan jamur sebanyak 91%, 7% alga dan 2% protozoa. Namun hanya sedikit dari 1% komunitas mikroba telah terungkap, 99% sisanya mikroorganisme belum banyak diteliti atau hanya 5% mikroba yang diisolasi telah diperiksa secara kimia (Xu *et al.*, 2015). Fungi mangrove merupakan kelompok terbesar kedua mikroba yang terdapat dalam sedimen mangrove (Sahoo and Dhal, 2009).

Fungi sedimen mangrove tumbuh di habitat dengan kondisi unik sehingga dikaitkan dengan aktivasi metabolisme dan sintesis senyawa yang unik dan belum banyak dieksplorasi. Mikroba yang berasosiasi dengan sedimen mangrove memegang peranan penting dalam degradasi bahan organik yang berasal dari mangrove itu sendiri menjadi bahan nutrisi agar mangrove tersebut tumbuh subur, tumbuhan mangrove juga berperan dalam siklus biogeokimia yang terjadi pada ekosistem mangrove dan sebagai pemasok sumber energi bagi organisme hewan maupun tumbuhan. Sedimen berpasir dengan karakteristik yang lebih kasar diketahui memiliki jumlah jamur yang lebih sedikit daripada sedimen dengan tekstur yang lebih halus (Simoes *et al.*, 2015).

Secara khusus, mikroba yang berasal dari sedimen mangrove berperan penting dalam degradasi bahan organik yang berasal dari tumbuhan mangrove dan menjadi sumber nutrisi bagi fauna yang hidup di dalamnya (Holguin *et al.*, 2001). Fungi sedimen mangrove dianggap sebagai sumber aktivitas biokimia baru, dan sumber berbagai senyawa bioaktif yang secara struktural unik dan aktif secara farmakologis seperti antibakteri, antifungi, anti *cancer* sehingga menarik perhatian peneliti bidang farmasi dalam beberapa tahun terakhir untuk mengisolasi senyawa bioaktifnya.

#### **2.4. Identifikasi Mikroskopis Fungi Sedimen Mangrove**

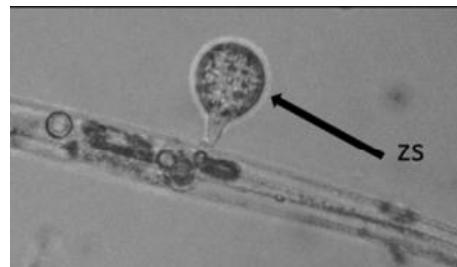
Hasil penelitian sebelumnya mengenai keanekaragaman fungi sedimen di hutan mangrove diperoleh 40 spesies fungi dengan mayoritas fungi Genus *Aspergillus* *sp*, dan *Penicillium* *sp* paling sering diisolasi. Mayoritas jamur yang diisolasi milik *Ascomycota* dan *Deuteromycota* (Selvakumar, *et al.*, 2014). Namun, fungi keluarga Chytridiomycota belum banyak dieksplorasi dan diteliti. Studi terbaru menunjukkan bahwa isolat milik *Aspergillus*, *Penicillium*, dan *Fusarium* merupakan genus dominan fungi yang ditemukan di ekosistem sedimen laut (Zhang, *et al.*, 2014).

*Chytridiomycota* (*chytrids*) adalah jamur zoospora aerobik yang beroperasi sebagai saprotrof dan patogen di habitat air laut, tawar, dan payau yang berlimpah di tanah. Salah satu genus dalam phylum Chytridiomycota yaitu *Rhizidium*. Fungi ini terdapat di lingkungan tanah dan air. Spesies pertama dari genus ini dicirikan terutama memiliki zoospora kecil dan dalam perkembangannya memiliki variabilitas dengan ciri-ciri memiliki sistem rizoid yang berbeda dan memanjang (Roskov *et al.*, 2013).

Klasifikasi fungi genus *Rhizidium* yaitu sebagai berikut:

Kingdom	: Fungi
Divisi	: Chytridiomycota
Class	: Chytridiomycetes
Ordo	: Chytridiales

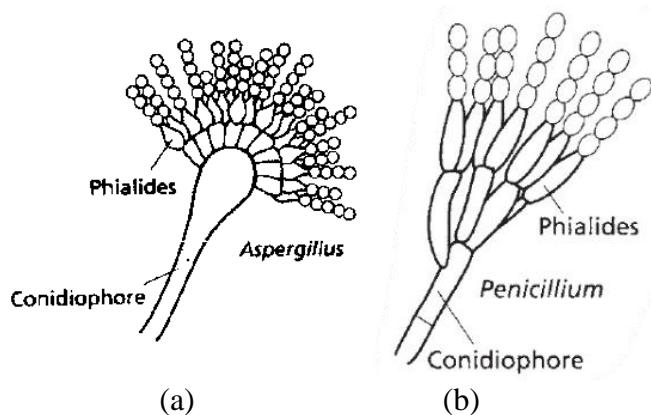
Family : Chytriomycetaceae  
 Genus : *Rhizidium* (Velez *et al.*, 2011).



**Gambar 2.** Mikroskopis fungi Chytridiomycota (Hasset *et al.*, 2017).

Morfologi fungi *Rhizidium* termasuk ke dalam keluarga Chytridiomycota diilustrasikan memiliki zoospora (zs) berbentuk bulat, ber diameter sekitar 3-4 mm, mengandung lipid lateral tunggal globule dan memiliki flagel 20–25 mm. Zoospora menetap dan menempel pada inangnya (Velez *et al.*, 2011).

Fungi genus *Penicillium* biasanya memiliki ciri-ciri seperti konidiofor berbentuk menyerupai sikat, dan konidia yang berurutan terakumulasi dalam rantai. Sedangkan genus *Aspergillus* biasanya memiliki konidiofor dengan phialides diatur pada vesikel bengkak, dan menghasilkan rantai konidia, dan hifa bersepta (Deacon, 2013).



**Gambar 3.** Ciri Mikroskopis fungi (a) *Aspergillus*, (b) *Penicillium*

*Penicillium* merupakan genus penting dari filum Ascomycota yang berperan dalam pengembangan obat. Senyawa metabolit sekunder dari spesies *Penicillium*,

terutama alkaloid telah menerima minat peneliti karena struktur yang menarik dan kemungkinan senyawa bioaktif yang dapat diperoleh.

Spesies *Penicillium* dapat berada di hampir setiap habitat ekosistem tumbuhan di seluruh dunia termasuk baik darat maupun laut. Dibandingkan dengan ekosistem darat, ekosistem laut dianggap kaya dan sumber senyawa bioaktif baru yang belum banyak dieksplorasi secara struktural. Hal ini disebabkan karena kondisi ekosistem laut yang memiliki karakteristik lingkungan yang unik sehingga organisme laut akan menghasilkan keragaman metabolit yang lebih besar daripada organisme terestrial (Gogineni, *et al.*, 2015).

Spesies *Penicillium* yang hidup dalam kondisi ekstrim, khas di lingkungan laut, sangat sensitif terhadap media kultur dan lebih cenderung menghasilkan alkaloid baru. Penelitian Ma, *et al.*, (2016) merangkum 390 metabolit sekunder yang dihasilkan dari jamur *Penicillium* yang berasal dari laut dilaporkan dari tahun 1991 hingga 2014.

Fungi yang berasal dari genus *Aspergillus* kaya akan sumber daya dalam menemukan senyawa metabolit sekunder yang beragam secara struktural dan aktif secara biologis. Karena lingkungan ekologisnya yang unik, tanaman bakau tumbuh di pesisir salin habitat di daerah tropis dan subtropis, dianggap sebagai sumber mikroba yang menjanjikan jamur seperti fungi *Aspergillus sp.*, yang dapat menghasilkan produk alami bioaktif. Ekstrak dari media fermentasi beras *Aspergillus sp.* menghasilkan isolasi dan identifikasi empat belas senyawa, yang meliputi senyawa baru seperti alkaloid yang diketahui yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap patogen uji, termasuk MRSA (Pang *et al.*, 2020).

## 2.5. Potensi Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Sedimen Mangrove

Metabolit sekunder merupakan senyawa yang dihasilkan pada sel berupa molekul molekul kecil dan bersifat spesifik. Tumbuhan menghasilkan berbagai metabolit sekunder yang berguna dalam interaksinya dengan lingkungan. Senyawa ini diproduksi hanya dalam jumlah sedikit, tidak terus-menerus hanya untuk mempertahankan diri dan tidak berperan penting dalam proses metabolisme utama

(primer) (Sudha and Ravishankar, 2002). Menurut definisi, metabolit sekunder dianggap sebagai senyawa kimia yang tidak terlibat langsung untuk pertumbuhan, perkembangan atau reproduksi tanaman. Metabolit sekunder berperan untuk memberikan manfaat biologis bagi produsen dalam menghadapi tekanan lingkungannya (Chiang, *et al.*, 2011).

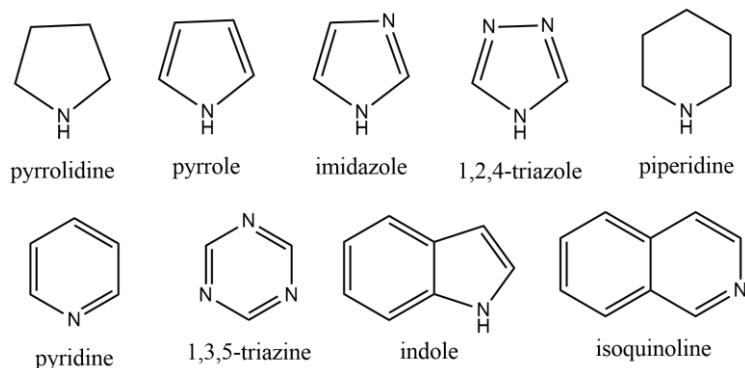
Ekosistem mangrove memiliki keunikan yang tinggi dengan keanekaragaman hayati flora, fauna, dan habitat tempat hidupnya. Komunitas mikroba yang berasosiasi dengan habitat mangrove terus menarik ahli kimia karena keanekaragaman senyawa metabolit bioaktifnya (Debbab, *et al.*, 2013). Mikroorganisme yang berasosiasi dengan mangrove, termasuk fungi dan bakteri menarik perhatian peneliti produk alam. Mikroba sedimen mangrove diketahui mengandung senyawa bioaktif seperti alkaloid yang memiliki kemampuan sebagai antibakteri (Wiese and Imhoff, 2019). Studi khusus, terutama pada jamur dan bakteri yang berasal dari tanah menunjukkan bahwa mikroorganisme yang berasosiasi dengan lingkungan sedimen kaya akan sumber zat bioaktif yang unik secara struktural.

## 2.6. Alkaloid

Alkaloid termasuk kelompok senyawa metabolit sekunder yang memiliki keunikan secara struktural sehingga berpotensi sebagai senyawa bioaktif. Senyawa alkaloid tersebar luas di alam dan banyak juga ditemukan dalam biota laut, senyawa alkaloid dalam strukturnya mengandung atom nitrogen yang menjadi ciri utama dari kelompok senyawa ini (Usman, 2014).

Senyawa alkaloid dapat dikelompokkan berdasarkan bentuk cincin heterosiklik nitrogen yang terdapat di dalamnya, alkaloid heterosiklik merupakan salah satu produk alami yang paling menantang untuk diteliti karena memiliki struktur yang unik dan berbeda, juga karena potensi bioaktivitasnya.

Alkaloid heterosiklik dibagi menjadi beberapa kategori: alkaloid indol, alkaloid diketopiperazine, alkaloid pirolidin, alkaloid piperidin, dan alkaloid heterosiklik lainnya (Dewick, 2002).

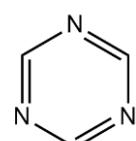


**Gambar 4.** Struktur dasar alkaloid

## 2.7. Alkaloid Fungi Sedimen Mangrove

Fungi yang hidup di kondisi lingkungan yang ekstrim seperti lingkungan laut merupakan salah satu sumber terkaya senyawa yang mengandung nitrogen dasar ini. Spesies jamur yang termasuk dalam genus *Penicillium* telah dipelajari seluruh dunia untuk potensi biosintetik untuk menghasilkan alkaloid bioaktif. Mengisolasi metabolit sekunder dari spesies laut, terutama alkaloid menjadi hal yang menarik untuk diteliti karena struktur yang menarik dan kemungkinan aplikasi farmasi dari senyawa yang diisolasi (Zhang, 2020).

Alkaloid *triazine* menurut banyak penelitian sebelumnya diketahui merupakan kerangka dasar alkaloid yang berpotensi senyawa bioaktif salah satunya sebagai antibakteri. Kerangka dasar alkaloid *triazine* sebagai berikut.



**Gambar 5.** Kerangka dasar 1,3,5-triazine

Senyawa turunan *triazine* diketahui menghasilkan senyawa bioaktif sebagai antibakteri yang diisolasi dari tanaman darat maupun laut (Abdel-Shafi, *et al.*, 2019).

## 2.8. Metode Isolasi dan Ekstraksi

Isolasi dilakukan untuk mendapatkan senyawa murni dari suatu campuran senyawa. Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa yang diinginkan dari suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai, metode ini didasarkan oleh perbedaan pendistribusian zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang tidak saling bercampur. Isolasi senyawa metabolit sekunder yang berasal dari fungi dilakukan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang diharapkan berpotensi terhadap antibakteri sehingga dapat memberikan manfaat bagi kehidupan manusia (Seidel, 2006).

Pada penelitian ini digunakan metode ekstraksi yaitu maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi senyawa paling sederhana yang dapat digunakan dalam skala kecil maupun industri, maserasi yang dilakukan dengan menambahkan pelarut ke dalam serbuk simplisia kemudian didiamkan dalam wadah tertutup pada suhu kamar.

### 2.8.1. Kultivasi dan Ko-kultivasi

Kultivasi merupakan metode peremajaan isolat mikroba dalam media buatan di luar habitat alaminya secara aseptik. Kultivasi berfungsi untuk memperbanyak jumlah mikroba dengan cara menumbuhkan mikroba tersebut dalam media biakan secara *in vitro* di laboratorium. Lingkungan fisik mempengaruhi kultivasi mikroba, sehingga perlu diperhatikan beberapa hal untuk menumbuhkan mikroba yaitu temperatur, pH, konsentrasi oksigen, dan tekanan yang sesuai dengan kondisi lingkungan alaminya.

Fermentasi ko-kultivasi adalah peremajaan mikroorganisme dengan penambahan mikroorganisme lain yang berbeda dan saling kontak dalam satu lingkungan buatan. Adanya interaksi antara mikroorganisme yang berbeda dalam hal ini menyebabkan mikroorganisme akan memproduksi senyawa bioaktif yang berbeda, hal ini menjadi alasan banyaknya digunakan metode ini sebagai upaya untuk menemukan senyawa metabolit baru sebagai agen antimikroba dalam berbagai penelitian. Ko-kultivasi terbukti dapat meningkatkan potensi senyawa

bioaktif yang dapat dihasilkan dari mikroorganisme. Fermentasi ko-kultur merupakan pendekatan interaksi sel ke sel untuk menginduksi produksi senyawa metabolit tersembunyi (*cryptic metabolites*) (Onaka *et al.*, 2011).

Pada penelitian ini dilakukan kultivasi isolat fungi yang diperoleh dari sedimen mangrove pada media beras padat selama 14 hari dalam keadaan aseptis pada suhu ruang. Media beras dipilih karena memiliki kandungan protein dan karbohidrat serta nitrogen yang cukup dominan. Menurut penelitian Fitrah, *et al.*, (2011) media beras terbukti paling baik untuk pertumbuhan fungi dengan kerapatan spora dan viabilitas spora.

### **2.8.2. Maserasi**

Maserasi adalah metode ekstraksi sederhana yang masih banyak digunakan, dalam prosedurnya sampel direndam menggunakan pelarut organik pada suhu ruang dalam wadah tertutup. Metode ini merupakan metode yang paling sederhana yang banyak digunakan baik skala kecil maupun industri. Ekstraksi selesai ketika kesetimbangan antara konsentrasi metabolit dalam ekstrak dan dalam suatu bahan telah tercapai dicapai. Metode maserasi memiliki keunggulan seperti dapat menghindari senyawa-senyawa yang bersifat termolabil mengalami kerusakan. Setelah ekstraksi, bahan sisa harus dipisahkan dari pelarutnya dengan penuangan dan penyaringan yang kemudian dapat dilakukan penguapan (Seidel, 2006).

Prinsip maserasi adalah pelarut akan menarik senyawa metabolit sekunder berdasarkan sifat kepolarannya dalam suatu pelarut (*like dissolve like*), penyarian dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang sesuai selama 24 jam pada suhu kamar. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam simplisia akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan di luar sel, seperti prinsip difusi dimana larutan yang konsentrasinya tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh pelarut yang memiliki konsentrasi rendah. Peristiwa tersebut berulang sampai mencapai keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Setelah ekstraksi selesai, pelarut

dihilangkan dari campuran dengan proses penguapan menggunakan vakum evaporator untuk memekatkan produk berupa ekstrak yang dihasilkan.

Pemilihan prosedur ekstraksi untuk metabolit mikroba harus mempertimbangkan jumlah senyawa metabolit yang diproduksi oleh mikroba sangat rendah, dan menghasilkan campuran senyawa yang kompleks. Pelarut yang digunakan atau pelarut organik misalnya, etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), dan sebagainya untuk ekstraksi metabolit mikroba (Seidel, 2006). Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat (EtOAc).

## **2.9. Bakteri Uji**

### **2.9.1. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif yang dapat hidup pada suhu maksimum 37°C. *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh pada berbagai macam media dan dengan aktif melakukan metabolisme. *Staphylococcus aureus* biasanya membentuk koloni abu-abu hingga keemasan (Jawetz, *et al.*, 2005). Antibiotik yang berpotensi aktif melawan beberapa patogen MDR adalah kloramfenikol.

*Staphylococcus aureus* diklasifikasikan sebagai berikut :

Filum : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

Ordo : Eubacteriales

Family : Micrococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Species: *Staphylococcus aureus* (Garrity, *et al.*, 2004).

Di antara MDR, yang disebut 'ESKAPE' (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Enterobacter spp.*) patogen *Staphylococcus aureus* semakin diakui sebagai ancaman mikroorganisme terutama karena kemampuan resistensi terhadap sebagian besar antibiotik atau agen antimikroba (Rice, 2008).

### **2.9.2. *Pseudomonas aeruginosa***

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen gram negatif, berbentuk batang, dan mampu tumbuh dengan baik di suhu 25°C - 37°C. Bakteri ini mampu tumbuh pada suhu 42°C yang menjadi pembeda dari banyak spesies *Pseudomonas* lainnya (Wu, et al., 2015).

Klasifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Pseudomonadales

Famili : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa* (Madigan, et al., 2008).

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif sebagai patogen kulit kuat yang paling sering terjadi di rumah sakit, bakteri ini dikenal sebagai bakteri tangguh yang mampu bertahan hidup di lingkungan yang ekstrem seperti kondisi nutrisi yang minim dan mampu beradaptasi dengan mudah, hal ini lah yang diduga menjadi penyebab bakteri *P.aeruginosa* menjadi resisten dan penyumbang tingginya kasus MDR (WHO, 2017).

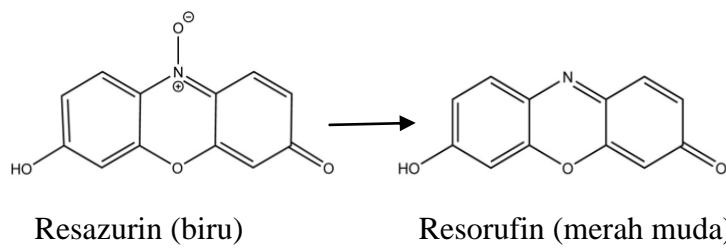
Dibandingkan dengan patogen lain, *P. aeruginosa* sangat sulit untuk diatasi karena menunjukkan resistensi intrinsik yang tinggi terhadap berbagai macam antibiotik. Obat antipseudomonal yang sering digunakan dalam rumah sakit seperti ciprofloxacin sebagai agen antimikroba (Brazas, et al., 2005). Penggunaan antibiotik secara ekstensif mengakibatkan munculnya bakteri resisten yang dapat membuat obat tidak efektif. Meningkatnya resistensi ini mendesak diperlukannya antibiotik baru untuk pengobatan yang lebih baik dan meningkatkan efektivitasnya.

## 2.10. Skrining Bioaktivitas Antibakteri

Skrining antibakteri adalah teknik yang digunakan untuk mengukur seberapa besar potensi senyawa dapat memberikan efek bagi mikroorganisme terutama antibakteri. Salah satu uji antibakteri adalah uji skrining ekstrak dengan metode mikrodilusi menggunakan *microtiter plate 96 wells*. Metode ini biasanya digunakan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sampel antibakteri terhadap bakteri uji yang dapat didefinisikan sebagai konsentrasi (mg/L) (Wiegand, *et al.*, 2008).

Metode KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) merupakan penentuan konsentrasi ekstrak yang paling rendah yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Menurut Sulistijowati, (2015) metode ini dilakukan yaitu untuk mengetahui konsentrasi minimum suatu zat antibakteri, yang masih memiliki aktivitas menghambat terhadap bakteri uji.

Resazurin adalah indikator oksidasi-reduksi yang digunakan untuk evaluasi pertumbuhan sel, terutama di berbagai tes sitotoksitas. Uji resazurin memungkinkan deteksi pertumbuhan mikroba dalam ukuran yang sangat kecil. (McNicholl, *et al.*, 2007). Interaksi yang terjadi adalah perubahan warna resazurin biru menjadi merah muda ketika direduksi menjadi resorufin oleh bakteri hidup.



**Gambar 6.** Reduksi resazurin menjadi resorufin

## 2.11. Metode Pemisahan

### 2.11.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan sebuah metode yang digunakan untuk menentukan identitas dan kemurnian suatu senyawa. Kromatografi Lapis Tipis biasanya dilakukan menggunakan lapisan tipis adsorben (plat KLT).

Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai Rf (*Retention factor*) (Sherma and Fried, 2003), dimana Rf adalah:

$$Rf = \frac{\text{Jarak Perjalanan Suatu Senyawa}}{\text{Jarak Perjalanan Suatu Fasa Gerak}}$$

Pereaksi yang umum digunakan yaitu pereaksi serum sulfat. Pereaksi serum sulfat digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa organik dalam sampel dengan ditandai timbulnya noda berwarna coklat kehitaman. Pereaksi lain seperti pereaksi *Dragendorff* digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa alkaloid (N tersier) dalam campuran yang ditandai dengan timbulnya noda *orange* pada hasil uji KLT. Sedangkan fasa diam atau adsorben yang umum digunakan yaitu silika gel atau adsorben fase terbalik C<sub>18</sub>.

Silika gel adalah adsorben polar yang biasa digunakan untuk memisahkan senyawa yang polaritasnya rendah sampai sedang. Senyawa yang sangat polar akan berada pada titik awal adsorben yang bersifat polar. Terlepas dari adsorben yang digunakan, KLT dapat digunakan sebagai persiapan awal untuk menjalankan uji pemisahan dalam kromatografi kolom (Meyers and Meyers, 2008). Pada penelitian ini digunakan fase diam yaitu plat silika dengan modifikasi fase gerak n-Heksana : etil asetat yang kemudian dielusi menggunakan pereaksi serum sulfat dan *Dragendorff*.

### **2.11.2. Kromatografi Kolom**

Kromatografi kolom merupakan suatu teknik pemisahan campuran yang didasarkan pada perbedaan interaksi setiap senyawa dalam campuran yang ingin dipisahkan dengan kolom media yang digunakan terutama untuk pemisahan campuran beberapa senyawa-senyawa hasil alam khususnya metabolit sekunder yang diperoleh dari isolasi tumbuhan.

Pemisahan dengan metode kromatografi kolom dilakukan dengan memanfaatkan sifat fisik dari komponen campuran tersebut, seperti kelarutan sampel, adsorbsi, dan kepolaran. Kromatografi kolom menggunakan alat berupa kolom yang

terbuat dari gelas atau kaca yang ditempatkan secara vertikal sehingga zat dapat diturunkan secara perlahan berdasarkan gaya gravitasi bumi. Di dalam kolom akan terjadi kesetimbangan antara zat terlarut yang diadsorpsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom, sehingga terjadi pola pemisahan dari masing-masing komponen senyawa berdasarkan sifat kepolarannya (Poole, 2009).

### **2.11.3. *Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)***

*Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)* adalah salah satu metode kromatografi yang didasarkan pada pemisahan di bawah tekanan. MPLC diperkenalkan pada tahun 1970-an sebagai alat yang efisien teknik pemisahan preparatif senyawa organik. MPLC mengatasi satu kelemahan utama dari low kromatografi cair tekanan (LPLC), yaitu terbatas pemuatan sampel. Perbedaan antara tekanan rendah, tekanan sedang dan tekanan tinggi LC didasarkan pada rentang tekanan yang diterapkan dalam teknik ini. MPLC memungkinkan pemurnian senyawa dalam jumlah besar dan diperoleh pemisahan lebih cepat dan lebih baik (Hostettmann and Terreaux, 2000).

## **2.12. Karakterisasi senyawa**

Karakterisasi senyawa digunakan untuk memprediksi bentuk struktural senyawa yang terkandung dalam suatu ekstrak. Spektrofotometri didasarkan pada interaksi antara energi cahaya dan materi. Beberapa keuntungan dari penggunaan metode spektrofotometri adalah jumlah zat yang diperlukan untuk analisis relatif kecil dan waktu penggerjaannya cepat. Metode spektroskopi yang dilakukan pada penelitian ini antara lain *Mass Spectroscopy (MS)*, dan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)*.

### **2.12.1. *Mass Spectroscopy (MS)***

*Mass spectrometry (MS)* atau Spektrometri Massa digunakan untuk mengetahui berat dari suatu molekul atau senyawa dalam m/z dan untuk mengetahui pola

pemecahan (fragmentasi) dari suatu molekul organik. Metode spektrofotometri dan kromatografi digunakan untuk menentukan dan mengidentifikasi senyawa dalam ekstrak (Magalhaes, *et al.*, 2007).

Spektrometer massa membombardir zat dengan berkas elektron, dan mencatat fragmen spektrum ion positif dan kelimpahan relatifnya. Prinsip spektrometri massa yaitu senyawa yang terionisasi kemudian dipisahkan berdasarkan rasio massa per muatannya, kemudian jumlah ion yang mewakili setiap massa atau unit dicatat sebagai spektrum. Sampel yang telah diionisasi, dipercepat oleh medan listrik dan kemudian masuk ke penganalisis massa, spektrometer massa tempat pemisahan menurut rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ) (Pavia, *et al.*, 2008).

### **2.12.2. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR)**

Spektrofotometri Inframerah (IR) adalah metode yang digunakan untuk menganalisis komposisi biomolekul secara struktural dengan cara mengidentifikasi gugus fungsi pada suatu molekul. Spektrofotometer Inframerah (FT-IR) merupakan alat yang paling kuat untuk mengidentifikasi jenis ikatan kimia atau gugus fungsi yang ada dalam struktur.

Pada penelitian sebelumnya diperoleh analisis FTIR senyawa alkaloid adanya gugus hidroksil diperkuat oleh serapan pada bilangan gelombang  $1067,32\text{ cm}^{-1}$  yang menunjukkan adanya sinyal ulur CO. Disamping nilai bilangan gelombang  $3389,46\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus NH. Serapan pada bilangan gelombang  $2926,57\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus C-H alifatik. Serapan pada bilangan gelombang  $1694,15\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus karbonil regang C=O *group* (Brochot, *et al.*, 2017). Senyawa yang diperoleh diasumsikan merupakan gugus alkaloid aromatik yang memiliki beberapa gugus fungsi; NH, OH, CH aromatik, CN, C=O, CO dan C=C.

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Waktu dan Tempat**

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret sampai dengan Juni 2022 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung. Analisis menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectrometer* (FT-IR) di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung. Analisis *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS) dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal POLRI, Bogor.

#### **3.2. Alat dan Bahan**

Alat-alat yang digunakan yaitu *laminar air flow* Memmert, *autoclave* Tomy SX-700, instrumen FTIR Cary 360, *Mass Spectrometer* Xevo G2-S Qtof , instrumen *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) Buchii/Sepaco Term, neraca analitik *Wigen Houser*, *incubator* Memmert- Germany/INC-02, mikroskop *Axioo Zeiss Imager A1*, *drying oven* Jisico, *hospitex diagnostics*, lampu UV  $\lambda$  254 nm, cawan petri, jarum ose, lampu spiritus, neraca analitik, oven, *hot plate*. satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT), satu set alat Kromatografi Kolom (KK), alat-alat gelas (pipet tetes, gelas beaker, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur), kasa, karet gelang, bunsen, mikropipet, *tissue*, serbet, pinset, dan kapas.

Bahan-bahan yang digunakan yaitu EtOAc, n-Heksana, MeOH PA, pereaksi serum sulfat, pereaksi *Dragendorff*, beras, *peptone from meat*, *meat extract*, bubuk agar, alkohol 70%, silika gel, sephadex, material sedimen mangrove, isolat

bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, akuades ( $H_2O$ ), air laut buatan, dan antibiotik (*ciprofloxacin* dan *chloramphenicol*).

### **3.3. Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Sampling Material**

Material pada penelitian ini adalah sedimen mangrove yang diambil secara acak di Pantai Dewi Mandapa dan kawasan wisata mangrove Desa Gebang, Pesawaran, Lampung. Penentuan koordinat lokasi sampling menggunakan alat *Global Positioning System* (GPS). Sedimen mangrove diambil menggunakan spatula steril dan dimasukkan ke dalam kantong plastik agar sampel tidak terkontaminasi dan diberi label. Kemudian, sampel disimpan ke dalam *cool box*  $4^{\circ}C$  dan dibawa ke laboratorium untuk diisolasi (Chen *et al.*, 2014).

#### **3.3.2. Isolasi Mikroba Sedimen Mangrove**

Isolasi mikroba dilakukan menggunakan metode *Pour Plate* (Agar tuang) pengenceran bertingkat menurut Basirya, *et al.*,(2017) dengan beberapa modifikasi. ditimbang 1 gram sedimen kemudian dilarutkan dalam 9 mL air laut (pengenceran  $10^{-1}$ ). Pengenceran serial  $10^{-2}$  , sampai  $10^{-6}$  dibuat dengan memipet volume terukur sebanyak 1 mL ke dalam blanko pengenceran, kemudian ditambahkan air laut dengan perbandingan 1:9 sehingga didapat 1/10 sel mikroorganisme dari pengenceran sebelumnya. Kemudian 100  $\mu L$  suspensi (media kultur) dari setiap pengenceran di *spread* ke media NA yang telah ditambahkan antibiotik pada cawan petri dingin dan steril. Pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-5}$  dipilih untuk pertumbuhan mikroba. Media kemudian diinkubasi selama 3-7 hari pada  $25^{\circ}C$ .

#### **3.3.3. Pemurnian Mikroba Endofit**

Setelah proses inkubasi, koloni mikroba yang sudah tumbuh diambil sebagian dari miselia fungi pada permukaan agar dengan menggunakan kawat ose steril dan dipindahkan ke media NA yang baru, kultur murni dikelompokkan menurut

warna koloni, pertumbuhan hifa, dan pola pertumbuhan yang berbeda untuk dijadikan isolat tunggal. Kemudian disimpan pada suhu ruangan selama 3x24 jam.

### **3.3.4. Identifikasi Mikroskopis Menggunakan Metode *Slide Culture***

Pengamatan mikroskopis isolat fungi sedimen mangrove dilakukan menggunakan metode *slide culture* dengan cara meletakkan *coverslip* ke media agar dan menginokulasi koloni fungi berdekatan dengan *coverslip*. Setelah 3-4 hari, *coverslip* diambil perlahan kemudian ditambahkan dengan *methylene blue*. *Coverslip* diletakkan pada kaca preparat dan diamati mikroskopisnya berupa ada tidaknya spora atau konidia, rhizoid, bentuk spora dan konidia (Rosa *et al.*, 2013).

### **3.3.5. Kultivasi dan Ko-kultivasi Fungi Sedimen Mangrove**

Isolat fungi dikultivasi untuk memproduksi senyawa metabolit. Media cair *Nutrient Broth* sebanyak 10 mL disterilisasi *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian, diinokulasi sebanyak 1-2 ose isolat yang telah dimurnikan pada media cair yang telah disiapkan. Merujuk pada Liu *et al.*,(2017) dengan beberapa modifikasi *strain* mikroba ditumbuhkan pada media kultur beras padat (100 g beras dalam 110 ml air laut, di autoklaf selama 20 menit pada 121°C). Lalu, diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang dan dilakukan pengamatan fisik selama pertumbuhan.

Ko-kultivasi dilakukan dengan budidaya jamur dan bakteri dalam kultur bersama untuk isolasi dan identifikasi metabolit dengan media beras padat yang telah diautoklaf sebelum menginokulasi jamur yang selanjutnya diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang (Umeokoli *et al.*, 2019). *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi dalam kaldu TSB. Volume kultur bakteri 10 mL ditambahkan ke media beras pada hari keempat dan diinkubasi dalam kondisi steril selama 14 hari. Kemudian 3 x 400 mL EtOAc ditambahkan ke kultur untuk menghentikan pertumbuhan sel dan maserasi (Umeokoli *et al.*, 2019).

### **3.3.6. Ekstraksi Senyawa dari Fungi Sedimen Mangrove**

Ekstraksi mikroba merujuk pada Umeokoli *et al.*, (2019) dengan beberapa modifikasi. Hasil kultivasi isolat sampel diekstraksi dengan metode maserasi hingga semua sampel serbuk terendam menggunakan pelarut etil asetat (3 x 400 mL) selama 24 jam. Kemudian, ekstrak etil asetat disaring dan dipekatkan menggunakan evaporator vakum untuk memisahkan pelarut dengan ekstrak sehingga didapatkan ekstrak kasar. Hasil ekstrak kasar kemudian digunakan untuk uji skrining antibakteri untuk mengetahui keaktifan dari sampel terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

### **3.3.7. Analisis Pemisahan Kromatografi Lapis Tipis**

Ekstrak kemudian dianalisis dengan KLT menggunakan plat silika sebagai fase diam. Eluen yang digunakan merupakan variasi pelarut seperti n-Heksana, EtOAc, dan pelarut lainnya. Setelah dilakukan elusi terhadap pelat KLT, bercak atau noda dilihat di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm. Hasil kromatogram tersebut disemprot dengan menggunakan beberapa reagen seperti serum sulfat dan *Dragendorff* untuk menampakkan noda hasil KLT, lalu dikeringkan di atas pemanas. Pelat KLT yang telah dipanaskan, diamati dan dihitung nilai Rf nya untuk mengetahui tingkat kepolaran masing-masing komponen.

### **3.3.8. Uji Skrining bioaktivitas**

#### **3.3.8.1. Peremajaan Bakteri**

Mikroorganisme uji yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Mikroorganisme uji diremajakan dalam media TSA dan diinkubasi selama 18 jam, kemudian ditumbuhkan dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) lalu diinkubasi pada suhu 35–37°C selama 2-6 jam. Kekeruhan bakteri diatur agar sesuai dengan standar barium sulfat (0,5 McFarland).

### **3.3.8.2. Skrining Bioaktivitas**

Uji skrining antibakteri dilakukan menggunakan metode mikrodilusi 96 wells. Ekstrak pada konsentrasi 2000 ppm diuji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, suspensi bakteri sesuai Standar Mc Farlands untuk mencapai kira-kira  $1 \times 10^8$  CFU/ml, masing-masing ekstrak dipipet ke dalam sumuran *microplate* tiga sumuran yang pertama sebagai kontrol positif, Kontrol positif ditambahkan 145  $\mu\text{L}$  media TSB, 50  $\mu\text{L}$  antibiotik (2000 ppm), dan 25  $\mu\text{L}$  inokulum bakteri. Kemudian kontrol negatif ditambahkan 145  $\mu\text{L}$  media TSB, 50  $\mu\text{L}$  MeOH PA 12,5%, dan 25  $\mu\text{L}$  inokulum bakteri. Kontrol pertumbuhan (blanko) ditambahkan 220  $\mu\text{L}$  media TSB. Kemudian, pelat mikrotiter uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam, kemudian larutan resazurin 0,02% sebanyak 30  $\mu\text{l}$  ditambahkan ke setiap sumur dan selanjutnya diinkubasi selama 2 jam dan 4 jam. Perubahan warna yang terjadi kemudian diamati secara visual dan dicatat (Sarker, 2007).

Uji skrining bioaktivitas dengan metode Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) untuk senyawa bioaktif alkaloid. Pipet 100  $\mu\text{L}$  media TSB dan 100  $\mu\text{L}$  antibiotik sebagai kontrol positif dan 100  $\mu\text{L}$  sampel dalam sumuran, campuran dihomogenkan diencerkan dua kali lipat ke sumuran berikutnya. Campurkan suspensi bakteri yang disesuaikan dengan  $1 \times 10^8$  CFU  $\mu\text{L}$  yang telah diencerkan 1:100. Pelat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dalam Inkubator selama 18 jam; kemudian diukur nilai absorbansinya dan dicatat ( CLSI, 2012; Wiegand *et al.*, 2008).

### **3.3.9. Ko-kultivasi (*Scaling up*)**

Strain fungi terpilih dari hasil skrining bioaktivitas dilakukan *scaling up* dalam skala yang lebih besar. Ko-kultivasi skala besar dilakukan dengan menumbuhkan fungi pada media beras padat dengan air laut buatan steril. Proses ko-kultivasi dilakukan menggunakan botol gelap 2,5 L yang berisi media beras padat (200 gram dalam 220 mL air laut buatan), lalu diinkubasi selama 4 hari pada suhu ruang (Umeokoli *et al.*, 2019). Inokulum bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

ditanam dalam media TSB. Volume kultur bakteri 20 mL ditambahkan ke media beras pada hari keempat, kemudian diinkubasi dalam kondisi steril selama 14 hari.

### **3.3.10. Ekstraksi (*Scaling up*)**

Setelah inkubasi selama 14 hari, kultur fungi kemudian ditambahkan dengan EtOAc sebanyak 3 x 800 mL untuk menghentikan pertumbuhan sel dan maserasi, maserasi dilakukan tiga kali pengulangan hingga maserat tidak berwarna yang menandakan seluruh senyawa metabolit sekunder pada kultur fungi sudah terekstrak. Filtrat yang berwarna kuning kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dan diperoleh ekstrak pekat.

### **3.3.11. Fraksinasi menggunakan metode kromatografi**

Uji pendahuluan keberadaan senyawa alkaloid dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan pereaksi spesifik *Dragendorff* dan serum sulfat. Perbandingan pelarut yang sesuai dalam pemisahan senyawa alkaloid saat uji KLT digunakan untuk tahap pemurnian lebih lanjut menggunakan metode kromatografi kolom dan *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC).

#### **3.3.11.1. Kromatografi Kolom**

Ekstrak pekat yang diperoleh kemudian dilakukan fraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Pada penelitian ini fasa diam yang digunakan berupa silika gel dan fase gerak yaitu beberapa variasi pelarut dari polar ke non polar dengan perbandingan yang dilihat dari spot hasil kromatografi lapis tipis. Kromatografi kolom dilakukan dengan memasukkan fasa diam ke dalam kolom kaca, lalu ditambahkan pelarut (fase gerak) ke dalam kolom kaca. Dialirkan sampel dari bagian atas melewati kolom kaca dan senyawa hasil fraksinasi ditampung dalam botol vial untuk kemudian dilakukan analisis kromatografi lapis tipis untuk melihat spot senyawa alkaloid yang terdapat pada senyawa hasil fraksinasi.

### **3.3.11.2. Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC)**

Fraksinasi dengan metode MPLC dilakukan dengan menginjeksi senyawa target ke dalam kolom kromatografi. Instrumen *Medium Pressure Liquid Chromatography* (MPLC) dihubungkan dengan perangkat komputer yang telah terinstall aplikasi *Sepacore software Chromatography*. Disiapkan pelarut yang akan digunakan dan dihubungkan dengan alat MPLC, dalam *setting software* diatur *gradient* pelarut yang akan digunakan dalam pemisahan, serta laju alir dan tabung reaksi sebagai tempat penampung hasil fraksinasi.

Fraksi hasil ekstraksi dilarutkan dalam pelarut kemudian diinjeksikan ke dalam kolom yang telah disiapkan. Dalam penelitian ini fraksinasi dilakukan menggunakan kolom sepacore 40g menggunakan gradient pelarut n-Heksana : etil asetat (9:1). Hasil fraksi yang dilihat dalam kromatogram kemudian dilakukan uji KLT untuk melihat spot tunggal senyawa alkaloid yang berhasil dipisahkan.

### **3.3.12. Karakterisasi Senyawa**

Sampel yang mengandung spot noda tidak berekor dan diperkirakan merupakan senyawa alkaloid yang sudah murni, selanjutnya dikarakterisasi menggunakan instrumen *Fourier Transform Infrared Spectrometry* (FT-IR) Cary 360 di Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung, dan analisis instrumen *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC-MS) Xevo G2-S Qtof di Pusat Laboratorium Forensik Badan Reserse Kriminal POLRI, Sentul-Bogor.

## **V. KESIMPULAN DAN SARAN**

### **5.1. Kesimpulan**

Adapun simpulan yang diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Telah berhasil diisolasi 4 isolat fungi yang berasal dari sedimen mangrove yang diindikasi termasuk ke dalam genus *Rhizidium*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*.
2. Hasil skrining bioaktivitas isolat fungi RSM1 menunjukkan aktivitas rendah sebesar 21.2% terhadap *Staphylococcus aureus* dan 26.8% terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Hasil analisis LCMS menunjukkan adanya komponen alkaloid dengan *base peak* m/z 365 dan formula molekul  $C_{17}H_{33}N_8O$  berdasarkan database diindikasi struktur senyawa alkaloid dengan kerangka dasar *triazine*. Hasil analisis FTIR menunjukkan serapan pada bilangan gelombang  $1371.7\text{ cm}^{-1}$  mengindikasi serapan gugus C-N alkaloid, serapan pada bilangan gelombang  $1744,4\text{ cm}^{-1}$  mengindikasi adanya serapan karbonil C=O, dan serapan pada bilangan gelombang  $2922.2\text{ cm}^{-1}$  mengindikasi adanya ikatan C-C alifatik.

### **5.2. Saran**

Berdasarkan penelitian diperoleh informasi awal untuk pengembangan senyawa bioaktif fungi sedimen mangrove yang dapat dikembangkan lebih lanjut mengenai optimasi pemurnian kembali komponen alkaloid, dan kajian bioteknologi, serta dilakukan analisis struktur menggunakan instrumen NMR untuk mengetahui struktur senyawa dengan lebih spesifik.

## **DAFTAR PUSTAKA**

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Shafi, S., Al-Mohammadi, A. R., Sitohy, M., Mosa, B., Ismaiel, A., Enan, G., & Osman, A. (2019). Antimicrobial activity and chemical composition of the crude, phenolic-rich extracts of Hibiscus sabdariffa, Brassica oleracea and Beta vulgaris. *Molecules*, 24(23), 4280.
- Alongi, D. M. (2005). Mangrove microbe soil relations. *Interactions between macro and microorganisms in marine sediments*, American Geophysical Union Washington. 60: 85-103.
- Arief, A. (2003). Hutan Mangrove: Fungsi Dan Manfaatnya, Penerbit Kanisius: Yogyakarta.
- Basiriya, R. H., Anuswedha, A., and Kalaiselvam, M. (2017). Isolation, Identification and Characterisation of Mangrove Rhizosphere Soil Fungi. *Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences*, 8(3), 993-999.
- Bissett, A., Burke, C., Cook, P. L., and Bowman, J. P. (2007). Bacterial community shifts in organically perturbed sediments. *Environmental Microbiology*, 9(1), 46-60.
- Brazas, M. D., & Hancock, R. E. (2005). Ciprofloxacin induction of a susceptibility determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(8), 3222-3227.
- Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., and Roques, C. (2017). Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen*, 6(4), e00459. Campa, M., Bendinelli, M., and Friedman, H. (2012). *Pseudomonas aeruginosa as an opportunistic pathogen*: Springer Science & Business Media.
- Carroll, A. R., Copp, B. R., Davis, R. A., Keyzers, R. A., and Prinsep, M. R. (2019). Natural product reports. *Nat. Prod. Rep.*, 36, 122-173. Chen, L., Gong, M.W., Peng, Z.F., Zhou, T., Ying, M.G., Zheng, Q.H., and Zhang, Q.Q. (2014). The marine fungal metabolite, dicitrinone B, induces A375 cell apoptosis through the ROS-related caspase pathway. *Marine drugs*, 12(4), 1939-1958.

- Chiang, Y.M., Chang, S.L., Oakley, B. R., and Wang, C. C. (2011). Recent advances in awakening silent biosynthetic gene clusters and linking orphan clusters to natural products in microorganisms. *Current opinion in chemical biology*, 15(1), 137-143.
- Choudhary, A., Naughton, L. M., Montánchez, I., Dobson, A. D., and Rai, D. K. (2017). Current status and future prospects of marine natural products (MNPs) as antimicrobials. *Marine drugs*, 15(9), 272.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2012). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement. M100-S20*, 30(1).
- Deacon, J. W. (2013). *Fungal biology*. John Wiley & Sons.
- Debbab, A., Aly, A. H., and Proksch, P. (2013). Mangrove derived fungal endophytes—a chemical and biological perception. *Fungal diversity*, 61(1), 1-27.
- Dewick, P. M. (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*: John Wiley & Sons.
- Fitrah, Z., Suriyanti, S., & Syam, N. (2021). Uji Pertumbuhan Jamur Beauveria Bassiana Pada Beberapa Media Pertumbuhan. *Agrotek Mas Jurnal Indonesia: Jurnal Ilmu Pertanian*, 2(1), 18-23.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., & Lilburn, T. G. (2004). Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. *New York*.
- Giri, C., Ochieng, E., Tieszen, L. L., Zhu, Z., Singh, A., Loveland, T., and Duke, N. (2011). Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. *Global Ecology and Biogeography*, 20(1), 154-159.
- Gofar, N. (2013). Characterization of petroleum hydrocarbon decomposing fungi isolated from mangrove rhizosphere. *Journal of Tropical Soils*, 16(1), 39-45.
- Gogineni, V., Schinazi, R. F., and Hamann, M. T. (2015). Role of marine natural products in the genesis of antiviral agents. *Chemical reviews*, 115(18), 9655-9706.
- Hardhana, B., Siswanti, T., Sibuea, F., Widiantini, W., Susanti, M., Pangaribowo, S., and Shakti, E. (2018). Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia: Indonesia.

- Hassett, B. T., Ducluzeau, A. L. L., Collins, R. E., and Gradinger, R. (2017). Spatial distribution of aquatic marine fungi across the western Arctic and sub-arctic. *Environmental microbiology*, 19(2), 475-484.
- Holguin, G., Vazquez, P., and Bashan, Y. (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biology and fertility of soils*, 33(4), 265-278.
- Hostettmann, K., & Terreaux, C. (2000). Medium-pressure liquid chromatography. *Wilson ID (Chief ed) Encyclopedia of separation science. Academic, San Diego*, 3296-3303.
- Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S., & Ornston, L. N. (2005). Mikrobiologi kedokteran. *Jakarta: EGC*.
- Jin, Z. (2016). Muscarine, imidazole, oxazole and thiazole alkaloids. *Natural product reports*, 33(11), 1268-1317.
- Kathiresan, K. and Bingham, B. L. (2001). Biology of mangroves and mangrove ecosystems.
- Liu, Y., Stuhldreier, F., Kurtán, T., Mándi, A., Arumugam, S., Lin, W., and Henrich, B. (2017). Daldinone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Annulohypoxylon* sp. *RSC advances*, 7(9), 5381-5393.
- Lozupone, C. A. and Knight, R. (2007). Global patterns in bacterial diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(27), 11436-11440.
- Ma, H.G., Liu, Q., Zhu, G.L., Liu, H.S., and Zhu, W.M. (2016). Marine natural products sourced from marine-derived *Penicillium* fungi. *Journal of Asian natural products research*, 18(1), 92-115.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., and Clark, D. P. (2008). Brock biology of microorganisms 12th edn. *Int. Microbiol*, 11, 65-73.
- Magalhaes, P. J., Guido, L. F., Cruz, J. M., and Barros, A. A. (2007). Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography A*, 1150(1-2), 295-301.
- Mayer, A. M., & Hamann, M. T. (2005). Marine pharmacology in 2001–2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems and other miscellaneous

- mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 140(3-4), 265-286.
- McMurry, J. 2008. *Organic Chemistry*. 7th edition. Nelson Education, Ltd. Canada.
- McNicholl, B. P., McGrath, J. W., and Quinn, J. P. (2007). Development and application of a resazurin-based biomass activity test for activated sludge plant management. *Water research*, 41(1), 127-133.
- Meyers, C., and Meyers, D. (2008). Thin-layer chromatography. *Current protocols in nucleic acid chemistry*, 34(1), A-3D.
- Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y., & Furumai, T. (2011). Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in Streptomyces species. *Applied and environmental microbiology*, 77(2), 400-406.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.
- Pang, X., Lin, X., Zhou, X., Yang, B., Tian, X., Wang, J., and Liu, Y. (2020). New quinoline alkaloid and bisabolane-type sesquiterpenoid derivatives from the deep-sea-derived fungus Aspergillus sp. SCSI O06786. *Fitoterapia*, 140, 104406.
- Patra, J. K., and Mohanta, Y. K. (2014). Antimicrobial compounds from mangrove plants: A pharmaceutical perspective. *Chinese journal of integrative medicine*, 20(4), 311-320.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., and Vyvyan, J. (2008). Introduction to spectroscopy: cengage learning. *Ainara López Maestresalas*, 153, 752.
- Pendleton, J. N., Gorman, S. P., and Gilmore, B. F. (2013). Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297-308.
- Pires-Zottarelli, C. C. L. A., & Gomes, A. L. (2007). Contribuição para o conhecimento de Chytridiomycota da "Reserva Biológica de Paranapiacaba", Santo André, SP, Brasil. *Biota Neotropica*, 7, 309-329.
- Poole, C. (2009). *Handbook of Methods and Instrumentation in Separation Science: Volume 1* (Vol. 1): Academic Press.
- Rice, L. B. (2008). Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE (Vol. 197, pp. 1079-1081): The University of Chicago Press.

- Rosa, L. H., Queiroz, S. C., Moraes, R. M., Wang, X., Techen, N., Pan, Z., and Wedge, D. E. (2013). Coniochaeta ligniaria: antifungal activity of the cryptic endophytic fungus associated with autotrophic tissue cultures of the medicinal plant Smallanthus sonchifolius (Asteraceae). *Symbiosis*, 60(3), 133-142.
- Roskov, Y., Kunze, T., Paglinawan, L., Orrell, T., Nicolson, D., Culham, A., and Baillargeon, G. (2013). Species 2000 & ITIS Catalog of Life, 2013 Annual Checklist.
- Sahoo, K. and Dhal, N. (2009). Potential microbial diversity in mangrove ecosystems: a review.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. (2007). Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321-324.
- Seidel, V. (2006). Initial and bulk extraction *Natural products isolation* (pp. 27-46): Springer.
- Selvakumar, V., Panneerselvam, A., Vijayakumar, N., Savery, M. A., and Thajuddin, N. (2014). Diversity of endophytic and rhizosphere soil fungi of Avicennia marina in Maravakadu Mangrove Forest. *IOSR J Pharm Biol Sci*, 9, 24-28.
- Sherma, J., and Fried, B. (2003). *Handbook of thin-layer chromatography*: CRC press.
- Silverstein, R.M., Webster, F.X., Kiemle, D.J. and Bryce, D.L. 2014. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. John Wiley & Sons. New York.
- Simoes, M. F., Antunes, A., Ottoni, C. A., Amini, M. S., Alam, I., Alzubaidy, H., and Bajic, V. B. (2015). Soil and rhizosphere associated fungi in gray mangroves (Avicennia marina) from the Red Sea—a metagenomic approach. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 13(5), 310-320.
- Singh, S. K., Srivastava, P. K., Gupta, M., Thakur, J. K., and Mukherjee, S. (2014). Appraisal of land use/land cover of mangrove forest ecosystem using support vector machines. *Environmental earth sciences*, 71(5), 2245-2255.
- Strobel, G., and Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502.

- Sudha, G., and Ravishankar, G. (2002). Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(3), 181-212.
- Sulistyowati, R., Nurhajati, J., and Awom, I. (2015). The Effectiveness Inhibition Filtrate Bacteriocins Lactobacillus acidophilus Toward Contaminants Bacteria from Swordfish (Axis rochei) Stew. *International Journal of Bio-Science and Bio-Technology*, 7(3), 163-174.
- Thatoi, H., Behera, B. C., Mishra, R. R., and Dutta, S. K. (2013). Biodiversity and biotechnological potential of microorganisms from mangrove ecosystems: a review. *Annals of Microbiology*, 63(1), 1-19.
- Tomlinson, P. B. (2016). *The botany of mangroves*: Cambridge University Press.
- Umeokoli, B. O., Ebrahim, W., El-Neketi, M., Müller, W. E., Kalscheuer, R., Lin, W., and Proksch, P. (2019). A new depsidone derivative from mangrove sediment derived fungus Lasiodiplodia theobromae. *Natural product research*, 33(15), 2215-2222.
- Usman, D. 2014. *Panduan Lengkap Structural Equation Modelling Tingkat Dasar*. Lentera Ilmu. Semarang.
- Vélez, C. G., Letcher, P. M., Schultz, S., Powell, M. J., & Churchill, P. F. (2011). Molecular phylogenetic and zoospore ultrastructural analyses of Chytridium olla establish the limits of a monophyletic Chytridiales. *Mycologia*, 103(1), 118-130.
- WHO. (2017). Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva: WHO; 2015.
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols*, 3(2), 163-175.
- Wiese, J., and Imhoff, J. F. (2019). Marine bacteria and fungi as promising sources for new antibiotics. *Drug development research*, 80(1), 24-27.
- Willem, T., De Mol, M. L., De Bruycker, A., De Maeseneire, S. L., & Soetaert, W. K. (2020). Alkaloids from marine fungi: Promising antimicrobials. *Antibiotics*, 9(6), 340.

- Wu, J., Xiao, Q., Xu, J., Li, M. Y., Pan, J. Y., and Yang, M. H. (2008). Natural products from true mangrove flora: source, chemistry and bioactivities. *Natural Product Reports*, 25(5), 955-981.
- Wu, W., Jin, Y., Bai, F., and Jin, S. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Molecular medical microbiology* (pp. 753-767). Academic Press.
- Xu, J. (2015). Bioactive natural products derived from mangrove-associated microbes. *RSC advances*, 5(2), 841-892.
- Zhang, X.Y., Tang, G.L., Xu, X.Y., Nong, X.H., and Qi, S.H. (2014). Insights into deep-sea sediment fungal communities from the East Indian Ocean using targeted environmental sequencing combined with traditional cultivation. *PLoS One*, 9(10), e109118.
- Zhang, P., Wei, Q., Yuan, X., and Xu, K. (2020). Newly reported alkaloids produced by marine-derived *Penicillium* species (covering 2014–2018). *Bioorganic chemistry*, 99, 103840.