

**SENYAWA BIOAKTIF DARI FUNGI ENDOFIT MANGROVE  
DAN SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP  
BAKTERI RESISTEN, *S. aureus* dan *P. aeruginosa***

(TESIS)

Oleh

**ROSYIDATUL LUTFIAH  
2027011007**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

**SENYAWA BIOAKTIF DARI FUNGI ENDOFIT MANGROVE  
DAN SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP  
BAKTERI RESISTEN, *S. aureus* dan *P. aeruginosa***

Oleh

**ROSYIDATUL LUTFIAH**

**TESIS**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
MAGISTER KIMIA**

**Pada**

**Program Studi Magister Kimia  
Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung**



**PROGRAM STUDI MAGISTER KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS LAMPUNG  
BANDAR LAMPUNG  
2022**

## ABSTRAK

# SENYAWA BIOAKTIF DARI FUNGI ENDOFIT MANGROVE DAN SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI RESISTEN, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*

Oleh

**ROSYIDATUL LUTFIAH**

Peningkatan kasus resistensi bakteri patogen pada berbagai jenis antibiotik menyebabkan permasalahan yang serius di dunia kesehatan dan manusia. Pada penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa antibakteri yang berasal dari fungi endofit mangrove dan spons. Pada penelitian ini, didapatkan sebanyak 17 fungi yang berasal dari mangrove Sriminosari, Lampung Timur dan 9 fungi dari spons yang berasal dari Singaraja, Buleleng, Bali. Bakteri patogen klinis resisten *S. aureus* dan *P. aeruginosa* didapatkan dari Rumah Sakit Abdul Muluk, Bandar Lampung yang berasal dari kulit pasien. Pada uji ketahanan terhadap antibiotik *S. aureus* dan *P. aeruginosa* mampu tahan terhadap 9 jenis antibiotik menggunakan metode difusi disk. Kultivasi dan ko-kultivasi menggunakan media beras dan kulit udang dengan metode solid state fermentation (SSF). Hasil kultivasi dan ko-kultivasi diekstraksi menggunakan pelarut EtOAc. Bioaktivitas dari ekstrak masing-masing isolat diuji terhadap bakteri klinis resisten *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Berdasarkan hasil uji didapatkan ekstrak aktif 18A12RF dari fungi spons dan 20CB07F dari fungi endofit mangrove memiliki aktivitas terhadap bakteri resisten *S. aureus* dan *P. aeruginosa* pada konsentrasi 0.5mg/mL. Ekstrak aktif yang berasal dari fungi spons menggunakan teknik ko-kultivasi pada media beras didapatkan fraksi aktif yaitu A12RFB0301 pada konsentrasi 62.5 µg/mL terhadap bakteri resisten *S. aureus*. Sedangkan hasil ekstrak aktif dari fungi spons menggunakan teknik kultivasi pada media kulit udang yaitu A12RFB0401 pada konsentrasi 31.25 µg/mL terhadap bakteri resisten *P. aeruginosa*. Berdasarkan hasil analisis menggunakan LCMS-MS teramati fraksi aktif A12RFB0301 merupakan golongan peptida dan A12RFB0401 merupakan lipopeptida.

Kata Kunci: Antibakteri, Fungi, Peptida, Lipopeptida, and *Solid State Fermentation* (SSF).

## ABSTRACT

# BIOACTIVE COMPOUNDS OF MANGROVE ENDOPHYTIC FUNGI AND SPONGES AS ANTIBACTERIAL AGAINST RESISTANT BACTERIA, *S. aureus*, and *P. aeruginosa*

By

**ROSYIDATUL LUTFIAH**

The increase in cases of pathogen bacterial resistance in various types of antibiotics causes serious problems in the world of health and humans. This study aims to obtain antibacterial compounds derived from mangrove endophytic fungi and sponges. In this study, 17 fungi were obtained from the Sriminosari mangrove, East Lampung, Lampung, and 9 fungi from sponges from Singaraja, Buleleng, and Bali. Clinical pathogen bacteria resistant to *S. aureus* and *P. aeruginosa* were obtained from Abdul Muluk Hospital, Bandar Lampung which came from the patient's skin. In the test of resistance to antibiotics *S. aureus* and *P. aeruginosa* were able to withstand 9 types of antibiotics using the disc diffusion method. Cultivation and co-cultivation use rice and shrimp shell media using the solid-state fermentation (SSF) method. The results of cultivation and co-cultivation were extracted using EtOAc solvent. The bioactivity of the extracts of each isolate was tested against clinically resistant bacteria *S. aureus* and *P. aeruginosa*. Based on the test results, the active extracts of 18A12RF from sponge fungi and 20CB07F from mangrove endophytic fungi have activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa*-resistant bacteria at a concentration of 0.5mg/mL. Active extract derived from sponge fungi using co-cultivation techniques on rice media obtained an active fraction, namely A12RFB0301 at a concentration of 62.5 µg/mL against *S. aureus*-resistant bacteria. Meanwhile, the results of the active extract from sponge fungi using cultivation techniques on shrimp shell media, namely A12RFB0401 at a concentration of 31.25 µg/mL against *P. aeruginosa* resistant bacteria. Based on the results of the analysis using LCMS-MS, it was observed that the active fraction A12RFB0301 is a peptide group and A12RFB0401 is a lipopeptide group.

Keywords: Antibacterial, Fungi, Peptide, Lipopeptide, and Solid State Fermentation (SSF).



Judul : **SENYAWA BIOAKTIF DARI FUNGI ENDOFIT MANGROVE DAN SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI RESISTEN, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*.**

Nama Mahasiswa : **Rosyidatul Lutfiah**

Nomor Pokok Mahasiswa : **2027011007**

Jurusan : **Kimia**

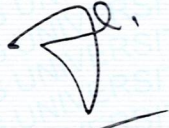
Fakultas : **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**




1. **Komisi Pembimbing**


Pembimbing I

Pembimbing II

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

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

2. **Ketua Program Studi Magister Kimia**

  
**Dr. Nurhasanah, M.Si.**  
NIP. 197412111998022001



MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

etua : **Andi Setiawan, Ph.D.**

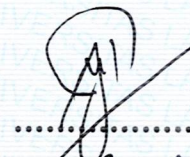


Sekretaris : **Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**

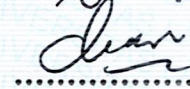


Penguji Bukan Pembimbing

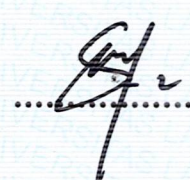
Anggota : **Prof. John Hendri, Ph.D.**



Anggota : **Dr. Dian Herasari, M.Si.**



Anggota : **Prof. Dr. Buhani, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

**Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.**

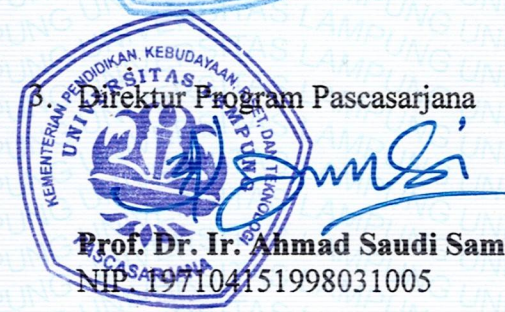
NIP. 197407052000031001



3. Direktur Program Pascasarjana

**Prof. Dr. Ir. Ahmad Saudi Samosir, S.T., M.T.**

NIP. 197104151998031005



Tanggal Lulus Ujian Tesis : **11 Agustus 2022**



**SURAT PERNYATAAN  
KEASLIAN TESIS**

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Rosyidatul Lutfiah  
NPM : 2027011007  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya, bahwa tesis saya yang berjudul :


**“Senyawa Bioaktif dari Fungi Endofit Mangrove dan Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Resisten, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*.”**

Adalah benar karya sendiri dan saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi sesuai dengan kesepakatan.

Bandar Lampung, Agustus 2022

Yang Menyatakan



  
(Rosyidatul Lutfiah)  
NPM. 2027011007

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Way Abung, Tulang Bawang Barat pada tanggal 11 Oktober 1996, sebagai anak pertama dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Marzuki dan Ibu Rohana.

Penulis mengawali pendidikan formal di TK Dharma Wanita pada tahun 2009, kemudian melanjutkan SD Negeri 4 Panaragan Jaya yang diselesaikan pada tahun 2010, melanjutkan di MTs. Darul Ulum yang diselesaikan pada tahun 2013 dan masuk SMA Negeri 1 Tulang Bawang Tengah yang diselesaikan pada tahun 2015 melalui jalur undangan/prestasi . Pada tahun 2015 penulis diterima di jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur tertulis Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Pada tahun 2020 penulis diterima dan dapat lanjut kuliah pada jenjang S2 di Program Studi Magister Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.

Selama menempuh pendidikan di program studi kimia, penulis pernah menjadi asisten Praktikum Kimia Organik I pada tahun 2020. Penulis menjadi mahasiswa magang pada bagian analisis di Unit Pelayanan Teknis Sentra Inovasi dan Teknologi mulai dari Tahun 2021- sekarang.



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

*“Dengan menyebut nama Allah Yang Maha Pengasih lagi  
Maha Penyayang”*

*Atas rahmat Allah SWT  
Kupersembahkan karya ini sebagai wujud bakti dan tanggung  
jawab kepada :*

*Kedua orang tuaku,  
Bapak Marzuki dan Ibu Rohana yang telah menyayangi,  
merawat, mendidik, mengajarkan kebaikan, dan selalu  
mendo'akan keberhasilanku dalam setiap sujud.*

*Adik-adikku serta keluarga besarku yang selalu memberikan  
semangat dan do'a yang terbaik.*

*Pembimbing penelitianku :  
Bapak Andi Setiawan, Ph.D.  
Bapak Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.  
Terimakasih atas ilmu, nasihat, dan kesabaran dalam  
membimbing selama ini.*

*Dosen Jurusan Kimia yang selalu membagi ilmunya untukku*

*Sahabat dan teman-temanku*


*Almamater Tercinta Universitas Lampung*



## MOTTO

“Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”  
(Al-Insyirah : 6)

“Man jadda wa jadda  
(siapa yang bersungguh-sungguh dia yang akan berhasil)”





## SANWACANA

Alhamdulillah segala puji hanya bagi Allah SWT, atas rahmat dan ridho-Nya Sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis yang berjudul “**Senyawa Bioaktif dari Fungi Endofit Mangrove dan Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Resisten, *S. aureus* dan *P. aeruginosa*.**”. Tesis ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister Sains di Program Studi Kimia FMIPA Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian tesis ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Penyemangat terbesar dalam hidup, Ibu Rohana dan Bapak Marzuki, yang selalu mendidik, memberikan kasih sayang, dukungan, doa, motivasi, dan semua yang terbaik kepada penulis hingga saat ini.
2. Dr. Andi Setiawan, Ph.D., selaku Pembimbing I dan pembimbing Akademik yang telah sabar membimbing, selalu memberikan motivasi, dukungan, mengarahkan penulis baik selama perkuliahan, maupun selama penelitian dan penulisan tesis.
3. Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., selaku pembimbing II yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi baik selama perkuliahan, penelitian, maupun saat penulisan tesis.

4. Prof. John Hendri, Ph.D., selaku Pembahas I yang banyak memberikan masukan, dukungan, dan kritik yang bersifat positif dan membangun.
5. Dr. Dian Herasari, M.Si., Pembahas II yang banyak memberikan masukan, dukungan, dan kritik yang bersifat positif dan membangun.
6. Prof. Dr. Buhani, M.Si., Pembahas III yang banyak memberikan masukan, dukungan, dan kritik yang bersifat positif dan membangun.
7. Dr. Nurhasanah, M.Si., selaku Ketua Program Studi Magister Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Dr. Eng Suropto Dwi Yuwono, S.Si., M.T., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
9. Bapak dan Ibu Dosen beserta staf jurusan, Kimia FMIPA Universitas Lampung, Bu Ni Luh, Pak Gani, Mas Nomo, Mba yuni yang telah membantu dan memberikan motivasi kepada penulis selama belajar di Universitas Lampung.
10. Adik tersayang, Rizal dan Bagus yang selalu memberikan dukungan, canda tawa, waktu, tenaga kepada penulis, serta bertanya kapan lulus semoga selalu diberikan berkah dan rahmat oleh Allah SWT.
11. Nurul huda awalla yang selalu memberikan dukungan, canda tawa, waktu, tenaga kepada penulis, serta memberikan semangat dan mau mendengarkan keluh kesah penulis. Semoga selalu diberikan berkah dan rahmat oleh Allah SWT.
12. Teman dari SD Nyunyun, Bukjo dan Nung yang selalu memberikan keceriaan, pengertian, waktu, dukungan, dan selalu menerima penulis apa adanya.
13. Manis manja Ayu Miranda, Desti, Rinda, Gita, dan Zu yang selalu memberikan semangat, waktu, dan canda tawa kepada penulis, semoga kita menjadi manusia yang lebih baik lagi.



14. Teman pantai Marfuah dan Gita yang selalu memberikan semangat, mau berbagi cerita dan mendengarkan keluh kesahku, semoga segera mendapatkan jodoh dan menjadi manusia yang lebih baik lagi.
15. Partner yang luar biasa, Siti Aisyah, Ika, Romando, Fatur, Kipang dan Reza atas bantuan, motivasi, kebersamaan, dan kerjasamanya.
16. Semua guru dan dosen yang telah membawa penulis sampai saat ini. Terimakasih untuk ilmu dan pembelajarannya di Universitas Lampung yang telah memberikan kesempatan penulis untuk menuntut ilmu.
17. Kepada semua pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan mereka Aamiin. Dalam penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan yang terjadi. Kritik dan saran sangat diharapkan penulis untuk perbaikan dalam penelitian selanjutnya. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat. Aamiin.

Bandar Lampung, Agustus 2022

Penulis,

Rosyidatul Lutfiah

## DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI.....	iii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR .....	vi
I. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang dan Masalah .....	1
1.2 Tujuan.....	3
1.3 Manfaat Penelitian.....	3
II. TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Fungi.....	4
2.2 Fungi Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif .....	5
2.3 Spons .....	7
2.4 Mangrove.....	10
2.5 Kultivasi dan Ko Kultivasi .....	13
2.6 Bakteri .....	13
2.6.1 Bakteri Patogen .....	13
2.6.2 Bakteri Resisten.....	17
2.7 Uji Antibakteri.....	18
2.7.1 Uji Antibakteri Resisten .....	18
2.7.2 Uji Antibakteri Menggunakan Rezazurin.....	21
2.8 Isolasi Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Ekstraksi .....	22
2.8.1 Ekstraksi .....	22
2.9 Pemurnian Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Kromatografi ....	24
2.9.1 Kromatografi .....	24
2.10 Karakterisasi Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Spektroskopi ..	30



2.10.1	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)</i> .....	30
III.	METODE PENELITIAN.....	32
3.1	Waktu dan Tempat Penelitian .....	32
3.2	Alat dan Bahan .....	32
3.3	Prosedur Penelitian .....	33
3.3.1.	Biomaterial .....	33
3.3.2.	Identifikasi Fungi Secara Makro dan Mikroskopik.....	34
3.3.3.	Filogenetik dan Sekuensing Fungi .....	34
3.3.4.	Uji Resistensi Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	35
3.3.5.	Kultivasi, Ko Kultivasi dan Ekstraksi .....	35
3.3.6.	Skrining Antibakteri terhadap Bakteri Klinis <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Resisten .....	36
3.3.7.	Pemurnian Senyawa Antibakteri .....	36
3.3.8.	Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri .....	37
IV.	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	38
4.1	Pengambilan sampel Biota Laut dan Mangrove.....	38
4.2	Skrining Ekstrak Fungi terhadap Antibakteri.....	43
4.3	Identifikasi Fungi Spons dan Endofit Fungi Mangrove .....	49
4.4	Filogenetik dan Sekuensing Fungi <i>derived-Spons</i> .....	50
4.5	<i>Scale Up</i> Kultivasi, Ko-kultivasi, Ekstraksi Fungi dari Spons dan Endofit Mangrove. ....	51
4.6	Uji <i>Bioassay</i> Bioaktif Isolat Fungi 18A12RF dari Spons dan 20CB07RF dari Mangrove. ....	56
4.7	Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Metabolit Sekunder.....	58
4.6.1	Fungi A12RF dari Spons Menggunakan Media Beras .....	58
4.6.2	Fungi A12RF dari Spons Menggunakan Media Kulit Udang .....	61
4.6.3	Pemurnian dan Pemisahan Fungi CB07RF dari Endofit Mangrove pada Media Beras .....	64
4.8	Karakterisasi Senyawa A12RFB0301 dan A12RFB0401 dari Fungi Spons.....	66

4.7.1. Spektrum dan Fragmentasi <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LCMS-MS) fraksi A12RFB0301 Fungi dari Spons .....	66
4.7.2. Spektrum dan Fragmentasi <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LCMS-MS) Fraksi A12RFB0401 dari Fungi Spons .....	69
V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	72
5.1 Kesimpulan.....	72
5.2 Saran .....	73
DAFTAR PUSTAKA .....	73
LAMPIRAN .....	82



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Resistensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CLSI, 2012).....	20
2. Resistensi <i>Staphylococcus aureus</i> (CLSI, 2012). ....	20
3. Isolasi fungi <i>derived</i> spons.....	39
4. Isolasi fungi endofit mangrove.....	41
5. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak fungi <i>derived</i> spons.....	43
6. Uji kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak fungi endofit mangrove.....	43

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Mikroskopik fungi dari Mangrove .....	4
2. Siklus hidup spons (Vacelet and Donadey., 1977). .....	8
3. Spons sumber senyawa bioaktif (Schmidt <i>et al.</i> , 2019) .....	8
4. Senyawa bioaktif Aspergione A (a) dan Clonostachysins A (b) dari fungi <i>derived</i> spons. ....	10
5. Mangrove Desa Sriminosari.....	10
6. Senyawa bioaktif Brocazine G (a) dan Phomoxanthone A (b).dari fungi endofit mangrove. ....	12
7. <i>Staphylococcus aureus</i> (Tong <i>et al.</i> , 2015).....	16
8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pasamba <i>et al.</i> , 2007).....	17
9. Mekanisme Resistensi Bakteri (Maisonneuve <i>et al.</i> , 2011).....	18
10. Mekanisme Kerja Rezazurin (O'Brien <i>et al.</i> , 2000).....	22
11. Contoh senyawa dan pola fragmentasi menggunakan LC-MS/MS (Arakkaveetil and Hatha, 2018).....	32
12. Morfologi fungi <i>derived</i> spons.....	40
13. Morfologi fungi endofit mangrove .....	42
14. Hasil uji resistensi <i>S. aureus</i> (a) dan <i>P.aeruginosa</i> (b).....	45
15. Hasil uji skrining antibakteri ekstrak media beras fungi spons terhadap <i>S.aureus</i> (a) dan <i>P.aeruginosa</i> (b). ....	46
16. Hasil uji skrining antibakteri ekstrak media beras fungi mangrove terhadap <i>S. aureus</i> (a) dan <i>P.aeruginosa</i> (b). ....	47
17. Fungi <i>derived</i> spons A12RF (1) makroskopik (a) dan mikroskopik 400x (b); Fungi endofit mangrove CB07RF (2) makroskopik (c) dan mikroskopik 400x (d).....	49

18. Pohon filogenetik fungi <i>Aspergillus nomiae</i> A12RF.....	51
19. Proses kultur <i>Solid state fermentation</i> (SSF) fungi dari spons A12RF pada media beras (2) dan fungi dari spons pada media kulit udang (b).....	52
20. Hasil uji kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak fungi dari spons A12RF pada media beras (a) dan kulit udang (b). ....	53
21. Proses kultur SSF ( <i>Solid state fermentation</i> ) fungi dari endofit mangrove CB07RF menggunakan media beras (a) dan fungi dari endofit mangrove CB07RF pada kulit udang (b).....	54
22. Hasil uji KLT ekstrak fungi dari endofit mangrove CB07RF pada media beras (a) dan kulit udang (b). ....	54
23. Hasil ekstrak A12RFB media beras. ....	58
24. Proses partisi ekstrak A12RFB ButOH (atas), Air (bawah). ....	58
25. Uji KLT hasil kolom fraksi ButOH A12RFB. ....	59
26. Uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) fraksi hasil kolom A12RFB..	59
27. Proses fraksinasi A12RFB03. ....	60
28. Uji KLT hasil penggabungan fraksinasi A12RFB0301 dan A12RF0302. ....	60
29. Uji MIC antibakteri fraksi A12RF dari spons terhadap <i>S.aureus</i> (a) dan <i>P.aeruginosa</i> (b) menggunakan resazurin. ....	61
30. Uji KLT hasil kolom A12RF pada media kulit udang. ....	62
31. Uji KLT hasil kolom A12RF04. ....	62
32. Uji KLT hasil kolom A12RF0401. ....	63
33. Uji MIC antibakteri fraksi A12RF dari spons terhadap <i>S. aureus</i> (a) dan <i>P.aeruginosa</i> (b) menggunakan resazurin. ....	63
34. Uji KLT hasil kolom CB07RF.....	65
35. Hasil Uji Antibakteri terhadap <i>S. aureus</i> (a) dan <i>P. aeruginosa</i> (b).....	65
36. Kromatogram UPLC dari LCMS-MS dari fraksi A12RFB0301.....	66
37. Pola fragmentasi LC-MS dari fraksi A12RFB0301.....	67
38. Fragmentasi senyawa A12RFB0301.....	68
39. Kromatogram UPLC LCMS-MS dari fraksi A12RFB0301.....	70
40. Pola fragmentasi fraksi A12RFB0401.....	71



# I. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang dan Masalah

Fenomena peningkatan resistensi bakteri menyebabkan bakteri mampu bertahan terhadap berbagai jenis antibiotik. Hal ini memberikan konsekuensi peningkatan terhadap kasus penyakit infeksi. Bakteri patogen yang mengalami peningkatan resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik (*multidrug*) dan virulensi meliputi *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacter* spp. dikenal sebagai bakteri ESKAPE. Bakteri ESKAPE bertanggung jawab atas sebagian besar penyakit infeksi karena mampu melawan senyawa antimikroba (Rice, 2008; Navidinia, 2016).

*Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) melaporkan kasus bakteri yang memiliki sifat resisten diantaranya *S. aureus* dan *P. aeruginosa*. Sebanyak 2.700 pasien telah meninggal dunia pada tahun 2017 akibat dari resistensi yang terjadi pada *P. aeruginosa* dan *S. aureus*. Kematian tersebut dilaporkan setelah kasus resistensi mampu menyerang manusia sebanyak 32.600 pada *P. aeruginosa* dan 323.700 pada *S. aureus*. Kasus resistensi bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* di Indonesia juga teramati sebesar 24% dari kasus infeksi yang tercatat (Severin *et al.*, 2008). Berdasarkan uraian di atas mengindikasikan, penurunan efektivitas antibiotik terhadap bakteri patogen resisten memberikan konsekuensi meningkatnya kebutuhan antibiotik jenis baru.

Kajian akhir-akhir ini, telah dilaporkan hasil pencarian senyawa bioaktif dari fungi yang berasal dari sumber-sumber baru seperti fungi *derived* spons dan fungi endofit mangrove. Seperti yang telah dilaporkan Yang *et al.* (2018) senyawa baru xanthone Isosecosterigmatocystin dari fungi endofit mangrove. Senyawa xanthone tersebut memiliki aktivitas antibakteri. Selanjutnya, telah berhasil diisolasi senyawa epidithiodiketopiperazine DC1149B yang berasal dari fungi *Trichoderma lixii* yang berasosiasi dengan spons dari perairan Indonesia (Tang *et al.*, 2019). Informasi tersebut mengindikasikan fungi merupakan sumber potensial sebagai senyawa bioaktif yang cukup diandalkan. Namun, sampai saat ini potensi fungi khususnya yang berasal dari spons dan mangrove belum di eksplorasi secara optimal.

Akhir-akhir ini, para peneliti melakukan pendekatan dalam pencarian senyawa bioaktif terutama pada fungi melalui teknik *solid state fermentation* (SFF). *Solid state fermentation* (SSF) menjadi salah satu alternatif dalam pencarian senyawa bioaktif. Hal ini dikarenakan teknik tersebut mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda dan relatif murah dan mudah di aplikasikan dalam skala laboratorium. Seperti yang telah dilaporkan oleh Setiawan *et al.* (2021) teknik SSF mampu menghasilkan senyawa yang diindikasikan memiliki kemiripan dengan senyawa analog Branimycin B yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri resisten klinis *S. aureus*. Kemudian, telah dilaporkan oleh Zhang *et al.* (2019) senyawa poliketida baru dari fungi endofit mangrove menggunakan teknik SSF dan memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Berdasarkan kajian literatur teknik SSF menunjukkan adanya senyawa yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, lingkungan, dan media.

Pada beberapa penelitian yang sudah dilakukan, didapatkan informasi kajian mengenai pencarian senyawa bioaktif terhadap bakteri resisten masih sangat terbatas. Di sisi lain, dalam pencarian senyawa bioaktif menggunakan mikroorganisme sering kali terkendala oleh hilangnya aktivitas yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut saat proses budidaya yang berulang. Permasalahan tersebut dapat disebabkan senyawa bioaktif tidak diproduksi oleh mikroorganisme dikarenakan tempat tumbuh (substrat) yang sudah nyaman. Oleh karena itu,

diperlukan strategi untuk mengatasi permasalahan tersebut, salah satunya melalui teknik ko-kultivasi yang bertujuan untuk mengaktifkan gen yang menghasilkan senyawa bioaktif. Hingga saat ini, studi mengenai ko-kultivasi dan pengaruhnya terhadap peningkatan senyawa bioaktif fungi masih sangat jarang dilakukan, terutama pada fungi mangrove dan spons. Selain itu, dilakukan pendekatan dengan teknik OSMAC (*One Strain Many Compound*) yang bertujuan untuk mendapatkan dan membandingkan informasi secara cepat dan tepat berdasarkan database.

Dalam penelitian ini, dilakukan kajian terkait senyawa bioaktif yang berasal dari fungi endofit mangrove dan spons yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri resistensi yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Kajian ini sangat penting sebagai langkah awal dalam pencarian senyawa baru yang mampu mengatasi resistensi bakteri.

## 1.2 Tujuan

Tujuan pada penelitian ini sebagai berikut

1. Mengisolasi dan mengidentifikasi fungi dari spons dan mangrove yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri resisten.
2. Mengultivasi dan mengkokultivasi fungi dengan teknik fermentasi padat untuk mendapatkan senyawa bioaktif fungi.
3. Melakukan uji antibakteri terhadap bakteri klinik yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotik (*S. aureus* dan *P. aeruginosa*).
4. Melakukan isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri.

## 1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini ditinjau dari aspek keanekaragaman hayati, diharapkan diperoleh informasi mengenai potensi fungi sebagai sumber bioaktif. Selain itu, informasi yang diperoleh dapat digunakan untuk pencarian senyawa baru yang

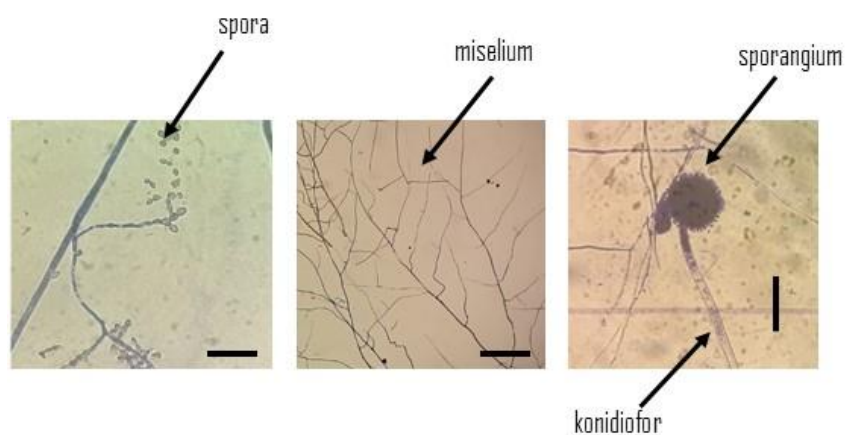


menunjang perkembangan ilmu kimia bahan alam dan peluang pengembangan aplikasi di bidang farmasi.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Fungi

Fungi merupakan mikroorganisme eukariotik yang menghasilkan enzim yang berfungsi untuk mencerna material organik di lingkungannya. Fungi memperbanyak diri dengan cara memproduksi spora. Identifikasi pada fungi dapat dilakukan melalui pendekatan makro-mikroskopis dan molekuler untuk mengetahui jenis fungi (Sibero *et al.*, 2017). Karakterisasi berdasarkan makroskopik diketahui melalui warna, bentuk, hifa dan kondisi. Karakterisasi mikroskopis dapat dilakukan dengan menggunakan metode *slide culture* (Nord *et al.*, 2019).



**Gambar 1.** Mikroskopik fungi dari Mangrove  
(Perbesaran 400x, Zeiss Imager A1)

Fungi termasuk dalam jenis eukariota memiliki kemampuan menyerap senyawa organik yang berasal dari lingkungan (heterotrof absorptif). Fungi umumnya terdiri dari hifa dengan dinding sel, dan biasanya bereproduksi dengan spora dengan satu atau beberapa sel. Pertumbuhan fungi memiliki beberapa fase diantaranya ialah fase lag, fase log, fase stationer dan fase kematian. Pertumbuhan fungi terjadi pada 2-4 hari pertama yang ditandai dengan adanya hifa, fungi mampu bertahan hidup sampai 21 hari. Sekitar 15-25% fungi telah berhasil diidentifikasi di seluruh dunia dan diperkirakan masih banyak yang belum teridentifikasi. Sekitar 75.000 spesies fungi telah teridentifikasi serta diperkirakan ada 1 hingga 1,5 juta spesies (Hawksworth *et al.*, 1995). Pada fungi terdapat hifa yang merupakan unit struktural dasar dari sebagian besar fungi. Hifa terdiri dari serangkaian kompartemen seluler yang berfilamen, bercabang, dan tumbuh secara *apically* (menjulung keatas) dengan dinding sel yang kurang lebih kaku, biasanya terdiri dari kitin dan glukukan. Kompartemen septa yang sering dibatasi, atau sel, dalam tanda hubung *Asco*, *Deutero* dan *Basidiomycota*. Beberapa kelompok fungi memiliki bentuk pertumbuhan hifa seperti terlihat pada **Gambar. 1**. Istilah kolektif untuk masa hifa yang timbul dari sumber umum adalah miselium (*mycelia*).

Fungi merupakan salah satu sumber yang memiliki potensi senyawa bioaktif yang sangat besar. Pendekatan baru perlu dirancang secara efisien untuk mengakses keragaman senyawa dalam pengembangan obat-obatan baru untuk mengatasi kesulitan terkait dengan pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen yang resisten (Butler *et al.*, 2014). Dalam upaya menghadapi masalah tersebut maka dilakukan fungi berasosiasi spons untuk memberikan keuntungan biologis dalam mengontrol produksi metabolit sekunder (Bugni *et al.*, 2004).

## 2.2 Fungi Sebagai Sumber Senyawa Bioaktif

Fungi laut dan mangrove sumber penting dalam menghasilkan metabolit sekunder yang berguna dalam pencarian senyawa bioaktif. Hasil senyawa metabolit fungi memiliki aktivitas yang beragam secara kimia seperti sifat antibakteri, antivirus,

dan antikanker. Secara umum, fungi telah di kenal sebagai penghasil senyawa metabolit yang ditunjukkan dengan hasil isolasi berbagai senyawa seperti *paclitaxel*, *camptothecin*, *vincristine*, *asam torreyanic* dan *cytarabine*. Fungi laut dapat menghasilkan metabolit sekunder bertujuan untuk mempertahankan diri dan komunikasi. Biosintesis dari metabolit sekunder tergantung pada faktor ekologi, fisik dan biologis, oleh karena itu perubahan dalam biosintesis dapat mempengaruhi produksi metabolit sekunder (Pejin and Maja, 2017). Fungi laut yang berhasil di isolasi diperkirakan sebanyak 10.000 spesies, sampai saat ini persentase yang relatif kecil dengan lingkungan laut berkisar ~ 1100 spesies secara eksklusif diambil dari lingkungan laut, meskipun perkiraan untuk jumlah spesies fungi berkisar dari 1,5 hingga lebih dari lima juta, kemungkinan kurang dari 10% fungi telah diidentifikasi. Fungi telah ditemukan pada habitat laut seperti sedimen, air, kayu apung, invertebrata sessile (spons), ganggang, dan mamalia laut, mulai dari lokasi dari laut dalam sampai ke permukaan air. Selain itu fungi juga terdapat di dalam organisme makhluk hidup atau biasanya disebut dengan endofit.

Endofit adalah mikroba yang dapat hidup di jaringan internal tanaman tanpa menyebabkan efek negatif langsung dan berlebihan (Stone *et al.*, 2000). Hampir pada semua spesies tanaman vaskular tampaknya dihuni oleh bakteri endofitik atau fungi, ini mewakili komponen penting keragaman mikroba. Hubungan antara tanaman inang dan endofitnya menunjukkan karakteristik simbiosis sebagai penghuni endofitik. Endofit tersebut biasanya mendapatkan nutrisi dan perlindungan dari tanaman inang yang memiliki kemampuan meningkatkan pertahanan inang dengan menghasilkan metabolit fungsional tertentu (Tan and Zou 2001). Namun, jika tanaman inang melemah, endofit juga dapat menjadi saprofit yang agresif dan dengan demikian menunjukkan adanya perubahan antara patogen simbiosis dan oportunistik (Schulz and Boyle, 2005). Endofit fungi adalah kelompok polifiletik terutama fungi *ascomycetes*, sedangkan *basidiomycetes*, *deuteromycetes* dan *oomycetes* jarang ditemukan. Meskipun mereka tidak menunjukkan spesifik host, garis keturunan fungi tertentu muncul dengan frekuensi yang lebih besar di tanaman yang mewakili golongan tertentu dengan demikian menunjukkan preferensi host. Konsisten dengan keragaman fungi endofitik yang



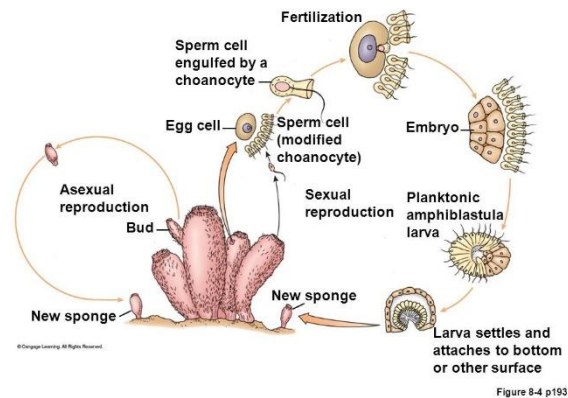
luar biasa dan peran ekologisnya adalah variasi kimia yang luar biasa dari metabolit sekunder yang memiliki aktivitas farmasi atau agrokimia yang menjanjikan dalam berbagai uji bioassays (Strobel *et al.*, 2004). Sedangkan pada tahun 1987 dan 2000 sekitar 140 bahan alam baru diisolasi dari fungi endofitik (Tan and Zou, 2001), jumlah serupa kemudian ditandai dalam setengah dari rentang waktu ini, yaitu antara 2000 dan 2006 (Zhang *et al.*, 2006). Seperti senyawa phomol yang memiliki aktivitas antibakteri yang berasal dari *Erythrina crista-galli* endofit *Phomopsis* sp. (Weber *et al.*, 2004).

Dibandingkan dengan fungi terrestrial, awal mulanya fungi yang berasal dari laut masih diabaikan (Gladfelter *et al.*, 2019). Namun, asumsi tersebut mulai di kesampingkan karena telah berhasil dilaporkan fungi yang berasal dari laut yang dipelajari hingga saat ini, dari habitat pesisir dangkal hingga terumbu karang mesohotik, ke laut dalam di seluruh dunia, dan dari daerah tropis ke laut kutub (Gladfelter *et al.*, 2019). Pada tahun 2011, hanya 537 taxa fungi laut yang telah diidentifikasi (yang secara eksklusif ditemukan di habitat laut atau estuarin) (Jones, 2011). Namun, data tersebut diperkirakan terus bertambah dengan perkiraan konservatif menunjukkan mungkin ada lebih dari 10.000 fungi laut yang dapat ditemukan (Jones, 2002 and Amend *et al.*, 2019). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya dilaporkan adanya kemungkinan fungi laut memainkan peran penting dalam siklus karbon laut (Wang *et al.*, 2012). Akibatnya, diperlukan pemahaman fungsi serta mengenai persebaran fungi laut menjadi sangat penting terutama jika dilihat dalam perubahan iklim yang cepat dan respon dari lautan. Fungi laut salah satunya adalah berasal dari mangrove dan spons namun, belum sepenuhnya dilaporkan fungi dan aktivitasnya.

### 2.3 Spons

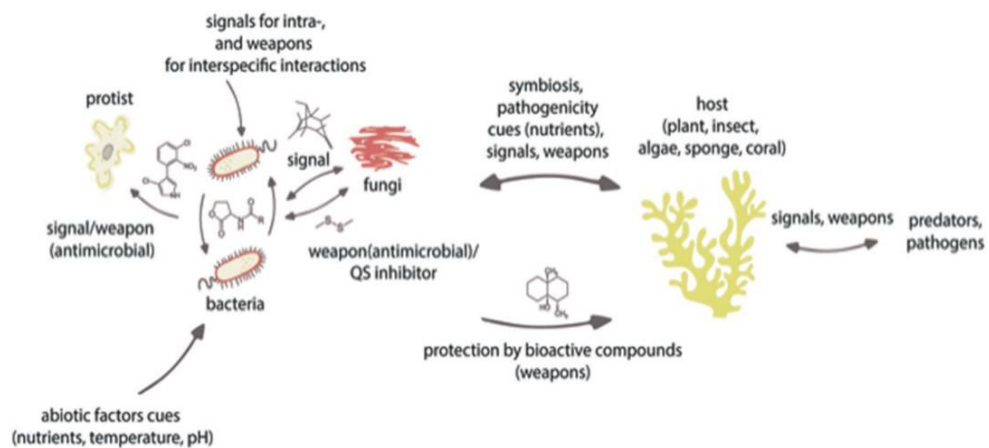
Spons merupakan sumber yang kaya senyawa metabolit dengan berbagai bioaktivitas dan struktural (Mayer *et al.*, 2010). Spons memiliki sifat *filter feeder* yang dapat menyimpan biota mikroba yang dapat terdiri dari sebanyak 40% dari

volume tubuh spons (Vacelet and Donadey., 1977). Namun, beberapa laporan menyatakan spons sebagai fermenter mikroba dapat menjadi tempat tumbuh beragam spesies fungi baru. Fungi yang berasal dari spons merupakan salah satu sumber terkaya dari banyak metabolit sekunder yang unik secara struktural dan aktif secara biologis di antara sumber laut.



**Gambar 2.** Siklus hidup spons (Vacelet and Donadey., 1977).

Menariknya, spons terus menjadi salah satu sumber yang paling penting untuk isolasi fungi yang menghasilkan metabolit sekunder (Höller *et al.* 2000, Bugni and Irelandia 2004), meskipun miselia fungi tumbuh di spons belum terbukti.



**Gambar 3.** Spons sumber senyawa bioaktif (Schmidt *et al.*, 2019)

Hasil studi molekuler dan berbasis budidaya menunjukkan bahwa kelompok mikroba di beberapa spons berbeda dari air laut di sekitarnya (Wilkinson, 1978) dengan mikroba spons spesifik dilaporkan dalam beberapa kasus (Wilkinson *et al.*, 1981). Sifat yang berpotensi unik dari asosiasi spons-mikroba, menjadi informasi yang sangat penting mengenai peran spons dari perspektif ekologi dan bioteknologi menjadikannya sistem yang ideal untuk pemeriksaan keragaman dan kekhususan dalam asosiasi prokariota-eukariota laut.

Akhir-akhir ini kajian mengenai fungi *derived* spons sangat menarik, dikarenakan spons merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif yang telah diketahui memiliki beragam aktivitas. Dasar pencarian senyawa bioaktif dari fungi *derived* spons disebabkan telah dilaporkan senyawa Jaspaklinolide L yang memiliki struktur mirip dengan metabolit yang dihasilkan oleh bakteri (Proksch *et al.*, 2002) dan di asumsikan berasal dari simbiosis spons dengan bakteri. Oleh karena itu, sangat menarik untuk mempelajari serta mencari senyawa yang berasal dari mikroorganisme yang terdapat pada spons.

Salah satu yang berhasil dilaporkan oleh Lin *et al.* (2003) senyawa Aspergione A seperti terlihat pada **Gambar. 4(a)** memiliki senyawa baru dari turunan chromon trisiklik yang berhasil di isolasi dari *fungi Aspergillus versicolor* dari spons laut *Xestospongia exigua* yang berasal dari Indonesia. Peptida merupakan rantai pendek asam amino yang dihubungkan oleh ikatan peptida. Peptida terdiri dari beberapa golongan yang didasarkan pada jumlah rantai. Rantai kurang dari sepuluh atau limabelas asam amino disebut oligopeptida, dan termasuk dipeptida, tripeptida, dan tetrapeptida. Polipeptida adalah rantai peptida yang lebih panjang, terus menerus, dan tidak bercabang. Salah satu senyawa peptida yang berhasil diisolasi adalah Clonostachysins A seperti terlihat pada **Gambar. 4(b)** diperoleh dari spons laut yang berasal dari *fungi Clonostachys rogersoniana* strain HJK9. Struktur tersebut ditentukan melalui spektroskopi sebagai peptida siklik yang terdiri dari N-metilasi dengan sembilan asam amino. Stereokimia absolut ditentukan oleh metode Marfey.



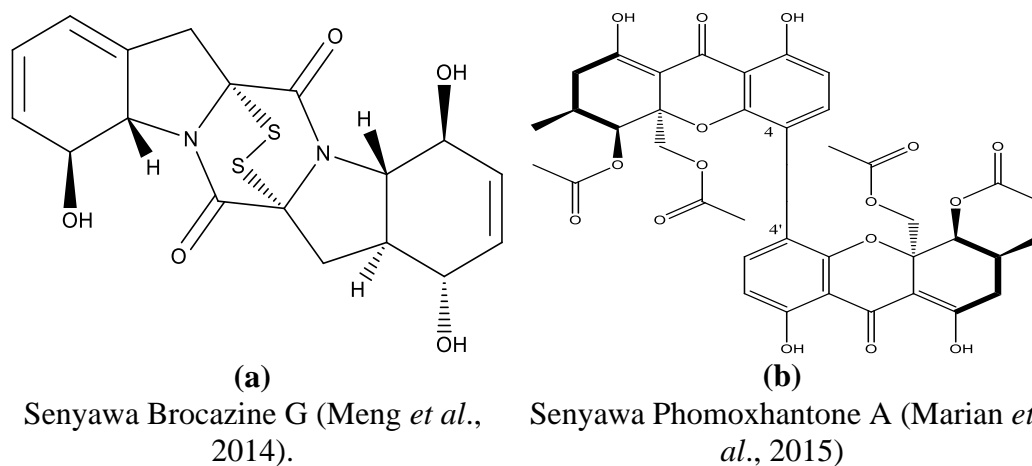
Keberadaan tanaman mangrove di interfase darat laut memiliki nilai signifikan dalam berkontribusi pada ekosistem pesisir terhadap pengelolaan lingkungan pesisir. Mangrove pada habitat khusus dapat mengalami stress patogenik dapat membantu melindungi gangguan pantai (Isabella *et al.*, 2012). Tanaman mangrove terdiri dari berbagai jenis yang dapat diketahui berdasarkan karakter morfologis, anatomi, dan reproduksi, terutama dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti salinitas, pH, dan kondisi tanah (Naskar and Mandal., 1999). Spesies mangrove tidak ada yang tumbuh dalam ekosistem terrestrial ataupun akuatik lain. Tomlinson mendefinisikan mangrove sejati dengan beberapa kriteria, termasuk eksklusif dalam ekosistem mangrove, adaptasi morfologis (misalnya: akar udara dan propagules yang tersebar di air), mekanisme fisiologis atau ekskresi garam, serta perbedaan taksonomi dari spesies terrestrial (setidaknya pada tingkat genetik), karakteristik tersebut belum tentu di miliki oleh spesies mangrove. Salah satu faktor habitat ekstrem yang paling utama mempengaruhi mangrove adalah salinitas tinggi. Salinitas tinggi dapat mengakibatkan sifat daun spesifik berikut dan sifat osmotik mangrove sejati: area daun spesifik yang lebih rendah, sukulen yang lebih tinggi, rasio  $K^+/Na^+$  yang lebih rendah, kandungan  $Na^+$  dan  $Cl^-$  yang lebih tinggi, dan karenanya osmolalitas yang lebih tinggi berbeda dengan tanaman semi-mangrove (Kathiresan and Bingham., 2001).

Berdasarkan jenis spesies tanaman, kondisi lingkungan dan faktor lainnya, sangat dimungkinkan terjadinya interaksi yang kompleks antara mikroorganisme fungi dengan tanaman mangrove (Wani *et al.*, 2015). Namun, aspek yang sangat penting dan perlu diperhitungkan dalam hal ini adalah pengaruh terhadap produksi senyawa metabolit sekunder. Kondisi ekologi mangrove menjadi hal yang menarik karena merefleksikan suatu senyawa dengan sifat bioaktif dari keragaman berbagai struktur senyawa fungi untuk di isolasi maupun disintesis (Chujo *et al.*, 2014). Terkait dengan pengembangan senyawa obat baru ataupun senyawa bioaktif baru. Hal ini karena ekosistem mangrove sebagai lingkungan ekstrem, yang menuntut berbagai adaptasi morfologis dan fisiologis dari spesies yang menghuni, potensi biosintetik yang sudah ada (Netzker *et al.*, 2015).



Fungi memiliki keberagaman senyawa bioaktif yang sangat penting dengan keberagaman yang sangat besar. Senyawa bioaktif yang dihasilkan memiliki keberagaman diantaranya adalah antibakteri, antiviral dan antifungi (De Souza *et al.*, 2011). Endofit fungi telah banyak dilaporkan dapat menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki sifat bioaktifitas diantaranya adalah antibakteri, antifungi, dan antiviral (De Souza *et al.*, 2011). Endofit mangrove dipilih sebagai salah satu penghasil senyawa bioaktif dikarenakan adanya interaksi peralihan dari darat ke laut.

Pada beberapa tahun terakhir, senyawa bioaktif yang berasal dari fungi endofit mangrove telah berhasil dilaporkan oleh Meng *et al.* (2014) senyawa Brocazine G yang termasuk dalam jenis senyawa alkaloid dapat dilihat pada **Gambar. 5 (a)** yang bersifat antibakteri terhadap *S. aureus* yang berasal dari *fungi Penicillium brocae* MA-231 endofit mangrove *Avicennia marina*. Kemudian, telah berhasil dilaporkan senyawa Phomoxanthone A memiliki sifat sitotoksik, antibakteri dan antifungi yang berasal dari *fungi Phomopsis longicolla* yang berasal dari endofit mangrove *Sonneratia caesularis* (Marian *et al.*, 2015). Struktur dapat dilihat pada **Gambar. 5 (b)**.



**Gambar 6.** Senyawa bioaktif Brocazine G (a) dan Phomoxanthone A (b).dari fungi endofit mangrove.

## 2.5 Kultivasi dan Ko Kultivasi

Senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi dapat diperoleh dengan teknik kultivasi pada media cair dan padat. Pada proses ko-kultivasi dengan media tumbuh dan nutrisi dari lingkungan yang berbeda mampu untuk merangsang produksi metabolit yang berbeda. Parameter yang bervariasi untuk merangsang pertumbuhan antara lain termasuk cahaya, pH, suhu, dan ketersediaan oksigen (Rateb *et al.*, 2013). Media yang bervariasi seperti sumber karbon, nitrogen, fosfor, garam anorganik atau kandungan logam (Kamdem *et al.*, 2017) mendukung dalam menghasilkan metabolit sekunder yang terkait dengan jenis interaksi yang terlibat (secara seksual, penghambatan pertumbuhan atau stimulasi, seperti pertahanan atau perebutan makanan). Namun, setiap parameter yang terdapat pada ko-kultivasi harus disesuaikan dengan pola perkembangan serta fisiologi fungi. Hal ini penting untuk optimalisasi aktivitas metabolisme selama pengembangan biomassa (Chen *et al.*, 2015). Dalam meningkatkan pencarian senyawa bahan alam jenis baru dilakukan teknik OSMAC (*One Strain Many Compounds*) melalui ko-kultivasi dengan mikroorganisme lain untuk mendapatkan induksi ekspresi gen biogenetik yang berbeda (Frank *et al.*, 2019).

## 2.6 Bakteri

### 2.6.1 Bakteri Patogen

Bakteri patogen termasuk dalam bakteri yang dapat menyebabkan penyakit. Sebagian besar spesies bakteri tidak berbahaya dan sering bermanfaat tetapi yang lain dapat menyebabkan penyakit menular. Jumlah spesies patogen ini pada manusia diperkirakan kurang dari seratus. Bakteri merupakan mikroorganisme ber sel tunggal dengan sel prokariotik, yang tidak memiliki organel atau inti sel dan kurang kompleks jika dibandingkan dengan sel eukariotik. Sebaliknya, DNA bakteri memiliki untai ganda dan berbentuk bulat yang terletak di dalam nukleoid. Bakteri

juga memiliki membrane sel dan dinding sel yang sering disebut dengan peptidoglikan (Masalha *et al.*, 2001).

Pertumbuhan ditandai adanya peningkatan jumlah kuantitas massa sel dengan cara terbentuknya sel-sel baru. Terjadi proses pertumbuhan tergantung dari kemampuan sel dalam membentuk protoplasma dari *nutrient* yang tersedia. Fase pertumbuhan bakteri merupakan fase pembelahan sel bakteri melalui beberapa fase yaitu fase lag, fase logaritma atau eksponensial, fase stationer, dan fase kematian.

#### 1. Fase Lag (Fase Penyesuaian)

Fase Lag merupakan fase penyesuaian bakteri dengan lingkungan yang baru. Waktu fase lag pada bakteri sangat bervariasi, tergantung pada komposisi media, pH, suhu, aerasi, jumlah sel pada inokulum awal dan sifat fisiologis mikro organisme pada media sebelumnya.

#### 2. Fase Logaritma atau eksponensial

Fase Logaritma atau eksponensial ditandai dengan terjadinya periode pertumbuhan yang cepat. Setiap sel dalam populasi membelah menjadi dua sel. Variasi derajat pertumbuhan bakteri pada fase eksponensial ini sangat dipengaruhi oleh sifat genetik yang diturunkannya.

#### 3. Fase Stationer

Fase stasioner terjadi pada saat laju pertumbuhan bakteri seimbang dengan laju kematiannya. Jumlah bakteri keseluruhan menjadi tetap. Keseimbangan jumlah keseluruhan bakteri ini terjadi karena adanya pengurangan derajat pembelahan sel. Hal ini disebabkan oleh kandungan nutrisi yang berkurang dan terjadi akumulasi produk toksik yang dapat mengganggu pembelahan sel. Fase stasioner ini dilanjutkan dengan fase kematian yang ditandai dengan peningkatan laju kematian yang melampaui laju pertumbuhan, secara keseluruhan terjadi penurunan populasi bakteri.

#### 4. Fase Kematian

Fase kematian merupakan fase dimana laju kematian lebih besar. Proses reproduksi bakteri terjadi melalui pembelahan biner yang merupakan pemisahan sel bakteri

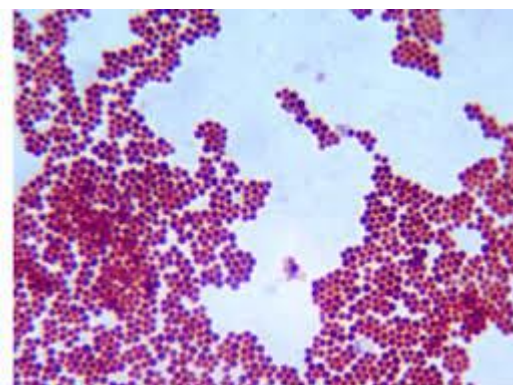
setelah mencapai ukuran tertentu. Bakteri bereproduksi secara aseksual, sel anak yang dihasilkan dari pembelahan biner memiliki DNA yang serupa dengan sel induk (Masalha *et al.*, 2001). Namun, beberapa bakteri juga dapat saling bertukar materi genetik satu dengan yang lainnya atau lebih dikenal dengan sebutan transfer gen horizontal. Berdasarkan dari bentuknya terdiri dari tiga bentuk utama bakteri sebagai berikut:

1. Cocci merupakan bakteri yang memiliki bentuk bulat atau bulat telur. Cocci tetap melekat setelah terjadi pembelahan biner dan terbentuk sel-sel baru. Sebagai *diplococcic* adalah *cocci* berpasangan, *streptococci* adalah rantai, dan *Staphylococci* adalah kelompok dari beberapa cocci.
2. Bakteri spiral memiliki bentuk spiral. Salah satunya ialah spirillum dengan bentuk spiral yang tebal serta kuat. Spirochetes adalah bakteri spiral yang tipis serta fleksibel. Vibrio adalah batang dengan bentuk koma dengan twist kecil.
3. Bacilli adalah bakteri berbentuk batang. Diplobasil merupakan bakteri berbentuk basil yang terdiri dari dua untai basil yang tersusun bersebelahan, sedangkan streptobasil merupakan basil yang berbentuk rantai.

Dinding sel yang terdapat pada bakteri memungkinkan terjadinya pewarnaan gram. Pewarnaan gram melibatkan hablur violet, yodium, dan safranin *counterstain* sebagai metode pewarnaan bakteri. Bakteri di golongan ke dalam dua jenis yaitu: gram-positif dan gram-negatif. Bakteri gram positif tampak violet karena memiliki kandungan dinding sel yang tebal yang terdiri dari kompleks hablur violet-iodine. Bakteri gram negatif memiliki dinding sel yang tipis yang mengakibatkan kompleks violet-iodin tidak mampu menahan. Hal ini membuat bakteri gram negatif tampak merah di bawah pewarnaan gram. Pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri secara umum. Namun, pewarnaan tersebut tidak dapat digunakan untuk mengidentifikasi bakteri pada tingkat spesies. Salah satu contoh dari bakteri gram positif dan negatif adalah *Staphylococcus aureus* (**Gambar. 7**) dan *Pseudomonas aeruginosa* (**Gambar. 8**) (Pasamba *et al.*, 2007).

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif dengan bentuk bulat memiliki ukuran diameter 0,5-1,5  $\mu\text{m}$ , kemungkinan memiliki kapsul berupa polisakarida. *S. aureus* non-motil dan tidak berspora dengan bentuk anaerob

fakultatif yang dapat memproduksi enzim katalase dan koagulase. *S. aureus* termasuk dalam anggota *Firmicutes* dan merupakan anggota mikrobiota yang sering ditemukan pada saluran pernapasan bagian atas dan kulit. Bakteri tersebut merupakan bakteri anaerob yang dapat melakukan pengurangan enzim katalase dan nitrat serta dapat tumbuh tanpa adanya oksigen (Tong *et al.*, 2015). *S. aureus* merupakan bakteri yang menyebabkan infeksi kulit seperti abses, infeksi pernapasan (sinusitis) dan keracunan makanan. WHO (2014) menyatakan sebanyak ribuan jenis bakteri *S. aureus* yang telah diteliti memiliki perkembangan revolusi gen. Pada bakteri yang telah mengalami revolusi menyebabkan kemampuan obat dalam menghambat serta membunuh bakteri mengalami berkurang keefektifannya. Berdasarkan laporan WHO (2017) menyatakan bahwa sebanyak 323.700 kasus infeksi yang terjadi karena *S. aureus* dengan korban meninggal sebanyak 10.600.



**Gambar 7.** *Staphylococcus aureus* (Tong *et al.*, 2015)

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif berukuran 0,5 hingga 0,8  $\mu\text{m}$  sebesar 1,5 hingga 3,0  $\mu\text{m}$ . Bakteri tersebut memiliki ciri-ciri berbintik abu serta memiliki flagel. Bakteri tersebut dapat tumbuh pada air dan tanah. Metabolisme pernapasan dan tidak pernah fermentatif, tetapi mampu tumbuh tanpa adanya  $\text{O}_2$  jika  $\text{NO}_3$  tersedia sebagai aksifikasi elektron pernapasan. Bakteri *Pseudomonas* di alam berbentuk dalam biofilm, melekat pada beberapa permukaan atau substrat, atau dalam bentuk planktonik, sebagai organisme uniseluler, aktif berenang menggunakan flagelnya.





**Gambar 8.** *Pseudomonas aeruginosa* (Pasamba *et al.*, 2007)

*Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen oportunistik, yang berarti memiliki kemampuan melawan pertahanan inang melalui proses infeksi. Bahkan, *Pseudomonas aeruginosa* adalah lambang patogen oportunistik manusia. Bakteri tidak dapat menginfeksi jaringan, namun hampir tidak ada jaringan yang tidak dapat terinfeksi jika pertahanan jaringan tidak dapat menahan serangan bakteri melalui proses yang disebut resistensi. Ini menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi sistem pernapasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, bakteriemia, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran pencernaan dan berbagai infeksi sistemik, terutama pada pasien dengan luka bakar parah dan pada pasien kanker dan AIDS yang immunosupresed. Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* adalah masalah serius pada pasien yang dirawat di rumah sakit dengan berbagai penyakit seperti kanker, fibrosis kistik, dan luka bakar.

### 2.6.2 Bakteri Resisten

Kemampuan bakteri dalam melakukan pertahanan hidup dengan mengubah metabolisme dan proses adaptasi melalui perubahan lingkungan dengan cepat disebut dengan resisten. Bakteri yang memiliki kemampuan melawan antibiotik adalah bakteri gram positif contohnya seperti *S. aureus* (Bigger, 1994), dan juga gram negatif seperti *P. aeruginosa* (Moker *et al.*, 2010). Kemampuan bakteri dalam



di standarisasi adalah metode difusi disk *Kirby-Bauer* merupakan alternatif yang efektif. Pada metode tersebut dilakukan dengan disk kertas filter 6 mm diresapi dengan konsentrasi senyawa antimikroba yang ditempatkan pada cawan dengan media *Mueller-Hinton* (MH), sampel kemudian terserap ke dalam disk agar. Tingkat difusi melalui agar tidak secepat tingkat ekstraksi antimikroba keluar dari disk, oleh karena itu konsentrasi antimikroba tertinggi paling dekat dengan disk dan pengurangan logaritmik dalam konsentrasi terjadi ketika jarak dari disk meningkat (Jorgensen *et al.*, 2007). Tingkat difusi antimikroba melalui agar tergantung pada sifat difusi dan kelarutan obat dalam media agar (Baeur *et al.*, 1996) dan berat molekul senyawa antimikroba. Molekul yang lebih besar mampu menyebar pada tingkat yang lebih lambat daripada senyawa berat molekul yang lebih rendah. Faktor-faktor ini, dalam kombinasi, mengakibatkan setiap antimikroba memiliki ukuran zona hambat (breakpoint) yang unik menunjukkan kemampuan bakteri menghambat terhadap senyawa antimikroba.

Jika media agar telah diinokulasi dengan suspensi patogen untuk diuji sebelum penempatan disk pada permukaan agar, maka dapat terjadi pertumbuhan simultan bakteri dan difusi senyawa antimikroba. Pertumbuhan terjadi pada senyawa antimikroba ketika bakteri mencapai masa kritis dan dapat mengalahkan efek penghambatan senyawa antimikroba. Perkiraan waktu suspensi bakteri untuk mencapai penghambatan adalah 4 hingga 10 jam untuk patogen yang paling umum, tetapi tidak semua mikroorganisme memiliki waktu penghambatan yang sama. Hal tersebut dibedakan karena masing-masing memiliki karakteristik dari setiap spesies, dan dipengaruhi oleh media dan suhu inkubasi (Jorgensen *et al.*, 2007). Ukuran zona penghambatan pertumbuhan dipengaruhi oleh kedalaman agar, karena difusi antimikroba dalam tiga dimensi, lapisan agar dapat menghasilkan zona penghambatan yang lebih besar daripada lapisan yang lebih dalam. Titik penghambatan dicapai ditunjukkan oleh lingkaran pertumbuhan bakteri yang di marginasi tajam di sekitar disk. Konsentrasi senyawa antimikroba pada margin ini disebut konsentrasi penghambatan dan kira-kira sama dengan konsentrasi penghambatan minimum yang diperoleh dalam tes resistensi pada dilusi.

Pada uji difusi disk memiliki standar yang digunakan untuk mengetahui konsentrasi pertumbuhan bakteri. Standar tersebut sering disebut kartu Wickerham yang merupakan kartu kecil dengan garis hitam parallel. Standar 0,5 *Mc-Farland* setara dengan suspensi bakteri yang mengandung antara  $1 \times 10^8$  dan  $2 \times 10^8$  CFU/mL pada *E. Colli*. Verifikasi kekeruhan standar yang digunakan dapat dilakukan menggunakan hasil penyerapan spektrofotometer pada 630nm (0.08-0.13) untuk standar 0.5 *Mc-Farland*. Organisme yang digunakan untuk proses uji harus dalam fase log pertumbuhan agar didapatkan hasil yang valid. Organisme yang digunakan disarankan berasal dari proses penumbuhan yang dilakukan sehari sebelumnya. Inokulum yang digunakan ialah inokulum hasil inkubasi selama 4-6 jam. Pada proses uji difusi disk tidak disarankan menggunakan inokulum yang telah diinkubasi selama semalam serta tidak dilakukan pengenceran dan tidak di standarisasi.

**Tabel 1.** Resistensi *Pseudomonas aeruginosa* (CLSI, 2012).

Antibiotik ( $\mu\text{g}$ )	Resisten	Intermediet	Susceptible
Amoxicillin (30)	$\leq 13$	15-20	$\geq 21$
Cefadroxil (30)	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
Ciprofloxacin (15)	$\leq 15$	16-20	$\geq 21$
Clindamycin (2)	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$
Chloramphenicol (30)	$\leq 12$	13-17	$\geq 18$
Doxycyclin hyclate (30)	$\leq 12$	13-15	$\geq 16$
Erythromycin (15)	$\leq 13$	14-22	$\geq 23$
Lincomycin (2)	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$

**Tabel 2.** Resistensi *Staphylococcus aureus* (CLSI, 2012).

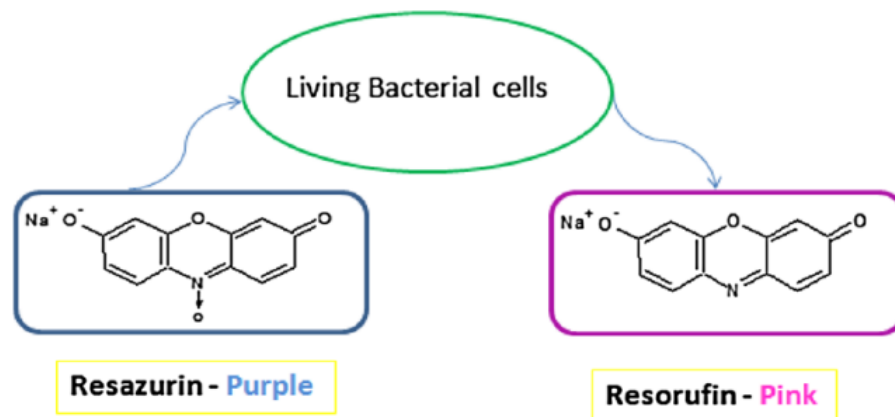
Antibiotik ( $\mu\text{g}$ )	Resisten	Intermediet	Susceptible
Cefazolin (30)	$\leq 14$	15-17	$\geq 18$
Clindamycin (2)	$\leq 14$	15-20	$\geq 21$
Erythromycin (15)	$\leq 13$	14-22	$\geq 23$
Gentamicin (10)	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Oxacillin (1)	$\leq 10$	11-12	$\geq 13$
Penicillin G (10)	$\leq 28$	--	$\geq 29$
Tobramycin (10)	$\leq 12$	13-14	$\geq 15$
Vancomycin (30)	--	--	$\geq 15$

### 2.7.2 Uji Antibakteri Menggunakan Rezazurin

Konsentrasi penghambatan minimal (MIC) salah satu indikator penentu dari potensi antimikroba, didefinisikan sebagai konsentrasi ( $\text{mg L}^{-1}$ ). Penghambatan tersebut didasarkan pada pencegahan pertumbuhan bakteri dalam kondisi yang ditentukan (Wiegand *et al.*, 2008). Metode difusi disk sering dilaporkan sebagai indikator kualitatif untuk menguji aktivitas antimikroba senyawa bahan alam (Yemoa *et al.* 2011). Metode pengujian tersebut distandarisasi oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) untuk pengujian antibiotik (*The Clinical and Laboratory Standards Institute* M100-S22, Volume 32 No 3).

Saat ini, tidak ada kriteria interpretasi untuk hasil uji senyawa bahan alam dalam menggunakan metode difusi disk. Pada uji difusi disk hanya dapat menawarkan zona hasil indikatif penghambatan. Selain itu, beberapa masalah teknis dapat berkontribusi pada kurangnya akurasi metode ini, seperti polaritas senyawa bahan alam yang mungkin berperan dalam tingkat difusi (Sanchez and Kouznetsov, 2010).

Mikrodilusi adalah metode kuantitatif yang dapat digunakan untuk menentukan nilai MIC (Kim *et al.*, 2007). Metode mikrodilusi ditingkatkan melalui penambahan pewarna rezazurin sebagai indikator redoks, yang mengatasi masalah yang terkait dengan bahan uji yang memiliki kelarutan kecil. Pada uji menggunakan rezazurin sel bakteri aktif mengurangi rezazurin *non-fluorescent* (biru) ke resorufin *fluorescent* (merah muda) yang dapat dikurangi lebih lanjut menjadi hidroresorufin (O'Brien *et al.*, 2000) seperti yang ditunjukkan pada **Gambar. 14** memberikan ukuran terukur langsung dari aktivitas metabolisme bakteri.



**Gambar 10.** Mekanisme Kerja Rezazurin (O'Brien *et al.*, 2000).

Telah dilaporkan penggunaan berbagai konsentrasi pewarna resazurin, beberapa di antaranya secara signifikan lebih tinggi. Ketika konsentrasi resazurin yang lebih tinggi ini diuji dengan kontrol bakteri yang resisten, hasil negatif diamati, yang dapat dikaitkan dengan kurangnya kemampuan bakteri untuk memetabolisme resazurin pada metode dilusi (Singh *et al.*, 2014).

## 2.8 Isolasi Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Ekstraksi

### 2.8.1 Ekstraksi

Pada dasarnya, semua jenis metode kromatografi menggunakan ekstraksi zat terlarut antara fase diam dan bergerak untuk memisahkannya. Untuk lebih mudah dipahami maka, istilah koefisien partisi menggunakan simbol hukum  $K_D$  (koefisien distribusi).

$$K_D = \frac{C_o}{C_a}$$

$K_D$  = koefisien distribusi atau koefisien partisi

$C_o$  = konsentrasi zat organik

$C_a$  = konsentrasi zat air



Pada kondisi ideal dan tidak terjadi asosiasi, disosiasi atau polimerisasi, maka harga  $K_D$  sama dengan harga angka banding distribusi (D). Angka banding distribusi menyatakan perbandingan konsentrasi total zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air. Berdasarkan ketentuan tersebut zat yang terekstraksi dapat ditentukan dengan persamaan berikut :

$$\% E = \frac{100 D}{D + \frac{V_A}{V_O}}$$

Persamaan di atas dapat dibuktikan bahwa banyaknya zat yang akan terekstrak semakin besar jika harga  $v/v$  diperkecil, artinya sama dengan memperbesar volume fasa organik. Namun demikian dapat dibuktikan bahwa proses ekstraksi akan semakin efisien, jika ekstraksi dilakukan secara berulang kali dengan jumlah volume fasa organik yang sama. Bila  $n$  kali ekstraksi secara terpisah dengan menggunakan volume fasa organik yang sama, maka banyaknya zat terlarut yang tertinggal dalam fasa air adalah :

$$W_n = WA \left( \frac{V_A}{DV_O + V_A} \right)^n$$

(Berthod and Carda-Broch, 2004).

Etil asetat banyak digunakan dalam ekstraksi fungi endofit (Bhardwaj *et al.*, 2015) selain etil asetat biasanya digunakan metanol. Sebagai pelarut etil asetat memiliki polaritas sedang dan memiliki kemampuan untuk melarutkan senyawa bioaktif polar dan non-polar dan pelarut metanol menjadi pelarut polar dapat melarutkan hampir semua senyawa organik, bahkan polar, semi polar dan non-polar. Namun, selain pemisahan senyawa, pelarut tidak memiliki efek terhadap aktivitas antimikroba dari ekstrak fungi karena ekstrak menguap di bawah tekanan menggunakan evaporator. Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini meliputi:

#### **a. Maserasi**

Maserasi dilakukan dengan perendaman sampel menggunakan pelarut organik pada suhu ruang. Maserasi merupakan ekstraksi dingin dan yang paling sederhana, di mana pelarut akan menembus dinding sel dan memasuki rongga sel yang mengandung zat aktif dan menyebabkan larutan terkonsentrasi akan

didorong keluar dari sel karena perbedaan konsentrasi antara larutan di luar dan di dalam sel (Wojdylo *et al.*, 2020). Selain itu, maserasi sangat sederhana dengan waktu ekstraksi yang lama dan efisiensi ekstraksi yang rendah (Zhang *et al.*, 2018)

#### **b. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)**

Ekstraksi cair-cair (partisi) dilakukan untuk pemisahan berdasarkan perbedaan distribusi senyawa kimia di dalam 2 fase pelarut yang tidak saling bercampur. Fase yang digunakan biasanya fase air dan fase lainnya merupakan pelarut organik seperti *n*-heksana, dietil eter, etil asetat, atau kloroform. Adanya perbedaan polaritas berat jenis pada masing-masing pelarut menyebabkan terbentuknya dua fase yang saling tidak tercampur.

### **2.9 Pemurnian Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Kromatografi**

#### **2.9.1 Kromatografi**

Kromatografi salah satu metode pemisahan komponen suatu sampel didasarkan atas perbedaan laju distribusi komponen sampel diantara dua sampel yang tidak saling melarut. Metode kromatografi yang berfungsi memisahkan senyawa memanfaatkan sifat-sifat fisik dari sampel seperti kelarutan, adsorpsi, keatsirian, dan kepolaran. Kromatografi sangat umum diterapkan pada serangkaian metode pemisahan yang menggunakan sistem dengan dua fase; fase gerak dan fase stasioner. Analit dalam campuran yang dipisahkan berinteraksi dengan fase stasioner dengan afinitas yang berbeda. Saat bergerak melalui sistem, yang dibawa oleh fase gerak, analit dengan afinitas rendah untuk fase stasioner cenderung bergerak bersama dengan cepat, sementara yang memiliki afinitas tinggi akan cenderung tertinggal. Pada penelitian ini dilakukan pemisahan komponen dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan kromatografi kolom (KK).

### 2.9.1.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT bertujuan untuk memisahkan komponen-komponen dengan perbedaan adsorpsi atau partisi antara fasa diam dengan pergerakan dari pelarut atau eluen (Hostettman *et al.*, 1995). Senyawa yang terserap pada fase diam dengan kuat tidak dapat bergerak jauh dibandingkan dengan senyawa yang terserap lebih lemah. Kekuatan intermolekuler yang mempengaruhi keterbelakangan komponen yang berdasarkan Hukum *Coulomb* seperti menarik suka-daya tarik terjadi antara molekul dengan sifat elektrostatis yang sama tetapi molekul dengan sifat berbeda ditolak. Interaksi elektrostatis antara molekul adalah dari dua jenis utama : Kekuatan retensi polar *van der Waals* yang timbul dari interaksi antara molekul yang memiliki muatan permukaan; dan kekuatan dispersi non polar antara molekul netral atau gugus fungsi.

Gaya intermolekuler mempengaruhi komponen yang didasarkan pada hukum *Coulomb* seperti gaya tarik menarik yang terjadi antara molekul dengan sifat elektrostatis yang sama namun, molekul dengan sifat berbeda ditolak. Interaksi elektrostatis antara molekul ditandai dengan 2 tipe yaitu:

- a. Kekuatan retensi polar *van der Waals* dihasilkan dari interaksi antar molekul yang memiliki muatan permukaan dan
- b. Kekuatan dispersi non polar antara molekul netral atau gugus fungsi.

Hasil KLT menunjukkan adanya informasi seperti kandungan komponen dalam sampel serta kepolaran komponen dalam suatu senyawa. Pendeteksian bercak dalam KLT meliputi 2 cara yaitu secara kimia dan fisika. Deteksi bercak dengan cara fisika, digunakan sinar UV. Metode deteksi dengan sinar UV mampu menunjukkan penampakan senyawa yang berfluoresensi. Senyawa yang menyerap sinar UV dapat terlihat gelap di bawah UV. Sinar UV yang sering digunakan memiliki panjang gelombang yaitu 254nm (paling rendah) dan 366nm (paling tinggi). Suatu senyawa alkaloid dapat dideteksi menggunakan teknik KLT dengan metode visualisasi yang umum digunakan yaitu *Dragendorff* dan serum sulfat. Pereaksi *Dragendorff* menunjukkan adanya kandungan senyawa alkaloid (N tersier) dalam senyawa di tandai timbulnya noda *orange* pada hasil uji KLT.

Pereaksi serium sulfat menghasilkan noda berwarna hitam kecoklatan yang menunjukkan adanya senyawa organik dalam sampel. Komponen suatu senyawa dalam sampel diukur berdasarkan perbandingan jarak elusi yang ditempuh dengan jarak tempuh atau diketahui sebagai (*Retention factor*), berdasarkan cara sistematis dapat dituliskan sebagai berikut:

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

Hasil identifikasi berdasarkan nilai  $R_f$  dengan nilai sama maka senyawa yang dihasilkan memiliki karakteristik yang sama atau mirip. Bila nilai  $R_f$  yang dihasilkan berbeda, menunjukkan senyawa yang dihasilkan merupakan senyawa lain. Pada saat uji kromatografi lapis tipis  $R_f$  yang baik tidak lebih dari 0,5 (Tsuda, 2004).

### 2.9.1.2 Kromatografi Kolom (KK)

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan komponen suatu senyawa bahan alam khususnya metabolit sekunder. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan daya serap atau partisi fase diam terhadap komponen-komponen sampel yang dipisahkan oleh fase gerak (eluen). Pelarut (fase gerak) bergerak keatas sedangkan fasa diam dibiarkan mengalir dalam kolom kaca. Berdasarkan gaya gravitasi terhadap sampel tersebut menyebabkan adanya kesetimbangan antara zat terlarut yang diadsorbsi adsorben dan pelarut yang mengalir melewati kolom, yang mengakibatkan adanya pola pemisahan pada masing-masing komponen berdasarkan sifat kepolarannya (Poole, 2009). Berdasarkan sifat kepolarannya fasa diam pada pemisahan kromatografi dibagi menjadi 2 yaitu:

#### a. Kromatografi Fase Normal

Kromatografi fase normal, atau disebut adsorpsi atau kromatografi cair - padat. Dalam kromatografi fase normal, komponen sampel dipertahankan pada fase

stasioner melalui interaksi dipol permanen pada komponen dengan dipol permanen pada fase stasioner. Proses tersebut menghasilkan mekanisme adsorpsi dan metode kromatografi adsorpsi di mana fase stasioner polar dan fase bergerak non-polar digunakan. Dengan mode pemisahan ini, semakin polar zat terlarut, semakin besar retensi meningkatkan polaritas fase seluler menghasilkan penurunan retensi zat terlarut.

### **1. Mekanisme Normal-Fase Kromatografi**

Retensi pada fase normal, atau adsorpsi serta kromatografi disebabkan oleh interaksi gugus fungsi polar pada zat terlarut dengan permukaan fase stasioner. Selektivitas pemisahan tergantung pada kekuatan relatif dari interaksi polar untuk zat terlarut yang berbeda. Sejauh mana zat terlarut dapat ditampung pada fase stasioner tergantung pada konfigurasi spasialnya dan kemampuannya untuk membentuk ikatan hidrogen dengan adsorben. Oleh karena itu, mode kromatografi ini sensitif terhadap perbedaan spasial (atau sterik) dalam zat terlarut dan umumnya lebih cocok untuk pemisahan isomer daripada kromatografi fase terbalik (Synder *et al.*, 1979). Kromatografi fase normal menunjukkan kemampuan unik untuk membedakan antara zat terlarut dengan jumlah atom elektronegatif yang berbeda, seperti oksigen atau nitrogen, atau molekul dengan gugus fungsi yang berbeda. Oleh karena itu, kromatografi adsorpsi banyak digunakan untuk pemisahan (Synder *et al.*, 1979). Sejumlah mekanisme telah diusulkan untuk memperhitungkan sifat proses adsorpsi (Yashin, Y.I., 1982). Dalam kasus senyawa non-polar dan semi polar, yang berinteraksi dengan permukaan adsorben sebagian besar oleh interaksi dipol dispersif dan lemah, model kompetisi mengasumsikan bahwa seluruh permukaan adsorben ditutupi oleh monolayer molekul fase seluler (Synder *et al.*, 1979).

Secara umum, karakteristik retensi dan pemisahan pada silika dan alumina mirip dengan sampel yang lebih polar yang dipertahankan lebih kuat. Urutan elusi yang biasa adalah: hidrokarbon jenuh < olefins < hidrokarbon aromatik  $\approx$  halida

organik < sulfida < eter < senyawa nitro < aldehida ester ≈keton < alkohol≈amina < sulfone < sulfoksida < amida < asam karboksilat (Synder *et al.*, 1979).

Dalam kromatografi fase normal, permukaan adsorben terdiri dari sisi adsorpsi, yang memiliki kesamaan dengan gugus fungsi pada penukar ion. Dalam kasus silika, sisi adsorpsi adalah gugus hidroksil (-OH) dan (-Si-OH) yang dikenal sebagai gugus silanol. Untuk menghindari adanya kerusakan pada gugus silanol perlu dilakukan proses perawatan sebelum digunakan. Perawatan yang dapat dilakukan salah satunya adalah memanaskan silika dalam kondisi air dan asam yang sesuai.

## **b. Kromatografi Fasa Terbalik**

Kromatografi fase terbalik atau kromatografi fase terikat merupakan yang paling banyak digunakan dari metode pemisahan kromatografi cair. Telah dilaporkan bahwa lebih dari 75% dari semua pemisahan HPLC dilakukan dengan pendekatan ini. Istilah fase terbalik muncul dari fakta bahwa mode pemisahan ini menggunakan fase stasioner non-polar dengan fase polar, yang merupakan kebalikan dari situasi dalam kromatografi fase normal (adsorpsi). Mekanisme kromatografi fase terbalik bersifat kompleks dan komponen sampel dipertahankan melalui interaksi hidrofobik nonspesifik dengan fase stasioner. Metode pemisahan ini, semakin polar zat terlarut, semakin rendah retensinya.

### **1. Mekanisme Kromatografi Fasa Terbalik**

Pemisahan dalam kromatografi cair fase terbalik (RPLC) lebih sulit dijelaskan daripada interaksi polar-polar sederhana dari kromatografi fase normal. Interaksi antara molekul terlarut dan fase stasioner non-polar terlalu lemah untuk memperhitungkan tingkat retensi zat terlarut yang diamati dalam RPLC. Mekanisme retensinya kompleks dan dapat digambarkan sebagai kombinasi partisi dan adsorpsi. Dalam sejumlah kasus, RPLC telah disebut sebagai kromatografi partisi, karena lapisan permukaan organik terikat dapat dianggap sebagai film cair terikat, meskipun pekerja lain telah menyimpulkan bahwa fase

terikat bertindak lebih seperti padatan yang dimodifikasi daripada cair (Locke, D. 1974).

Selain itu, sifat heterogen dari bahan berbasis silika menunjukkan mekanisme yang berbeda. Selain itu, mekanisme ini tidak selalu konstan selama seluruh rentang komposisi fase bergerak karena pelarutan situs pengikatan pada permukaan fase stasioner sangat dipengaruhi oleh komposisi fase bergerak. Secara umum bahwa teori solfopobik menawarkan interpretasi retensi RPLC yang paling valid. Mekanisme ini, yang mungkin paling sesuai ketika menggunakan fase seluler berair dengan kandungan pengubah organik rendah, didasarkan pada asumsi bahwa fase stasioner adalah lapisan seragam ligan non-polar. Teori solfopobik mengasumsikan bahwa zat terlarut mengikat ke fase stasioner yang kemudian mengurangi luas permukaan zat terlarut yang terpapar ke fase bergerak. Zat terlarut disortir sebagai hasil dari efek pelarut ini; yaitu, zat terlarut disortir karena solfofobik.

Oleh karena itu, zat terlarut lebih dipertahankan sebagai hasil dari interaksi (solfopobik) dengan fase seluler melalui interaksi spesifik dengan fase stasioner. Fakta bahwa retensi terjadi terutama sebagai akibat dari interaksi yang kuat antara fase bergerak dan molekul terlarut menunjukkan bahwa komposisi fase bergerak memiliki pengaruh lebih besar pada selektivitas pemisahan daripada fase stasioner dalam metode kromatografi ini (Snyder *et al.*, 1988). Sementara variasi dalam komposisi fase bergerak adalah cara paling umum untuk mengubah selektivitas pemisahan dalam RPLC, perbedaan yang cukup besar dalam selektivitas ada antara kolom fase terikat yang berbeda. Sejumlah besar kolom fase terikat silika tersedia dan perbedaan halus dalam selektivitasnya sering kali berarti bahwa pemisahan pada jenis kolom yang tampaknya serupa dapat menunjukkan perbedaan yang cukup besar



## 2.10 Karakterisasi Senyawa Bioaktif Menggunakan Metode Spektroskopi

Spektroskopi mempelajari tentang metode menganalisis spektrum suatu senyawa dan interaksi antara radiasi elektromagnetik. Teknik spektroskopi dapat digunakan untuk menentukan struktur dari senyawa organik tersebut. Metode spektroskopi yang dipakai pada penelitian adalah *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).

### 2.10.1 *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS).

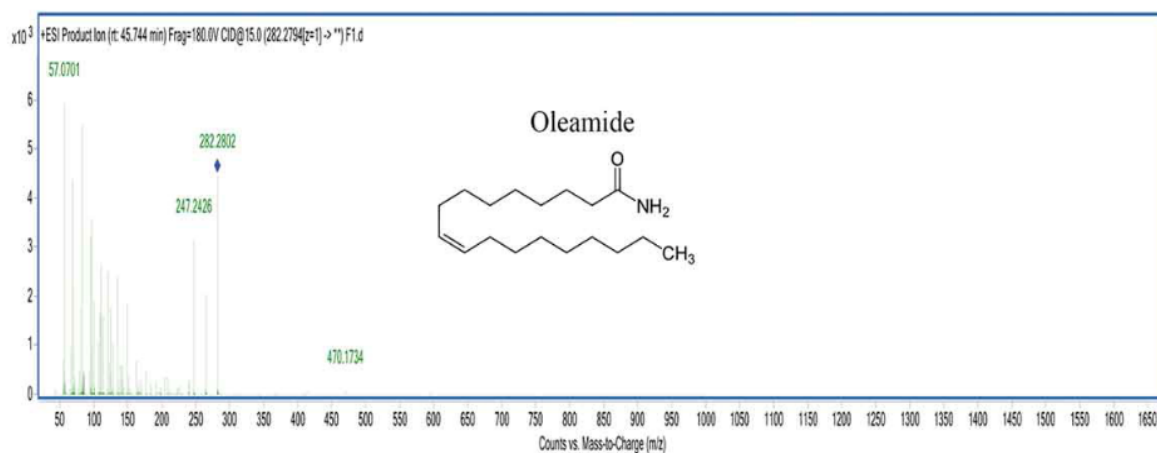
Kromatografi cair-spektrometri massa (LC-MS) salah satu teknik analitik yang menggabungkan kromatografi cair menggunakan deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair (LC) memisahkan komponen sampel dan kemudian melanjutkan ke spektrometer massa (MS). MS membuat dan mendeteksi ion bermuatan. Data LC-MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas, dan kuantitas komponen sampel tertentu. LC-MS secara signifikan memperluas penggunaan analitis spektrometri massa yang efektif ke sejumlah besar senyawa organik. Metode berbasis LC dan LC-MS dapat diterapkan pada sebagian besar senyawa organik. Jenis sampel berkisar dari senyawa farmasi kecil hingga protein besar. Konsep spektrometri massa relatif sederhana: Senyawa terionisasi (metode ioniniasi), ion dipisahkan berdasarkan rasio massa / muatan (metode pemisahan ion), dan jumlah ion yang mewakili setiap massa/*charge* "unit" dicatat sebagai spektrum. Misalnya, dalam spektrometer massa membombardir molekul dalam fase uap dengan sinar elektron berenergi tinggi dan mencatat hasilnya sebagai spektrum ion positif, yang telah dipisahkan berdasarkan massa / muatan ( $m/z$ ).

Spektrometer massa yang dikombinasikan dengan kromatogram cair dapat mendeteksi karakteristik massa dari senyawa. Sistem ini dapat secara selektif mendeteksi senyawa yang menarik dalam matriks yang kompleks, yang memudahkan untuk menemukan dan mengidentifikasi senyawa. Beberapa

komponen yang harus terdapat dalam MS yaitu sumber ion dan analisis massa. Komponen tersebut memiliki beberapa jenis yang akan disesuaikan berdasarkan tingkat kepolaran senyawa dengan kelebihan dan kekurangan. Sumber ion yang digunakan pada penelitian adalah sumber ion jenis *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI), berdasarkan pedoman *Agilent Tech* (2011) metode ini menggunakan eluen yang disemprotkan pada suhu tinggi (200-400°C) pada tekanan atmosfer. Fase gas pelarut yang dihasilkan akan terionisasi dan ion-ionnya mentransfer muatan pada molekul analit. Ion dari analit melewati pipa kapiler menuju spektrometer massa. APCI biasanya digunakan pada kromatografi fase normal hal ini dikarenakan analit yang digunakan pada fasa normal. Sistem LC menggunakan alliance 2695 lengkap dengan autosampler, degaser, dan pemanas kolom. Sistem MS menggunakan ZQ 2000 *single quadrupole*. Kemudian diperoleh data dengan menggunakan *software Masslynx*® 4.0. Kolom yang digunakan adalah C18 150 x 2, 1 mm dengan fasa gerak asetonitril: air (0, 01% asam asetat) dengan laju alir 0, 5 mL/menit. LC-MS/MS digunakan untuk menganalisa senyawa yang sangat nonpolar dengan laju alir rendah. Penganalisa massa yang digunakan yaitu analisa massa *Quadrupole*, metode ini terdiri atas empat batang parallel yang diatur untuk dilewati aliran ion analit. Pada proses tersebut bertujuan untuk menentukan rasio massa dari senyawa yang dianalisa mampu melewati bagian filter pada waktu tertentu. Penilaian yang benar terhadap massa molekul (M) seringkali tidak mudah hal ini karena fragmentasi pada senyawa dan membentuk fragmen-fragmen yang membentuk ion-ion yang salah seperti  $[M+Na]^+$ ,  $[M+NH_4]^+$  atau  $[M-H_2O+H]^+$  sebagai  $[M+H]^+$  (Nielsen *et al.*, 2011) atau karena rendahnya kelimpahan ion  $[M+H]^+$  karena ionisasi yang buruk dalam kondisi yang dipilih. Sensitivitas deteksi yang tinggi dicapai dengan memantau nilai  $m/z$  yang akurat dari ion yang diprotonasi atau dinonaktifkan atau fragmennya. Kuantitasi dilakukan dengan membandingkan area puncak dalam kromatogram ion sampel yang diekstrak dengan standarnya dalam solusi standar kalibrasi eksternal yang berisi standar referensi.

Akhir-akhir ini, telah dilaporkan senyawa (Z)-Octadec-9-enamide (oleamide) dari *Penicillium* sp. yang berhasil diisolasi dari sedimen laut. Senyawa oleamide tersebut berhasil diidentifikasi menggunakan LCMS-MS  $(M+H)^+$  dengan puncak

utama  $m/z$  282.87 seperti terlihat pada **Gambar. 11**. MS fragmentasinya terdiri dari puncak spesifik: 57.0701, 282.2802, and 247. 2426 (Arakkaveetil and Hatha, 2018).



**Gambar 11.** Contoh senyawa dan pola fragmentasi menggunakan LC-MS/MS (Arakkaveetil and Hatha, 2018)

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2021 sampai April 2022 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Analisis *Microscope* Axioo Zeiss Imager A1, dan *Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrophotometer* (LC-MS) (ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, USA), ACQUITY UPLC® HSS C18 coloumn (Waters, Beverly, MA, USA) and Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (Waters, Beverly, MA, USA) dilakukan di pusat Laboratorium Forensik Kepolisian Republik Indonesia, Sentul, Bogor, Indonesia.

#### 3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah alat-alat gelas diantaranya gelas kimia, pipet tetes, erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, batang pengaduk, mikropipet, pinset, gunting, *cutter*, *loop* ose, cover slip, oven, lampu spiritus, *hot plate*, spatula logam, karet gelang, spidol, *microplate* 96 well (Iwaki), mikropipet 10-100 µL (DragonLab), autoclave Tomy SX-700, dan neraca analitik Wigen Houser, *rotary evaporator* Buchii/R210, *Laminar air flow* (ESCO) *Incubator* Memmert-Germany/INC-02, Mikroskop cahaya axio Zeiss A1. Seperangkat alat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan plat kaca alumunium silica gel DC kiesegel 60 F<sub>254</sub>, lampu UV Kohler/SN402006, serta kolom kaca digunakan untuk pemurnian senyawa bioaktif, dan *Liquid Chromatography-Mass Spechtrometry* (LC-MS) ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly,

MA, USA), ACQUITY UPLC® HSS C18 coloumn (Waters, Beverly, MA, USA) and Xevo G2-S Qtof *Mass Spectro* (Waters, Beverly, MA, USA).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi beras, akuades, *artificial sea water* (ASW) (NaCl 234.7 g, MgCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O 106.4 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 39.2 g, CaCl<sub>2</sub> 11.0 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.92 g, KCl 6.64 g, KBr 0.96 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.26 g, SrCl<sub>2</sub> 0.24 g, NaF 0.03 g, dan ddH<sub>2</sub>O 10.0 L, NaOCl (Natrium ) agar, *Malt Extract* (ME) (Merck Ltd), *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Merck, Ltd), nutrient agar (NA) (Merck, Ltd), alkohol 70%, metanol (MeOH) PA (Merck, Ltd), metanol (MeOH) teknis, etanol (EtOH) teknis, n-butanol teknis, isopropil alkohol (IPA) teknis, diklorometana (DCM) teknis, n-heksana teknis, reagen visualisasi KLT meliputi Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Merck Ltd) (10% Ce(IV) dan 15% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (teknis) dalam akuades) , Ninhidrin (Merck Ltd) (2% ninhidrin dalam pelarut EtOH teknis), dan Dragendorff (stok 1 : Bismut nitrat 1,7 g dalam 80 mL air dan asam asetat glasial teknis 20 mL; stok 2: larutan KI (Merck Ltd) (50% b/v, 100 mL) dengan asam asetat glasial).

### 3.3 Prosedur Penelitian

#### 3.3.1. Biomaterial

Pada penelitian ini, bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* dan fungi diperoleh dari deposit UPT-LTSIT (Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu Sentra Inovasi dan Teknologi). Pada penelitian ini sampel fungi diperoleh dari spons yang diambil dari daerah Singaraja, Buleleng, Bali dan ekosistem hutan mangrove Lampung Timur, Lampung. Pesisir Laut Timur, desa Sriminosari, Lampung (titik koordinat: 5°19' 01.0" S 105°49' 19.8" E) pada November 2020. Sampel terdiri dari lumpur dan bagian dari tanaman mangrove (akar, batang, dan daun).

Pengayaan endofit fungi dilakukan menggunakan metode Tang *et al.*, 2019. Semua sampel dicuci bersih dengan air selama beberapa menit untuk menghilangkan puing-puing organik dan tanah. Setelah proses pengeringan, sampel ditempatkan pada cawan petri yang berisi media agar isolasi. Cawan petri diinkubasi pada 28°C

selama 2-3 minggu. Selanjutnya, isolat fungi di maintenance menggunakan media ME dan TSB (3% ME, 0, 6% *Tryptic Soy*, 2, 0% agar dan 3,8% air laut buatan) dan disimpan pada 30° C.

### 3.3.2. Identifikasi Fungi Secara Makro dan Mikroskopik

Identifikasi fungi dilakukan dengan menumbuhkan fungi pada media agar standar ME dan TSB (3% Malt ekstrak dan 0, 6% *Tryptic Soy Broth*) selama 2-5 hari. Selanjutnya, secara makroskopik dilakukan dengan mengamati warna, koloni dan bentuk fungi dan identifikasi secara mikroskopik menggunakan metode Sibero *et al.*, 2017 dengan beberapa modifikasi. Morfologi spora dan struktur sporulasi dianalisis secara mikroskopis menggunakan mikroskop (*Axioo Zeiss Imager A1*). Strain dipertahankan sebagai koloni yang tumbuh pada MEA (*Malt Extract Agar*) dalam kondisi gelap pada suhu 37°C (Nord *et al.*, 2019).

### 3.3.3. Filogenetik dan Sekuensing Fungi

DNA fungi diekstraksi mengikuti metode Landum *et al* (2016), sesuai dengan langkah-langkah menggunakan QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Jerman). *Spacer* transkripsi internal DNA ribosom nuklir (ITS) dari isolat fungi diperkuat menggunakan primer *forward*, ITS1-F (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan *reversed* primer, ITS4-R (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White *et al.*, 1990). Volume reaksi akhir adalah 20,5 µL, mengandung 10 µL kit PCR NEXpro™ (PCR Biosystems, UK), 0,25 µL primer maju dan 0,25 µL terbalik, 5 µL ddH<sub>2</sub>O dan 5 µL template DNA genomik. Untuk kontrol negatif, DNA diganti dengan air suling untuk memverifikasi tidak adanya kontaminasi. PCR dilakukan menggunakan Sensoquest Sensodirect Gradient Thermo block 96 (SensoQuest, Jerman), diprogram selama 5 menit pada 94°C; 35 siklus selama 1 menit pada 94°C, 1 menit pada 52°C, dan 1 menit pada 72°C; dan perpanjangan 5 menit terakhir pada 72°C. Produk PCR dipisahkan menggunakan gel agarosa 2% dalam buffer TAE

1X (40 mM Tris-asetat dan 1 mM EDTA, pH 8,0), diwarnai dengan ethidium bromide (0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) dan didokumentasikan menggunakan Qiaxcell Advanced (Qiagen, Jerman). Produk PCR dikirim untuk pengurutan dua arah langsung menggunakan ABIPRISM3730  $\times$  1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA) di First BASE Laboratory Sdn. Bhd., Selangor, Malaysia.

#### **3.3.4. Uji Resistensi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa***

Uji reistensi bakteri dilakukan pada bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Pada proses pengujian digunakan amoxicillin, cefadroxyl hyclate, ciprofloxacin, clindamycin, erithromycin, chloramphenicol, lincomycin, thiamphenicol, ciprofloxacin sebagai kontrol positif. Kemudian untuk kontrol negatif menggunakan metanol PA 12,5%. Pengujian disk difusi agar dilakukan sesuai dengan protokol *Clinically Laboratory and Standard Institute* (CLSI) untuk bakteri (CLSI, 2012). Pada uji difusi disk permukaan agar diinokulasi dengan menyebarkan inokulum bakteri. Pengujian dilakukan menggunakan silinder *stainless steel* berukuran 6x8mm (20-100  $\mu\text{L}$ ). Selanjutnya, pada bagian dalam silinder *stainless steel* yang sudah ditempatkan pada media agar inokulasi bakteri ditambahkan sebanyak 50  $\mu\text{L}$  kontrol positif, negatif, dan sampel pada setiap silinder. Kemudian dilakukan inkubasi selama 18-24 jam. Setelah 18-24 jam maka hasil didapatkan dengan mengukur panjang diameter zona bening yang dihasilkan pada masing-masing sampel tersebut. Selanjutnya data yang didapat di analisis dalam bentuk diagram batang pada *Microsoft Excell* 2013.

#### **3.3.5. Kultivasi, Ko Kultivasi dan Ekstraksi**

Pada proses kultivasi inokulum dibuat terlebih dahulu dengan perbandingan 1:5 terhadap media pertumbuhan. Inokulum menggunakan media standar malt ekstrak dan *Tryptic Soy Broth* (TSB) (3% Malt ekstrak dan 0,6% *Tryptic soy broth* dan



artificial sea water ). Selanjutnya, inokulum di inkubasi selama 2 hari pada kondisi statis. Setelah 2 hari dilakukan penuangan pada media kultivasi beras (100 gram beras dalam 110 mL air laut buatan) dan disterilisasi menggunakan autoclave pada 121°C selama 20 menit dan diinkubasi selama 7 pada 30°C pada kondisi statik (Tang *et al.*, 2019).

Selanjutnya, pada proses ko kultivasi dilakukan penambahan bakteri dengan mengambil 1 koloni bakteri dari hasil kultur dan dibiarkan selama semalam hingga mencapai kekeruhan  $10^8$  . Kemudian, dilakukan inkubasi pada 30° C selama 14 hari pada kondisi statik (Frank *et al.*, 2019). Hasil kultivasi dan ko kultivasi selanjutnya di ekstrak menggunakan pelarut 50 mL EtOAc.

### **3.3.6. Skrining Antibakteri terhadap Bakteri Klinis *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Resisten**

Uji skrining dilakukan pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* yang memiliki sifat resisten. Pada uji antibakteri dilakukan pembuatan suspensi bakteri menggunakan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) (Merck, Ltd.). Kemudian, suspensi disesuaikan kekeruhannya dengan standar 0,5 Mc-Farland (BaSO<sub>4</sub> disiapkan secara spektrofotometri) untuk menghasilkan perkiraan  $1,5 \times 10^8$  CFU / mL. Suspensi yang telah sesuai dengan 0,5 Mc-Farland kemudian diencerkan dengan perbandingan 1: 100 dalam TSB (Merck) untuk memberikan suspensi koloni  $1 \times 10^6$  CFU / mL. Kekeruhan terakhir ialah  $1 \times 10^4$  CFU dan  $3-7 \times 10^5$  CFU / mL. Uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam. Setelah inkubasi, ditambahkan 30 µL Alamar biru (resazurin) dan diinkubasi selama 2, 4 dan 8 jam untuk mengamati perubahan warna. Uji MIC dilakukan sebanyak tiga kali (Elsikh *et al.*, 2016).

### **3.3.7. Pemurnian Senyawa Antibakteri**

Pemurnian dilakukan menggunakan beberapa metode kromatografi meliputi kromatografi lapis tipis (KLT), dan kolom silika gel terbuka. Pada uji KLT, ekstrak dipindahkan dengan pipa kapiler dan ditotolkan pada fase diam berupa plat silika gel F<sub>254</sub> dengan fase gerak *n*-Heksana dan EtOAc. Uji KLT dilakukan menggunakan variasi pelarut sebagai fase gerak. Selanjutnya divisualisasi dengan UV<sub>254nm</sub>, pereaksi Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, Dragendorff untuk komponen alkaloid, dan Ninhidrin (1% w/v dalam etanol) untuk komponen asam-asam amino. Kemudian diamati dan dihitung nilai R<sub>f</sub> masing-masing komponen. Selanjutnya pemurnian dilakukan menggunakan kolom silika terbuka dengan pelarut *n*-Heksana dan EtOAc. Purifikasi lebih lanjut menggunakan kolom terbuka dengan fase diam berupa C<sub>18</sub> dengan fase gerak MeOH dan H<sub>2</sub>O secara gradien. Fraksi hasil pemurnian dimonitoring dengan uji KLT kembali.

### **3.3.8. Identifikasi dan Karakterisasi Senyawa Antibakteri**

Fraksi yang diperoleh dianalisis dengan dianalisis dengan spektrofotometer *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometer* (LC-MS) untuk mengetahui berat molekul dan pola fragmentasi dari sampel yang digunakan.

## V. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi 9 jenis fungi yang berasal dari spons dan 17 jenis fungi endofit mangrove. Berdasarkan masing-masing jenis fungi didapatkan jenis *Fusarium*, dan *Aspergillus* didapatkan sangat dominan.
2. Telah berhasil didapatkan fungi yang memiliki bioaktivitas melalui proses kultivasi dan ko-kultivasi menggunakan teknik *Solid State Fermentation* (SSF).
3. Telah didapatkan hasil uji antibakteri fraksi dari fungi spons menggunakan media beras yaitu A12RFB0301 dengan konsentrasi 62.5µg/mL dan fraksi A12RFB0302 dengan konsentrasi 250µg/mL pada bakteri *S. aureus*. Kemudian, pada bakteri *P. aeruginosa* fraksi A12RFB0301 dan A12RFB0302 memiliki aktivitas pada konsentrasi 250µg/mL.
4. Telah didapatkan aktivitas fraksi dari fungi spons menggunakan media kulit udang yaitu A12RF0401 terhadap *S. aureus* dengan konsentrasi 500 µg/mL dan aktivitas pada *P. aeruginosa* pada konsentrasi 31.25µg/mL.
5. Telah didapatkan aktivitas fraksi dari fungi endofit mangrove CB07RF memiliki aktivitas terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.
6. Telah berhasil diisolasi senyawa peptide dari fungi A12RF menggunakan media beras dan lipopeptida dari fungi A12RF menggunakan media kulit udang yang memiliki aktivitas terhadap bakteri resisten klinikal.

## 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh dapat digunakan sebagai informasi awal sebagai kajian lebih lanjut untuk dilakukan uji mekanisme kerja dari senyawa peptida dan lipopeptida yang dihasilkan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adachi, K., Kanoh, K., Wisespong, P., Nishijima, M., and Shizuri, Y. 2005. Clonostachysins A and B new anti-dinoflagellate cyclic peptides from marine derived fungus. *J antibiot.* 58(2):145-150.
- Allegranzi, B., Bagheri, N. S., Combescure, C., Graafmans, W., Attar, H., Donaldson, L., and Pittet, D. 2011. Burden of endemic health-care associated infection in developing countries: Systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 5(377):228–241.
- Arakkaveetil, K. F. and Abdulla M. H. 2019. Bioprospecting potential and secondary metabolite profile of a novel sediment-derived fungus *Penicillium* sp. ArCSPf from continental slope of Eastern Arabian Sea. *Mycology.* 10(2):109-117.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M. M., Sherris, J. C., and Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 36:493-496.
- Barrios-González, J., and Tarragó-Castellanos, M.R. 2017. Solid-State Fermentation: Special Physiology of Fungi. In: Mérillon JM., Ramawat K. (eds) *Fungal Metabolites*. Reference Series in Phytochemistry. Springer, Cham.
- Bhardwaj, A., Sharma, D., Jadon, N and Agrawal, P. 2015. Antimicrobial and phytochemical screening of endophytic fungi isolated from spikes of *Pinus roxburghii*. *Arch. Clin. Microb.* 6(3): 1-7.
- Berthod, A. and Carda-Broch, S. 2004. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr.* 1037:3–14.
- Bigger, J.W .1944. Treatment of *Staphylococcal* infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet.* 244:497–500.
- Bills, G.F., Platas, G., Fillola, A., Jimenez, M.R., Collado, J., Vicente, F., Martin, J., Gonzalez, A., Bur-Zimmermann, J., Tormo, J.R., and Pelaez, F. 2008. Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from

- filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *J Appl Microbiol.* 104:1644–1658.
- Bode, H.B., Bethe, B.H., and Zeeck, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chem. Bio. Chem.* 3:619-627.
- Buatong, J., Phongpaichit, S., Rukachaisirikul, V., and Sakayaroj, J. 2011. Antimicrobial activity of crude extracts from mangrove fungal endophytes. *World J Microbiol Biotechnol.* 27:3005–3008.
- Bugni, T.S., and Ireland, C.M. 2004. Marine-derived fungi: A chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Nat. Prod. Rep.* 2004, 21, 143.
- Butler, M.S., Robertson, A.A., Cooper, M.A. 2014. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. *Nat. Prod. Rep.* 31: 1612–1661.
- Cashel, M., and Gallant, J. 1969. Two compound implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature.* 221(5183):838–841.
- Chen, H., Georgios, D., Mohamed S.A–Azis., Dhana, T., Haofu, D., Heike, B.O., Wenhan, L., and Peter, P. 2015. Inducing secondary metabolite production by the soil dwelling Fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co – culture. *J. of Phytochemistry Letters.* 12:35–41.
- Chujo, T.; Scott, B. 2014. Histone H3K9 and H3K27 methylation regulates fungal alkaloid biosynthesis in a fungal endophyte–plant symbiosis. *Mol. Microbiol.* 92, 413–434.
- Coates, J. 2000. Interpretation of Infrared Spectra a Practical Approach. *Encyclopedia J. of Analytical Chemistry.* 10815-10837.
- Conlon, B.P., Rowe, S.E., Gandt, A.B., Nuxoll, A.S., Donegan, N.P., Zalis, E.A., Clair, G., Adkins, J.N., Cheung, A.L., and Lewis, K. 2016. Persister formation in *Staphylococcus aureus* is associated with ATP depletion. *Nat Microbiol* 1:1.
- Debbab, A., Aly, A.H., and Proksch, P. 2013. Mangrove derived fungal endofites- A chemical and biological perception. *Fungal Divers.* 61: 1–27.
- De Souza, J. J., Vieira, I. J., Rodrigues-Filho, E., and Braz-Filho, R. 2011. Terpenoids from endophytic fungi. *Mol. Ther.* 16:10604–10618.
- Dudley, Nigel; Stolton, Sue. 2010. Arguments for Protected Areas: Multiple Benefits for Conservation and Use. Routledge. ISBN 978-1-136-54292-3. "Species diversity by ocean basin". NOAA Coral Reef Conservation Program. 9 May 2014. Archived from the original on 12 May 2014.

- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., Mc-Gaw, M., Marchant, R., Banat, I.M., 2016 Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnol Lett.* 38(6):1015-1019.
- Frank, M., Ferhat, C.Ö., Werner, E.G., Müller, A.H., Matthias U.K., Wenhan, L., Zhen, L., and Peter, P. 2019. Cryptic secondary metabolites from the sponso-associated fungus *Aspergillus ochraceus*. *Mar. Drugs.* 17:99-112.
- Gibbons, S and Gray, A. 1998. Isolation by planar chromatography. *J. of Natural Product Isolation.* 4:209-245.
- Gladfelter, A. S., James, T. Y., and Amend, A. S. A. 2019. Marine fungi. *Curr. Biol.* 29: 191–195.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P. M., Sutton, B. C., Pegler, D. M. 1995. Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi. 8<sup>th</sup> edition. CAB International, Wallingford.
- Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., and Taylor, M. W. 2012. Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nature reviews. Microbiology*, 10(9): 641–654.
- Hestbjerg, H., Nielsen, K.F., Thrane, U., Elmholt, S. 2002. Production of trichothecenes and other secondary metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on common laboratory media and a soil organic matter agar: an ecological interpretation. *J Agr Food Chem.* 50:7593–7599.
- Hiort, J., Maksimenka, K., Reichert, M., Perović-Ottstadt, Lin, W. H., Wray, V., Steube, V., Schaumann, K., Weber, H., Proksch, P., Ebel, R., Müller, W. E. G. and Bringmann, G. 2004. New Natural Products from the Sponso-Derived Fungus *Aspergillus niger*. *Nat. Prod.* 67(9): 1532–1543.
- Hostettmann K., Marston A., and Wolfender J.-L. 1995. Strategy in the search for new biologically active plant constituents, in K. Hostettmann, A. Marston, Maillard and M. Hamburger (eds.), *Phytochemistry of Plants Used in Traditional Medicine*, Clarendon Press, Oxford, pp. 17–45.
- Isabella, P. M, Wanderley C, Maia LC, Cavalcanti MA. 2012. Diversity of leaf endofitic fungi in mangrove plants of northeast Brazil. *Braz J Microbiol.*43: 1165-1173.
- Jorgensen, J. H., and Turnidge, J. D. 2007. Susceptibility test methods: dilution and disk diffusion methods, p. 1152–1172. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, and M. A. Pfaller (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 9th ed. ASM Press, Washington, D.C.

- Kamdem, R.S.T., Wanga, H., Wafob, P., Ebrahima, W., Özkayaa, F.C., Makhloufid, G., Janiakd, Christoph, S., Parichat, Matthias, U.K., Linf, W., Liua Zhen, Proksch, P. 2017. Induction of new metabolites from the endophytic fungus *Bionectria* sp. through bacterial co-culture. *Fitoterapia*. 60:554-557.
- Kathiresan, K., and Bingham, B.L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Adv Mar Biol* .40: 81-251.
- Kim, S. H., No, H. K., and Prinyawiwatkul, W. 2007. Effect of molecular weight, type of chitosan, and chitosan solution pH on the shelf-life and quality of coated eggs. *J Food Sci*. 72:S044– S048.
- Landum, M. C., do Rosário Félix, M., Alho, J., Garcia, R., Cabrita, M. J., and Rei, F., 2016. Antagonistic activity of *fungi* of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiol. Res*. 183: 100–108.
- Lin, W., Brauers, G., Ebel, R., Wray, V., Berg, A., Sudarsono, and P. Proksch. 2003. Novel chromone derivatives from the fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the marine sponges *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod*. 66(1): 57-61.
- Lin, W. H., Fu, H. Z., Li, J. and Proksch, P. 2001. Novel chromones derivatives from marine fungus *Aspergillus versicolor* isolated from the sponges *Xestospongia exigua*. *Chin. Chem. Lett*. 12: 235-238.
- Lima, R.F and Borba 2001. Viability, morphological characteristics and dimorphic ability of fungi preserved by different methods. *Rev Iberoam Mycol*. 18: 191-196.
- Locke D.C. 1974. Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Chemically Bonded Stationary Phases. *Journal of Chromatographic Science*. 12(8):433–437
- Maisonneuve, E., Shakespeare, L. J., Jorgensen, M. G., and Gerdes, K. 2011. Bacterial persistence by RNA endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (32): 13206–13211.
- Marian, F., Hendrik, N., Philip, B., Björn, S., Sebastian, W., Wenhan, L., and Peter, P. 2015. Phomoxanthone A—from mangrove forests to anticancer therapy. *Curr. Med. Chem*. 22: 3523–3532.
- Masalha, M., Boroyol, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., and Cohen, G. 2001. Analysis of Transcription of the *Staphylococcus aureus* aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. *J. of Bacteriology*. 24:7260–7272.



- Meng, L.-H.; Li, X.-M., Lu, C.-T., Huang, C. G., and Wang, B.-G. 2014. Brocazines A–F, cytotoxic bisthiodiketopiperazine derivatives from *Penicillium brocae* MA-231, an *endofitic* fungus *derived* from the marine mangrove plant *Avicennia marina*. *J. Nat. Prod.* **77**: 1921–1927.
- Miao, L., Kwong, T.F.N., and Qian, P.Y. 2006. Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus *Arthrinium* c.f. *saccharicola*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **72**:1063–1073.
- Moker, N., Dean, C. R., and Tao, J. 2010. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *J Bacteriol.* **192**(7):1946– 1955.
- Naskar, K., and Mandal, R. 1999. Ecology and biodiversity of Indian mangroves. Daya Publishing House, Delhi, India.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing” twenty-second informational supplement—11th. M100-S22. Standards. 32.
- Navidinia, M. 2016. The clinical importance of emerging ESKAPE pathogens in nosocomial infections. *Archives of Advances in Biosciences.* **7**(3): 43-57.
- Netzker, T., Fischer, J., Weber, J., Mattern, D.J.; König, C.C., Valiante, V., Schroeckh, V., and Brakhage, A.A. 2015. Microbial communication leading to the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters. *Front. Microbiol.* **6**: 299.
- Nielsen, K. F., Mansson, M., Rank, C., Frisvad, J. C., and Larsen, T. O. 2011. Dereplication of microbial natural products by LC-DAD-TOFMS. *J. Nat. Prod.* **74**:2338–2348.
- Nikaido, H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:593-656.
- Nord, C., Jolanta, J., Levenfors., Joa kim Bjerketorp., Christer Sahlberg., Bengt Guss Bo Öberg, and Anders, Broberg. 2019. Antibacterial Isoquinoline Alkaloids from the Fungus *Penicillium Spathulatum* Em19. *Molecules.* **24**: 4616 – 4627.
- Nuetzmann, H.W., Reyez-Domingues, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Gacek, A., Schumann, J., Hertweck, C., Strauss, J., and Brakhage, A.A. 2011. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* **108**: 14282-14287.

- Oh, D.C., Kauffman, C.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. 2007. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp.in competing co-culture. 70:515-520.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem.* 267: 5421–5426
- O'Riordan, K., and Lee, J.C. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 218–234.
- Paranagama, P.A., Wijeratne, E.M.K., and Gunatilaka, A.L. 2007 Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. *J Nat Prod.* 70:1939–1945.
- Pasamba, E.M., Demigillo, R.M., and Lee, A.C. 2007. Antibiograms of pink pigmented facultative methylotrophic bacterial isolates from various sources. *Philipp Science.* 44:47-56.
- Pejin, B and Maja, K. 2017. Antitumor natural products of marine *derived* fungi. In: Merillion, J.M Ramawat, K.G. (Eds). *Fungal Metabolites. Springer Internasional Publishing*, pp. 1-28.
- Poole, C. 2009. Handbook of Method and Instrumentation in Separation Science. *Academic Press.* 1:72.
- Proksch, P., Edrada, R. A, Ebel, R. 2002. Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59(2-3):125-34
- Prax, M., Mechler, L., Weidenmaier, C, and Bertram, R. 2016. Glucoseaugments killing efficiency of Daptomycin challenged *Staphylococcus aureus* persists. *PLoS One.* 11 (3):0150907.
- Pu, X., Qu, X., Chen, F., Bao, J., Zhang, G., and Luo, Y. 2013. Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:9365–9375.
- Rice, L.B. 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J Infect Dis.* 197(8):1079-1081.
- Sanchez, J.G.B., and Kouznetsov, V.V. 2010. Antimycobacterial susceptibility testing methods for natural products research. *Brazil J Microbiol.* 41: 270–277.
- Schulz, B and Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycol Res.* 109: 661-686.

- Schmidt, R., Ulanova, D., Wick, L., Bode, H., Garbeva, P. 2019. Microbe-driven chemical ecology: past, present, and future. *The ISME Journal*. 13(1): 1.
- Setiawan, A. 2006. Bioaktivitas Jaspamide Terhadap Sel KB dan L1210. Prosiding. Lembaga Penelitian. Universitas Lampung. Hal. 484–489.
- Severin, J. A., Lestari, E. S., and Kuntaman, K. 2008. Antimicrobial Resistance in Indonesia, Prevalence and Prevention Study Group. Unusually high prevalence of panton-valentine leukocidin genes among methicillin sensitive *Staphylococcus aureus* strains carried in the Indonesian population. *J Clin Microbiol*. 46: 1989- 95.
- Shearer, C.A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H.A., Schmit, J.P., Thorton, H.A., and Voglymayr, H. 2007. Fungal diversity in aquatic habitats. *Biodivers Conserv*. 16:49–67.
- Sibero, M. T., Aninditia, S., Olvi, C., Handung, C., Ocky, K. R., Agus, S., and Agus T. 2017. Isolation, identification and screening antibacterial activity from marine spons-associated *fungi* against multidrug resistant (MDR) *Escherichia coli*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 55:012-028.
- Singh, C. R., Kathiresan, K., Anandhan, S., and Suganthi, K. 2014. Antioxidant and antibacterial activity of field grown and tissue cultured root callus of mangrove species. *Eur J Med Plants*. 4:723–742.
- Snyder, L. R., Glach, J. L. and Kirkland, J. J. 1988. Practical HPLC Method Development. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Stone, J. K., Bacon, W., and White, J.F. 2000. An Overview of Endophytic Microbes: endophytism Defined. In: Bacon, C. W and White, J. F., Eds., Microbial Endophytes, Marcel Dekker, New York, 3-29.
- Straus, S.K., and Hancock, R.E. 2006. Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 1758 (9):1215–23.
- Strobel, G. A., Daisy, B., Castillo, U., and Harper, J. 2004. Natural Product from endophytic microorganism. *J. Nat. Prod*. 67:257-268.
- Tan, R. X., and Zou, W. X. 2001. *Endofites*: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep*. 18(4):448–459.
- Tang, R., Kimishima, A., Ishida, R., Setiawan, A., and Arai, M. 2019. Selective cytotoxicity of epidithiodiketopiperazine DC1149B, produced by

- marine-derived *Trichoderma lixii* on the cancer cells adapted to glucose starvation. *J. Nat. Med.* 74(1): 153-158.
- Takahashi, K and Yamanaka, S. 2013. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. *Development.* 140: 2457-2461.
- Tong, S.Y., Davis, J.S., Eichenberger, E., Holland, T.L., and Fowler, V.G. 2015. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews.* 28: 603–661.
- Tsuda, Y. 2004. Isolation of Natural Products. HEJ. Research Institute of Chemistry. University of Karachi. Pakistan.
- Vacelet and Donadey, 1977. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Marine Biology Ecology* 30:301–314.
- Wani, Z.A., Ashraf, N., and Mohiuddin, T. 2015. Plant-endophytes symbiosis, an ecological perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99: 2955–2965.
- Wendrich, T.M, Blaha, G, Wilson, D.N., Marahiel, M. A, and Nierhaus, K. H. 2002 Dissection of the mechanism for the stringent factor. *Rel A. Mol Cell.* 10(4):779–788.
- Weber, D., Sterner, O., Anke, T., Gorzalezancy, S., Martino, V., and Avecedo, C. 2004. Phomol, a new anti-inflammatory metabolites from and endophyte of the medicinal plant *Erythrina crista-galli*. *J. antibiot.* 57: 2073-2079.
- White, T.F., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky FS, White TT (eds) PCR Protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, pp 315–32.
- World Health Organization. 2014. World health statistics 2014. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112738>.
- WHO. 2017. World Health Statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals.
- Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3:163–175.
- Wicklow, D. T., Roth, S., Deyrup, S.T., and Gloer, J. B. 2005. A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycol Res.* 109: 610–618.

- Wilkinson. 1978. Secondary metabolites of *fungi* from marine habitats. *Nat. Prod. Rep.* 28: 290–344.
- Wojdyło, A., Samoticha, J., and Chmielewska, J. 2020. Effect of different pre-treatment maceration techniques on the content of phenolic compounds and color of Dornfelder wines elaborated in cold climate. *Food Chem.* 339: 1278–1288.
- Xu, L., Meng, W., Cao, C., Wang, J., Shan, W., and Wang, Q. 2015. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi. *Marine drugs.* 13(6): 3479–3513.
- Yashin Y.I. 1982. Selectivity in liquid adsorption chromatography. *J. Chromatogr.* 251: 269.
- Yang, S. Q., Li, X. M., Xu, G. M., Li, X., An, C. Y., and Wang, B. G. 2018. Antibacterial anthraquinone derivatives isolated from a mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus nidulans* by ethanol stress strategy. *The Journal of antibiotics.* 71(9): 778–784.
- Yemoa, A., Gbenou, J., Affolabi, D., Moudachirou, M., Bigot, A., Anagonou, S., Portaels, F., Quetin-Leclercq, J., and Martin, A. 2011. Buruli ulcer: a review of in vitro tests to screen natural products for activity against *Mycobacterium ulcerans*. *Planta Med.* 77:641–646.
- Yoon Me, L., Hung, T. D., Jianlin, L., Ping, Z., Jongki, H., Cong-O, L., Jee, H.J. 2011. A Cytotoxic Fellutamide Analogue from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus versicolor*. *Bull. Korean Chem. Soc.* 32 (10): 3817.
- Youssef, F. S., Ashour, M. L., Singab, A., and Wink, M. 2019. A Comprehensive Review of Bioactive Peptides from Marine Fungi and Their Biological Significance. *Marine drugs.* 17(10): 559.
- Zhang, Q., Lin, L., and Ye, W. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chin. Med.* 13: 20.
- Zhang, F. Z., Li, X. M., Li, X., Yang, S. Q., Meng, L. H., and Wang, B. G. 2019. Polyketides from the Mangrove-Derived Endophytic Fungus *Cladosporium cladosporioides*. *Marine drugs.* 17(5): 296.