

**KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF HASIL KULTIVASI FUNGI
Aspergillus nomiae A12-RF YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS
SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP ISOLAT KLINIS
*Staphylococcus aureus***

(Skripsi)

**Oleh
Zahrah Khairani**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI *Aspergillus nomiae* A12-RF YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP ISOLAT KLINIS *Staphylococcus aureus*

Oleh

ZAHRAH KHAIRANI

Penelitian ini bertujuan menemukan senyawa antibakteri *S. aureus* dari fungi *A. nomiae* A12-RF berasosiasi dengan spons laut. Isolat fungi *A. nomiae* A12-RF diperoleh dari deposit UPT-LTSIT, Universitas Lampung. Isolat tersebut diremajakan dengan TSB dan Malt Ekstrak. Hari ke-7 terlihat miselium berwarna putih. Pengamatan mikroskopis dari hasil peremajaan ditemukan spora, konidia, konidiofor, dan sporangium secara rinci pada perbesaran 400x. Isolat dikultivasi secara *Solid State Fermentation* (SSF) secara statis dengan media kulit udang selama 21 hari. Biomassa fungi dimaserasi dengan pelarut EtOAC. Hasil uji KLT terhadap ekstrak kasar menghasilkan noda positif pada pereaksi $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0,8 dan RF 0,9), Dragendorf (RF 0,85 dan RF 0,88), dan Ninhidrin (RF 0,6, RF 0,75, dan RF 0,8). Ekstrak kasar tersebut menunjukkan kemampuan antibakteri terhadap *S. aureus* klinis. *Scale up* selanjutnya dilakukan dalam 6 Erlenmeyer 2 L, diperoleh 6 g ekstrak kasar. Hasil *scale up* difraksinasi dengan kromatografi kolom terbuka. Diperoleh fraksi 24 (CF1-40F24) yang tidak terlalu banyak noda. CF1-40F24 positif dengan uji KLT pada UV 254 nm dan pada pereaksi $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0,68 dan RF 0,7), Dragendorf (RF 0,68 dan RF 0,8), dan Ninhidrin (RF 0,68 dan RF 0,7). F-24 memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. Aureus* pada konsentrasi 450 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ dengan persentase inhibisi 23,031%. Data LC-MS/MS menunjukkan bahwa fraksi tersebut diprediksi memiliki formula molekul $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_6$ dengan m/z 726 serta terkandung senyawa alkaloid dan peptida. Konfirmasi dengan FTIR memperlihatkan bahwa senyawa tersebut mengandung gugus N-H pada serapan 3272 cm^{-1} , C-H pada serapan 2929 cm^{-1} ; *overtone* benzene pada serapan 2079 cm^{-1} ; dan gugus C=N, 1669 cm^{-1} , 1602 cm^{-1} dan 1535 cm^{-1} .

Kata Kunci : antibakteri, fungi, *Aspergillus nomiae*, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE FUNCTIONAL COMPOUNDS *Aspergillus nomiae* A12-RF ASSOCIATED WITH SPONGE AS ANTIBACTERIA AGAINST CLINICAL ISOLATES *Staphylococcus aureus*

BY

ZAHRAH KHAIRANI

Staphylococcus aureus resistance is a serious problem in the world. This study purpose to observe the antibacterial compound to againts *S. aureus* from the fungi *A. nomiae* A12-RF associated with marine sponges. Fungal isolate *A. nomiae* A12-RF was obtained from the UPT-LTSIT deposit, University of Lampung. The isolate was rejuvenated with TSB and Malt Extract and it was observed that the fungus had a white homogeneous color. Microscopic observations observed spores, conidia, conidiophores, and sporangium in detail at 400x magnification. Solid State Fermentation (SSF) of shrimp shells for 21 days and observed red shrimp shells with more fungi growing. Fungal biomass was macerated with EtOAc solvent. The TLC test observed that crude extract was positive for the reagents $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0.8 and RF 0.9), Dragendorff (RF 0.85 and RF 0.88), and Ninhydrin (RF 0.6, RF 0.75), and RF 0.8). The crude extract showed that it was active against *S. aureus*. The scale up was carried out in an Erlenmeyer 2 L x 6 and the weight was 6 grams. The results of the scale up were fractionated by open column chromatography. The fraction with less stains (F-24) was positive for the reagent $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0.68 and RF 0.7), Dragendorff (RF 0.68 and RF 0.8), and Ninhydrin (RF 0.68). and RF 0.7) by TLC test. F-24 has antibacterial activity against *S. aureus* at a concentration of 450 g/ μL with an inhibition percentage of 23.031%. The fraction is predicted to have the molecular formula $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_6$ with m/z 726 and there are alkaloids compound and peptide compound. Confirmed by FTIR there is N-H group at an absorption 3272 cm^{-1} , a C-H group at an absorption of 2929 cm^{-1} , an overtone of benzene at an absorption of 2079 cm^{-1} , and a C=N group at an absorption of 1669 cm^{-1} , 1602 cm^{-1} and 1535 cm^{-1} .

Key Word: antibacterial, fungi, *Aspergillus nomiae*, *Staphylococcus aureus*

**KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF HASIL KULTIVASI FUNGI
Aspergillus nomiae A12-RF YANG BERASOSIASI DENGAN SPONS
SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP ISOLAT KLINIS
*Staphylococcus aureus***

**Oleh
Zahrah Khairani**

**Skripsi
Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar
SARJANA SAINS**

**Pada
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

Judul : **Karakterisasi Senyawa Bioaktif Hasil Kultivasi Fungi *Aspergillus nomiae* A12-RF Yang Berasosiasi Dengan Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Isolat Klinis *Staphylococcus aureus***

Nama Mahasiswa : **Zahrah Khairani**

NPM : 1657011002

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Bandar Lampung, 2 November 2022

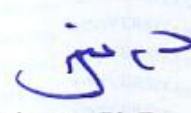
MENYETUJUI

1. **Komisi Pembimbing**


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


Wawan Abdullah Setiawan, S.Si, M.Si
NIP. 197912302008121001

2. **Ketua Jurusan Kimia FMIPA Unila**


Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

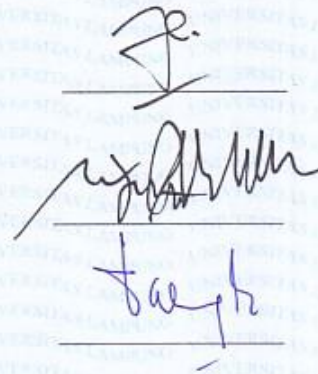
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : Drs. Andi Setiawan, M.Sc, P.hD.

Sekretaris : Wawan Abdullah Setiawan, S.Si, M.Si

Anggota : Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S.

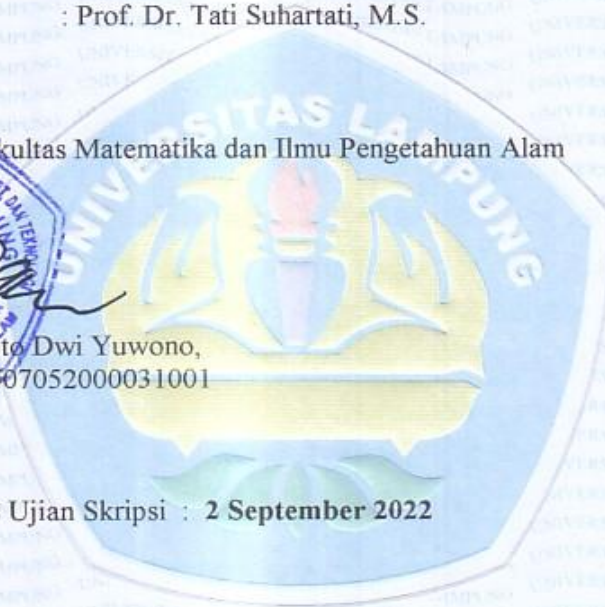


2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Fikri Satripto Dwi Yuwono,
M.T NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 2 September 2022



SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Zahrah Khairani
NPM : 1657011002
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Karakterisasi Senyawa Bioaktif Hasil Kultivasi Fungi *Aspergillus nomiae* A12-RF Yang Berasosiasi Dengan Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Isolat Klinis *Staphylococcus aureus*” ini tidak terdapat karya yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka. Selanjutnya, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenar-benarnya untuk digunakan sebagai mestinya.

Bandar Lampung, 2 November 2022



Zahrah Khairani
NPM. 1657011002

RIWAYAT HIDUP



Zahrah Khairani lahir di Bekasi pada 27 Agustus 1998. Penulis merupakan anak pertama pasangan Bapak Teuku Arif Nurdinsyah dan Ibu Ilvi Warnidah Hasibuan. Penulis memiliki satu adik laki-laki.

Penulis menyelesaikan pendidikan Taman Kanak-Kanak di TK Islam Terpadu Al Hikmah Bintara, Bekasi Barat pada tahun 2004. Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang sekolah dasar di SD Negeri Pondok Kopi 04 Pagi Jakarta. Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan sekolah menengah pertama di SMP Negeri 109 Jakarta yang diselesaikan pada tahun 2013. Kemudian penulis melanjutkan lagi ke pendidikan sekolah menengah atas di SMA Negeri 103 Jakarta diselesaikan pada tahun 2016. Pendidikan terakhir ditempuh oleh penulis ke jenjang perguruan tinggi pada tahun 2016 yang diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur SIMANILA (Seleksi Mandiri Masuk Universitas Lampung).

Selama menjadi mahasiswa, penulis aktif mengikuti unit kegiatan mahasiswa di lingkungan Universitas Lampung. Penulis pernah mengikuti kegiatan sosial Karya Wisata Ilmiah yang diselenggarakan oleh BEM FMIPA Unila tahun 2016. Penulis menjadi anggota bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi (KPO)

Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2018. Penulis juga menjadi staff ahli Kajian Aksi dan Strategis (Kastrat) Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2018. Selain itu pada tahun yang sama penulis juga menjadi staff ahli Kemediasan Birohmah Universitas Lampung. Penulis pernah menjabat sebagai Sekertaris Dinas Kajian Aksi dan Strategis (Kastrat) Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Universitas Lampung pada tahun 2019. Lalu pada tahun yang sama penulis juga menjadi staff ahli Aksi dan Propaganda (Akspro) Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Universitas Lampung. Penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan (PKL) pada tahun 2019 di Laboratorium Pestisida, Balai Pengujian Mutu Barang, Direktorat Standardisasi dan Pengendalian Mutu, Direktorat Jendral Konsumsi dan Tata Niaga, Kementerian Perdagangan Republik Indonesia dengan judul “Penentuan 4 Senyawa *Polysyclic Aromatic Hydrocarbon* (PAH's) Terhadap Minyak Kelapa Menggunakan Analisis GC-MS/MS. Penulis juga telah menyelesaikan Kuliah Kerja Nyata (KKN) Periode I pada tahun 2020 di Desa Paduan

Rajawali, Kecamatan Meraksa Adji, Kabupaten Tulang Bawang, Provinsi Lampung. Penulis juga aktif dalam kegiatan non akademik diluar kampus yaitu pernah aktif sebagai penyiar radio di A Radio 101.1 FM Bandar Lampung. Selain itu penulis juga aktif sebagai aktivis sosial di Jendela Lampung. Penulis pernah menyelesaikan pelatihan *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometry* (FTIR) pada tahun 2019, *Polymerase Chain Reaction* (PCR), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), dan *Gas Chromatography and Mass Spectrophotometry* (GC-MS) pada tahun 2022.

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin.

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Senyawa Bioaktif Hasil Kultivasi Fungi *Aspergillus nomiae* A12-RF Yang Berasosiasi Dengan Spons Sebagai Antibakteri Terhadap Isolat Klinis *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini tidak mungkin terselesaikan tanpa adanya bimbingan, dorongan, nasehat serta bantuan dari berbagai pihak terkait. Oleh sebab itu penulis menyampaikan rasa terima kasih kepada :

1. Bapak Teuku Arif Nurdinsyah dan Ibu Ilvi Warnidah Hasibuan selaku kedua orang tua. Terima kasih atas seluruh kasih sayang yang telah diberikan selama ini serta segala doa, nasehat, motivasi, fasilitas dan dukungan finansial. Sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik. Semoga Allah SWT membalas atas segala yang telah diberikan di surga-Nya. Amin
2. Adik-adikku tercinta Wildan Hanif untuk semangat dan dukungan kalian. Semoga Allah SWT membalas segala kebaikanmu. Amin

3. Bapak Drs. Andi Setiawan, M.Sc, P.hD. selaku Pembimbing 1 penelitian atas segala bimbingan, dukungan, nasehat, motivasi dan saran yang diberikan kepada penulis sehingga penulis dengan mudah menjalani penelitian dan menyelesaikan penulisan skripsi ini.
4. Bapak Wawan Abdullah Setiawan, S.Si, M.Si. selaku pembimbing II penelitian atas semua kritik, saran, bimbingan, dukungan, nasehat dan motivasi yang selalu diberikan dengan kesabaran dan keikhlasan kepada penulis selama penelitian dan penulisan skripsi.
5. Ibu Prof. Dr. Tati Suhartati, M.S. selaku pembahas penelitian yang telah memberikan kritik, saran, bimbingan, dukungan, nasehat dan motivasi kepada penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
6. Bapak Prof. Dr. Ir. Yandri A. S., M.S. selaku pembimbing akademik atas segala bimbingan, masukan, dukungan, nasehat, dan motivasi yang diberikan kepada penulis selama proses perkuliahan.
7. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Lampung.
8. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.

10. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu, dukungan, nasehat, motivasi, dan pengalamannya yang telah diberikan kepada penulis selama menjalankan pendidikan di kampus. Semoga ilmu yang diberikan bermanfaat dan dibalas seluruh kebaikan bapak dan ibu dengan pahala yang berlimpah oleh Allah SWT.
11. Seluruh staf administrasi dan pegawai di lingkungan Jurusan Kimia, Dekanat FMIPA, serta Universitas Lampung yang senantiasa membantu dalam sistem akademik, perkuliahan, penelitian, serta penyusunan skripsi dapat terselesaikan dengan baik.
12. Seluruh teman-teman Angkatan 2016. Terimakasih atas segala dukungan , nasehat, motivasi, saran dan lainnya selama perkuliahan.
13. Kepengurusan HIMAKI FMIPA Unila periode 2018-2019. Mohon maaf penulis belum dapat menjadi anggota dan panutan yang baik, terimakasih telah berjuang dan bekerja sama. Semoga lelah kita menjadi lillah.
14. Kepengurusan BEM FMIPA Universitas Lampung 2018-2019 dan 2019-2020. Mohon maaf penulis belum dapat menjadi staff dan pemimpin yang baik, terimakasih telah berjuang dan bekerja sama. Semoga lelah kita menjadi lillah.
15. Kepengurusan BEM KBM Universitas Lampung 2019-2020. Mohon maaf penulis belum dapat menjadi staff dan panutan yang baik, terimakasih telah berjuang dan bekerja sama. Semoga lelah kita menjadi lillah.

16. Kepengurusan Birohmah Universitas Lampung 2018-2019 dan 2019-2020.
Mohon maaf penulis belum dapat menjadi staff dan panutan yang baik, terimakasih telah berjuang dan bekerja sama. Semoga lelah kita menjadi lillah.
17. Keluarga besar Kimia 2015, 2016, 2018, dan 2019 atas kekeluargaannya selama ini.
18. Anak-anak ADS Squad, kak Fendi Setiawan S.Si, M.Si, mbak Rosyidatul Luthfiah, S.Si, M.Si, mbak Gita S.Si, M.Si, mbak Citra Dewi S.Si , Annisa Elcentia, S.Si, Mifta Rahma, Linda Fatmawati, Siti Aisyah, Mukhlis Setiawan, Mega Muryani, Casya, Ika, Fathur Rohim, Reza Fadhilla, Rizky Pangestu, dan lain-lain.
19. Anak-anak LTSIT dan Biopol Squad Nafila Khansa, S.Si, ka Ridho Nahrowi, S.Si, M.Si, Dahlia, Nadia Safitri Rizky, Lanang, Reyzka, Indra, Saras, Rana, Ikrommudin, Meyrizka, Nia, Lisa. Dinda, Dian, dan lain-lain. Mohon maaf penulis tidak dapat menyebutkan keseluruhan. Semoga Allah membalas kebaikan kalian. Semoga lancer selalu urusan studi maupun pekerjaan. Semoga Allah memudahkan urusan kalian dalam mengejar cita-cita. Amin
20. My bestie princess of chemistry, Fina Palinda, S.Si, Nabila Setiyana, S.Ked, Cici Gustina, S.E., Nabila Akbar, S.H. Terimakasih telah membuatku sedih, senang, dan kuat dalam menyelesaikan perkuliahan. Thank you so much and appreciate that for your all support system. May Allah bless you guys and make your life always easiestly. Amen

21. Chemwomen bestie Adita Sukma S.Si, Aura Dhayang S.Si, Risma Handayan S.Si, Windi Agustina S.Si, Della Ananda S.Si, Deva Wahyu S.Si, Shelly Febi S.Si, Annisa Amelz, S.Si, Grace Sondang S.Si, Putri Okta S.Si. Thank you so much and appreciated too for all your advice, motivation, support system. May Allah bless you guys and make your life always easiestly. Amen

22. Keluarga Besar A Radio 101.1 FM. Terimakasih banyak atas kesempatan dan ilmunya selama penulis berkarir disana.

23. Keluarga Besar Kosan Wisma Asri. Terimakasih atas segala kekeluargaannya dan dukungan kepada penulis selama di Bandar Lampung.

24. Almamaterku tercinta serta seluruh pihak terkait yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, terimakasih atas segala bantuan dan motivasi sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan baik dan menyelesaikan perkuliahan

Akhir kata, Penulis memohon maaf kepada semua pihak apabila skripsi ini masih banyak kesalahan dalam penulisan dan kurang dari kesempurnaan. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi kita semua.

Bandar Lampung, 2 November 2022

Penulis

Zahrah Khairani

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR TABEL	iv
DAFTAR GAMBAR.....	v
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian.....	2
1.3 Manfaat Penelitian.....	2
II. TINJAUAN PUSTAKA.....	3
2.1 Spons	3
2.2 Fungi yang Berasosiasi dengan Spons	5
2.3 <i>Aspergillus nomiae</i>	6
2.4 Teknik Isolasi dan Kultivasi Fungi	8
2.5 <i>Solid State Fermentation</i> (SSF).....	9
2.6 Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi Berasosiasi Spons	10
2.6.1 Alkaloid.....	12
2.6.2 Peptida.....	12
2.7 Senyawa Bioaktif Antibakteri	14
2.8 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.9 <i>High-throughput Screening Assay</i>	16
2.10 Maserasi.....	17
2.11 Pemisahan Menggunakan Metode Kromatografi	18
2.11.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	18
2.11.2 Kromatografi Kolom (KK).....	20
2.12 Karakterisasi Senyawa.....	21
2.12.1 Fourier Transform Infra Red (FTIR).....	21
2.12.2 Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS/MS).....	22

III. METODE PENELITIAN	25
3.1 Waktu dan Tempat	25
3.2 Alat dan Bahan	25
3.3 Biomaterial.....	26
3.4 Prosedur Kerja.....	27
3.4.1 Peremajaan Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF.....	27
3.4.2 Identifikasi Morfologi Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF Secara Makroskopis dan Mikroskopis.....	27
3.4.3 Kultivasi Media Padat (<i>Solid State Fermentation</i>)	28
3.4.4 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bioaktif	28
3.4.5 Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	28
3.4.6 Fraksinasi Menggunakan Kromatografi Kolom.....	29
3.4.7 Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri	30
3.4.8 Pengujian Antibakteri dengan <i>High-throughput Screening Assay</i>	31
3.4.9 Karakterisasi Senyawa	32
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Peremajaan dan Identifikasi Morfologi Isolat Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF	33
4.2 <i>Solid State Fermentation</i> dan Ekstraksi Senyawa Bioaktif	35
4.3 Fraksinasi Ekstrak Kasar (A12-RFC) Biomassa A12-RF.....	39
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri.....	44
4.5 Karakterisasi Fraksi Aktif Antibakteri (CF1-40F24).....	47
V. KESIMPULAN DAN SARAN	52
5.1 Kesimpulan.....	52
5.2 Saran.....	53
DAFTAR PUSTAKA	54
LAMPIRAN.....	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil metabolit sekunder dari fungi berasosiasi dengan biota laut.....	11
2. Kategori prioritas bakteri patogen.....	15
3. Persentase inhibisi dari pengujian aktivitas antibakteri	46

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Organ Spons.....	4
2. Karakteristik mikroskopis <i>A. nomiae</i>	7
3. Proses SSF untuk meningkatkan produk fermentasi.....	10
4. Ikatan Peptida.....	13
5. Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i>	15
6. Reduksi resazurin (biru) menjadi resorufin (merah muda).....	17
7. Urutan Kemampuan Daya Elusi.....	20
8. Prinsip Instrument FTIR (Thermonicolet Corporation, 2007).....	22
9. Prinsip Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS).....	23
10. Morfologi makroskopis Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF dalam media agar.	33
11. Hasil identifikasi fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF secara mikroskopis	34
12. Inokulasi Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF.....	35
13. Kultivasi Menggunakan Kulit Udang Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF	36
14. Ekstrak kasar fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF setelah evaporasi.	37
15. Hasil Uji KLT pada Ekstrak Kasar Biomassa Hasil	38
16. Impregnasi ekstrak kasar fungi (A12-RFC) sebelum fraksinasi.	40
17. Fraksinasi ekstrak fungi A12-RF menggunakan kromatografi.....	41
18. Hasil Visualisasi KLT Menggunakan UV 254 nm untuk 40 fraksi	42
19. Hasil Visualisasi KLT Menggunakan Pereaksi.....	42
20. Hasil visualisasi KLT setelah fraksinasi kedua.....	43
21. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Ekstrak.....	45
22. Kromatogram CF1-40F24.....	47
23. Spektrum ESI-TOF-MS/MS milik waktu retensi 9.62	48
24. Struktur molekul senyawa $C_{38}H_{47}N_9O_6$	49
25. Hasil Analisis IR Biomassa Fungi <i>A. nomiae</i> A12-RF F-24.....	50

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Peningkatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen resisten merupakan permasalahan yang sangat serius bagi pengobatan dan kesehatan di seluruh dunia. Salah satu bakteri patogen resisten antibiotik adalah *Staphylococcus aureus* yang dapat menyebabkan mastitis, dermatitis, atau infeksi saluran pernafasan (Toelle dan Lenda, 2014). Kemampuan adaptasi yang kuat sehingga bersifat resisten terhadap berbagai jenis antibiotik (*Multi Drug Resistance*) (Afifurrahman *et al.*, 2014). Hal ini mengakibatkan berbagai antibiotik yang sudah ditemukan menjadi kurang berfungsi akibat adanya resistensi. Hal tersebut mendorong para peneliti untuk berusaha menemukan sumber antibiotik baru, salah satunya dari biota laut.

Ekosistem laut memiliki keanekaragaman hayati yang sangat banyak. Dari berbagai keanekaragaman hayati tersebut, masih banyak yang belum dimanfaatkan (Baransano dan Mangimbulude, 2011), padahal ekosistem tersebut memiliki potensi untuk memproduksi senyawa metabolit yang berpotensi sebagai antibiotik baru. Mikroorganisme yang bersimbiosis dengan spons juga telah diketahui memproduksi senyawa bioaktif termasuk senyawa antibakteri (Hildebrand, 2004) dimana mikroorganisme tersebut salah satunya adalah fungi (Tan dan Zou, 2001; Zhou *et al.*, 2016).

Pemanfaatan biomaterial yang berbeda pada media kultur fungi dapat menghasilkan konsentrasi dan keberagaman senyawa bioaktif (Molen *et al.*, 2013). Di sisi lain, kulit udang mengandung nutrisi yang dapat mencukupi kebutuhan hidup fungi seperti sumber karbon dan nitrogen (Mathivanan *et al.*, 2021) sehingga dimungkinkan untuk

digunakan sebagai media produksi senyawa antibakteri dari isolat fungi. Melalui penelitian sebelumnya diketahui bahwa ekstrak fungi *A. nomiae* A12-RF yang berasosiasi spons laut memiliki aktivitas antibakteri (National Center for Biotechnology Information. 2021). Akan tetapi, senyawa spesifik dari ekstrak fungi *A. nomiae* A12-RF yang memiliki aktivitas antibakteri tersebut belum dikarakterisasi.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh ekstrak fungi *A. nomiae* A12-RF dari hasil kultivasi dengan metode *Solid State Fermentation* menggunakan kulit udang yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*
2. Memperoleh fraksi yang memiliki aktivitas antibakteri dari fungi *A. nomiae* A12-RF terhadap isolat klinis *S. aureus*
3. Melakukan karakterisasi senyawa antibakteri yang diproduksi dari fungi *A. nomiae* A12-RF secara fisikokimia.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Sebagai langkah awal penemuan kandidat senyawa antibakteri dari fungi yang berasosiasi dengan spons menggunakan media kulit udang.
2. Manambah informasi penelitian kimia bahan alam.

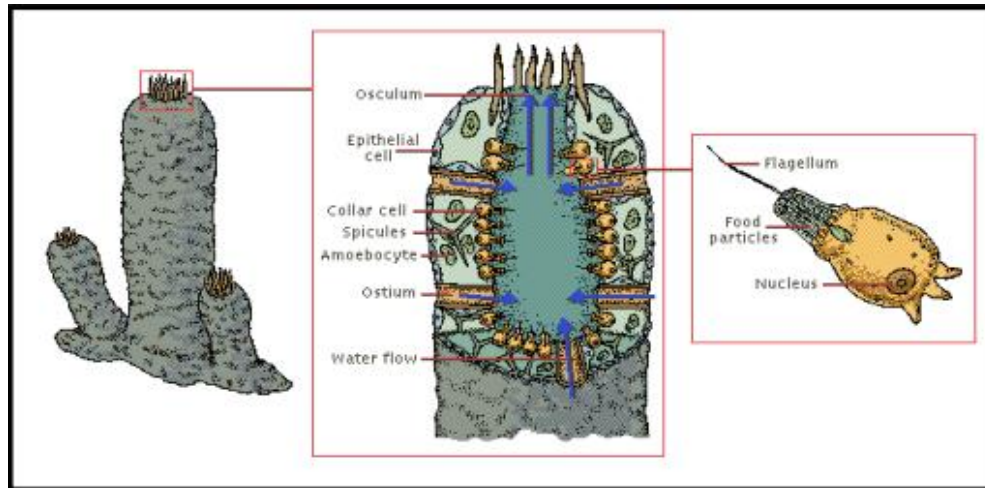
II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Spons

Organisme mempunyai berbagai ciri yaitu bernafas, bereproduksi, tumbuh dan berkembang, membutuhkan nutrisi, bergerak, peka terhadap rangsangan, beradaptasi (Wallace *et al.*, 1986), mengeluarkan zat sisa (ekskresi), dan dapat mempertahankan homeostatis. Oleh karena itu hewan, tumbuhan, jamur, protista, bakteri, atau archaeon termasuk ke dalam organisme (Powell, 2017). Spons termasuk suatu hewan laut yang dikelompokkan ke dalam filum porifera karena memiliki pori–pori dan saluran (Warren, 1982). Hewan ini umumnya banyak dijumpai di perairan tropik dan sub tropik. Sebarannya dimulai dari zona internal hingga ke zona subtidal suatu perairan. Hewan jenis ini termasuk primitif dengan cara hidup menetap (*sedentaire*) dan menyaring apapun yang berada disekelilingnya menggunakan pori–pori (*ostia*) lalu dialirkan keseluruh bagian tubuhnya melalui saluran (*canal*) dan terakhir dikeluarkan menggunakan pori–pori yang terbuka (*ostula*). Sebab itulah spons bersifat *non-selective feeder* (menyaring apapun) (Aunurohim dan Iwenda, 2013).

Spons memiliki morfologi seperti tabung dengan bentuk tidak beraturan, memiliki cabang dan pori–pori pada permukaan terluarnya (**Gambar 1**). Spons umumnya melekat pada terumbu karang atau di dasar laut. Spons tidak memiliki jaringan, memiliki otot serta organ dalam yang sedikit. Spons pada umumnya mengeluarkan zat racun untuk bertahan dari predator maupun kompetitor. Di dalam zat ini terdapat metabolit sekunder yang mana lebih dari 200 senyawa baru telah diisolasi. Senyawa ini pada suatu organisme pada umumnya berfungsi untuk bertahan dari predator, kompetitor, dan untuk mendukung proses reproduksi. Tanpa senyawa ini organisme

akan menderita kerusakan atau menurunnya kemampuan bertahan hidup (Murti, 2006).



Gambar 1. Struktur Organ Spons (Brusca dan Brusca, 1990).

Metabolit sekunder dari spons yang telah banyak diisolasi yaitu alkaloid. Kajian senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid telah banyak ditemukan dari spons kelas Demospongia. He *et al.* (2014) mengisolasi Hainanektamina A-C dari spons kelas Demospongia. He *et al.* (2014) mengisolasi Hainanektamina A-C dari spons *Hyrtios erecta*. Yu *et al.* (2014) berhasil mengisolasi senyawa turunan Aaptamin dari spons *Aaptos aaptos* yang memiliki aktivitas sebagai antifungi dan anti HIV 1. Arai *et al.* (2016) berhasil mengisolasi N-Metilnipatin A dari spons *Xestospongia sp.* Kotoku *et al.* (2017) mengisolasi Biakamida A-D dari spons *Petrosaspongia sp.* sebagai penghambat pertumbuhan sel tumor. Sejauh ini kajian tentang senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh spons *Clathria sp.* masih sedikit. Melawaty dan Pasau (2015) telah melaporkan bahwa spons *Clathria reinwardtii* mengandung senyawa α -limonen, namun belum diperoleh struktur tersebut.

Telah dilaporkan hampir 40–60% dari total biomassa spons termasuk mikroorganisme yang merupakan penghasil senyawa bioaktif diantaranya memiliki potensi sebagai antibakteri (Murti, 2006). Mikroorganisme yang berasosiasi dengan

spons dapat menjadi salah satu alternatif untuk menghasilkan berbagai senyawa bioaktif dalam jumlah besar melalui pengkulturan mikroba (Abubakar *et al.*, 2011).

2.2 Fungi yang Berasosiasi dengan Spons

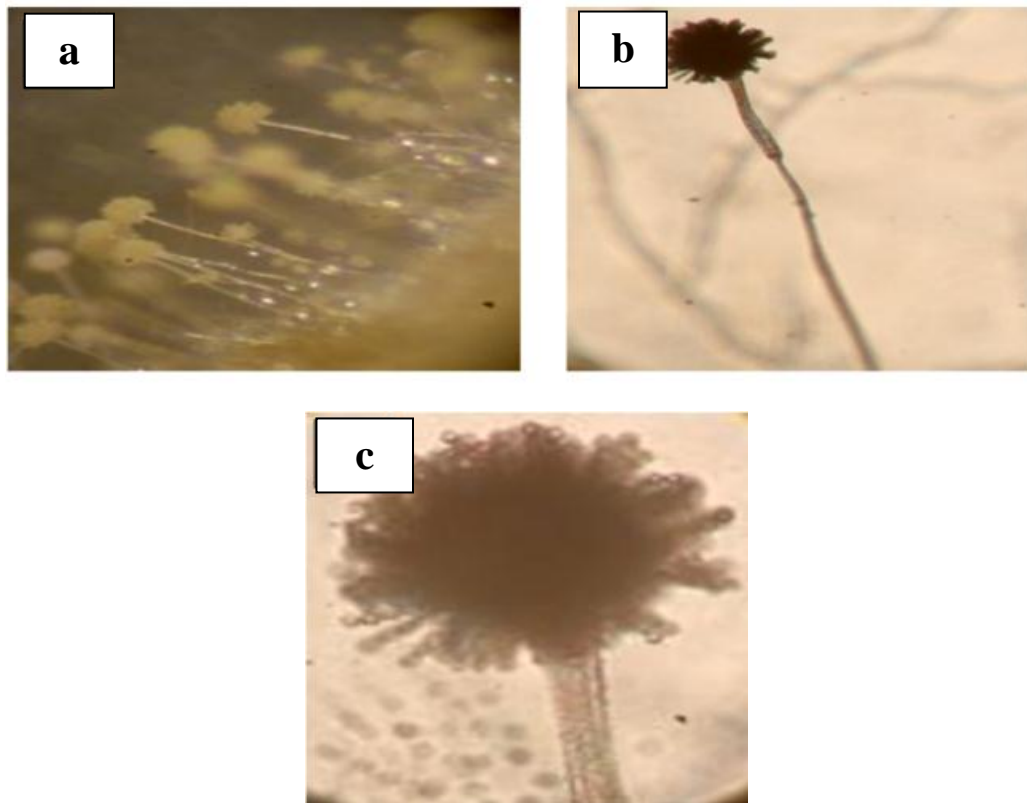
Fungi umumnya ditemukan di dalam kolom air (mikoplankton), di sedimen, berasosiasi dengan biota laut (baik sebagai parasit maupun simbiosis), atau sisa bahan-bahan organik yang mengalami pelapukan (Jones, 2000). Menurut Campbell dan Reece (2008), fungi dibagi menjadi 5 filum yaitu *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota*, *Glomeromycota* dan *Basidiomycota*. Fungi merupakan organisme yang mempunyai inti sel dan membran sel (eukariotik), memiliki sel tunggal (uniseluler) atau sel majemuk (multiseluler) yang dapat membentuk spora (Alexopoulos dan Mimms, 1979). Reproduksi jamur baik secara seksual maupun aseksual sama-sama membentuk spora tetapi spora yang dibentuk berbeda. Spora seksual jamur berupa askospora, basidiospora, atau zigospora sedangkan spora aseksual jamur berupa konidiospora atau sporangiospor (Zoberi, 1972), tidak berkrolofil, terdapat benang-benang tunggal atau benang-benang yang bercabang dengan dinding selulosa atau kitin (Suarnadwipa *et al.*, 2008). Fungi merupakan salah satu penyusun keanekaragaman hayati tertinggi di dunia. Dinding sel jamur adalah struktur kompleks yang terdiri dari kitin, glukukan, dan polimer lainnya. Keberadaan jumlah fungi diperkirakan terdapat 1.5-1.6 juta spesies di alam (Deacon, 2006).

Fungi memiliki hubungan simbiosis mutualisme dengan spons dimana spons merupakan tempat hidup bagi berbagai macam mikroba dan mikroba dapat melindungi spon dari predator dengan memproduksi metabolit sekunder, serta membantu mengambil makanan dari luar untuk spons (Peay *et al.*, 2008). Fungi diketahui menghasilkan berbagai senyawa kimia metabolit sekunder yang dapat berkontribusi sebagai bahan alami yang sangat berpotensi sebagai sumber obat baru. Berdasarkan penelitian, banyak ditemukan sumber metabolit sekunder aktif yang unik

secara struktur (Bugni dan Ire, 2004). Senyawa metabolit sekunder dapat diproduksi dari fungi dan bakteri yang berasosiasi pada spon laut. Diantara senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan memiliki aktivitas sebagai anti kanker, antibakteri, antijamur, antivirus, antiprotozoa, antiinflamasi.

2.3 *Aspergillus nomiae*

A. nomiae adalah spesies jamur dalam genus *Aspergillus*. Telah dilaporkan bahwa spesies ini dapat menghasilkan aflatoksin (Budhkar, et al. 1999). *A. nomiae* adalah spesies anamorfik yang dimasukkan ke bagian *Aspergillus flavus*, yang saat ini terdiri dari 22 spesies yang berdasarkan karakter morfologinya mirip dengan 7 spesies seperti, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus tamarii*, *A. nomiae*, *Petromyces alliaceus*, *Aspergillus togoensis*, *Aspergillus leporis*, dan *Aspergillus avenaceus*. Pada **Gambar 2.** terlihat bahwa *A. nomiae* bersepta dengan kepala konidiofor terminal globus yang sporanya tersusun secara radial dalam rantai dan permukaan spora kasar (Azeez *et al.*, 2016).



Gambar 2. Karakteristik mikroskopis *A. nomiae* (a) Konidia dan (b) Koniofor (c) Kepala Konidiofor Secara Rinci (Caira *et al.*, 2012); (Azeez *et al.*, 2016).

Klasifikasi *A. nomiae* menurut Kurtzman, B.W. Horn dan Hesseltine (1987) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Fungi
 Divisi : Ascomycota
 Kelas : Eurotiomycetes
 Orde : Eurotiales
 Famili : Trichocomaceae
 Genus : *Aspergillus*
 Spesies : *Aspergillus nomiae*

2.4 Teknik Isolasi dan Kultivasi Fungi

Sel mikroba dengan media harus memiliki tekanan osmose yang sama, oleh karena itu untuk pertumbuhannya jamur membutuhkan media yang isotonis. Fungi tumbuh baik dalam kondisi asam atau pH di bawah 7,0. Pada umumnya, lingkungan yang hangat dan lembab mempercepat pertumbuhan jamur selain itu media harus steril dan tidak mengandung zat penghambat. Nutrisi yang mudah digunakan oleh mikroorganisme meliputi karbon, nitrogen, unsur non logam seperti sulfur dan fosfor, unsur logam seperti Ca, Zn, Na, K, Cu, Mn, Mg, dan Fe, vitamin, air, dan energi (Shilmy, 2017).

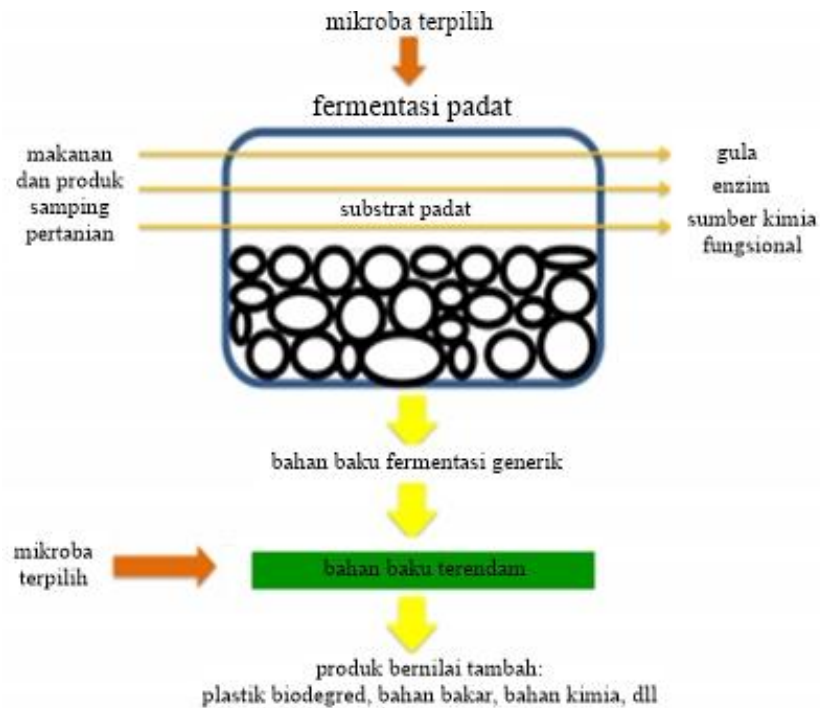
Luthfiah (2020) telah mengkultur dari inang spons laut menggunakan media *Tryptic Soy Broth* (TSB), Malt Extract (ME), dan beras dengan waktu inkubasi 7–14 hari. Pada *malt extract* (ME) menyimpan banyak sumber karbon dan nitrogen. Sumber karbon diperoleh dari *malt extract* dalam bentuk maltosa (Lougham, 1997). Sedangkan pada *tryptic soy broth* mengandung dari pankreatik kasein, enzimatik kedelai, sodium klorida yang berfungsi untuk menjaga keseimbangan osmotik dan bertindak sebagai buffer untuk menjaga pH media ini yaitu $\pm 7,3$ pada suhu 25°C (Faddin, 1985). Kulit udang memiliki komposisi kalium (K) 8,13%, karbon organik (C) 17,45%, nitrogen (N) 3,62%, fosfor (P) 2,27%, magnesium (Mg) 0,59%, dan kalsium (Ca) 7,64%; dan rasio C/N sebesar 4,82 (Mathivanan *et al.*, 2021).

Kultivasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk menumbuhkan isolat dalam media buatan di luar habitat aslinya. Kultivasi berfungsi untuk memperbanyak jumlah mikroba dengan cara membiarkan mikroba tersebut memperbanyak diri dalam media biakan *in vitro* di laboratorium (Bakhtra *et al.*, 2020). Kokultivasi merupakan metode untuk memperbanyak mikroba dengan cara mengkultur secara bersamaan antara fungi dan inokulum bakteri dalam satu media kultur tertentu (Zhang *et al.*, 2017). Kokultivasi dilakukan di ruang gelap disesuaikan dengan kondisi fungi yang akan

ditransformasi. Teknik kokultivasi terhadap bakteri dapat merangsang fungi untuk mengeluarkan suatu zat yang mampu melindungi diri dari serangan bakteri maupun terjadinya kombinasi antara senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan bersama dengan bakteri tersebut. Hal tersebut dapat ditandai dengan terjadinya peningkatan maupun penurunan kandungan dari senyawa metabolit sekunder (Wahab *et al.*, 2019). Secara umum, fungi memiliki waktu pertumbuhan optimal sampai 14 hari, dimana diawali dengan fase awal pertumbuhan (fase lag) pada hari ke 1-2, selanjutnya fase eksponensial pada hari ke 3-5, lalu fasa stationer pada hari ke 6-10, dan terakhir fasa kematian pada hari ke 10-14 (Albeghany *et al.*, 2018).

2.5 Solid State Fermentation (SSF)

Solid State Fermentation (SSF) didefinisikan sebagai pertumbuhan mikroba tanpa fase air yang mengalir bebas. SSF adalah alternatif dari fermentasi terendam untuk meningkatkan produk fermentasi. SSF (**Gambar 3**). merupakan suatu teknik untuk memproduksi metabolit dari mikroba (Tsuchiya *et al.*, 1994). Proses ini dilakukan terhadap substrat berfasa padat yang mengandung kadar air lebih rendah. Keunggulan dari teknik ini adalah konsentrasi produk yang diperoleh tinggi akan tetapi hanya membutuhkan energi yang relatif rendah (Maruyama *et al.*, 2000). Kandungan air yang terkandung di dalamnya diserap oleh substrat dalam matriks padat dan lebih mempermudah pertumbuhan mikroorganisme dalam mentransfer oksigen (Robinson *et al.*, 2001). Beberapa limbah pertanian, seperti jerami, ampas tebu, sekam padi, tongkol jagung dapat digunakan sebagai substrat untuk teknik ini (Gonzales *et al.*, 1993).



Gambar 3. Proses SSF untuk meningkatkan produk fermentasi (Zahra *et al.*, 2017).

Komposisi kimiawi, ukuran partikel, dan porositas substrat mempengaruhi kinerja proses SSF. Selain faktor tersebut, ketersediaan substrat, komposisi makro dan mikronutrien, dan biaya adalah faktor penting lainnya untuk SSF (Murado *et al.*, 1996). Syarat utama dalam melakukan proses ini adalah oksigen atau udara dialirkan ke dalam medium (Zhang, 2003).

2.6 Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi Berasosiasi Spons

Metabolit sekunder merupakan suatu komponen hasil metabolisme yang tidak esensial untuk pertumbuhan organisme tetapi berperan dalam interaksi sel dengan lingkungan, hal tersebut menjamin ketahanan hidup organisme tersebut pada ekosistem hidupnya (Verpoorte dan Alfermann, 2000). Senyawa ini tidak selalu

dihasilkan namun pada keadaan tertentu. Setiap organisme pada umumnya menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang berbeda-beda. Lingkungan yang berbeda mempengaruhi produksi metabolit sekunder. Apabila suatu spons hidup di lingkungan yang berbeda meskipun dalam spesies yang sama maka metabolit yang dihasilkan pun akan berbeda (Corley *et al.*, 1988). Pada spons, terjadi interaksi simbiotik mutualisme terjadi antara spons dengan mikroorganisme. Interaksi simbiotik mutualisme terjadi antara spons dan mikroorganisme. Bagi spons, simbiosis mikroorganisme berfungsi dalam membantu proses perolehan nutrisi (terutama dalam fiksasi karbon dan nitrogen), penstabil kerangka spons, proses ekskresi dan terlibat dalam siklus produksi metabolit sekunder (Hentschel *et al.*, 2002). Bagi mikroorganisme, simbiosis spons berfungsi sebagai tempat berlindung untuk mikroorganisme (Taylor *et al.*, 2007) selain itu, terjadi transfer gen horizontal dari intron mitokondria dari fungi ke sponge (Rot *et al.*, 2006). Fungi dari laut dapat berperan penting dalam memproduksi senyawa metabolit sekunder (Tan dan Zou, 2001). Berbagai senyawa metabolit yang telah diisolasi dari fungi laut ditunjukkan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Metabolit Sekunder dari Fungi Berasosiasi Dengan Biota Laut (Bhadury *et al.*, 2006).

Sumber	Metabolit	Kelompok Senyawa
<i>Emericella unguis</i>	Guisinol dan Lunatin 1)	Depside
<i>Trichoderma virens</i>	Trichodermamide B	Dipeptide
<i>Aspergillus versicolor</i>	Aspergillitine Chromone	derivative
<i>Ascochyta salicorniae</i>	Ascosalipyrrolidinone A	Alkaloid
<i>Aspergillus ochraceus</i>	CJ-17665 I	Diketopiperazine & N-indole
<i>Aspergillus ostianus</i>	8-Chloro-9-hydroxy-8, 9-deoxyasperlactone 1) 9-chloro-8-hydroxy-8, 9-deoxyasperlactone 2) 9-chloro-8-hydroxy-8, 9-deoxyaspyrone 3)	Chlorinated compounds
<i>Fusarium sp.</i>	Enniatin B	Cyclodepsipeptide

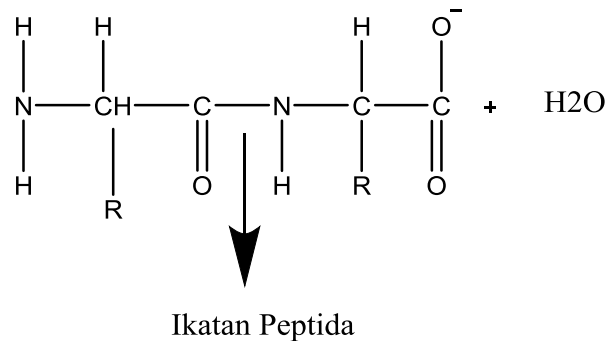
2.6.1 Alkaloid

Alkaloid termasuk golongan senyawa organik yang mengandung paling sedikit satu atom nitrogen. Sebagian besar nitrogen merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Alkaloid dapat berbentuk padatan, cairan atau kristalin. Sebagian besar alkaloid dapat larut dalam air dan sebagian larut dalam etanol, eter, atau kloroform. Alkaloid bersifat tidak volatile (Eberhard, 2002). Alkaloid umumnya diklasifikasikan menurut kesamaan sumber asal molekulnya (*precursors*), didasari dengan jalur metabolisme (*metabolic pathway*) yang digunakan untuk membentuk molekul itu. Kebanyakan alkaloid bersifat basa dan sifat tersebut tergantung pada adanya pasangan elektron pada nitrogen (Waltraud dan Helmut, 2007). Alkaloid dapat diperoleh dari hewan, tumbuhan, maupun mikroorganisme seperti bakteri, fungi, aktinomisetes, dan lain-lain. Zhang *et al.* (2007) telah mengisolasi senyawa alkaloid yaitu Fumitremorgin C dan 12,13-Dihydroxy fumitremorgin C dari fungi *Aspergillus fumigatus* asosiasi spons laut yang bertindak sebagai antibakteri *S. Aureus* MDR. Limbadri *et al.* (2018) mengisolasi Fumigatosida F dari *A. fumigatus* asosiasi spons untuk antibakteri *S. Aureus*. Zhu *et al.* (2011) telah mengisolasi Aspergicin dari fungi genus *Aspergillus* asosiasi spons sebagai antibakteri *S. Aureus*. Luo *et al.* (2017) juga mengisolasi dari fungi genus *Aspergillus* yang berasosiasi dengan spons yaitu Gliotoxin sebagai antibakteri *S. Aureus*.

2.6.2 Peptida

Senyawa peptida terbentuk dari ikatan peptide. Hal tersebut terjadi jika atom nitrogen pada salah satu asam amino yang berikatan dengan gugus karboksil dari asam amino lain (Fessenden, 1986). Suatu peptida dapat dibentuk dari dua asam amino atau lebih. Ikatan amida antara suatu gugus amino dari suatu asam amino dan gugus karboksil dari asam amino lain disebut ikatan peptida. Ikatan peptida adalah ikatan kovalen yang terbentuk antara dua molekul asam amino ketika

gugus karboksil asam amino bereaksi dengan gugus amino dari asam amino yang lain dengan melepaskan molekul air. Ikatan ini ada ketika gugus karboksil dari satu molekul asam amino bereaksi dengan gugus amino dari molekul asam amino lainnya menyebabkan pelepasan molekul air (H_2O) maka, reaksi ini menghasilkan proses kondensasi. Pembentukan ikatan ini membutuhkan energi yang berasal dari ATP (Adenosin Trifosfat). Ikatan peptida bersifat polar dan memiliki kemampuan untuk membentuk ikatan hidrogen karena gugus karbonil ($C=O$) merupakan akseptor hidrogen sedangkan gugus $-NH$ merupakan donor hidrogen (Korhonen H dan Pihlanto A, 2006). Contoh dari peptida yang terbentuk ditunjukkan pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Ikatan Peptida (Plotz, 2005)

Peptida dengan komposisi dan urutan asam amino tertentu yang mempunyai dampak atau fungsi positif bagi kesehatan tubuh disebut sebagai peptida bioaktif (Korhonen H dan Pihlanto A. 2006).

Tiga siklopeptida telah diisolasi oleh Zhang *et al.* (2010) dari fungi *Aspergillus niger* yaitu siklo-(l-Trp-l-Ile), siklo-(l-Trp-l-Phe), dan siklo-(l-Trp-l-Tyr). Hwang *et al.* (2020) juga telah mengisolasi polipeptida dari *Aspergillus allahabadii* yaitu siklopentapeptida dan *Aspergillus ochraceopetaliformis* yaitu sikloheksapeptida.

2.7 Senyawa Bioaktif Antibakteri

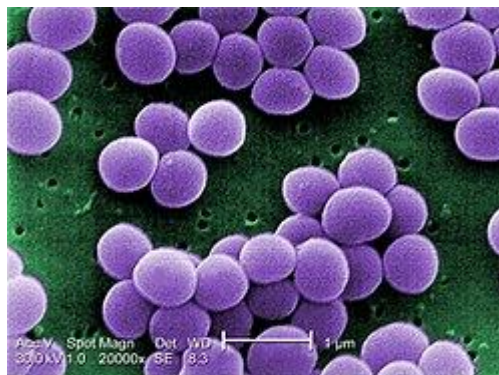
Senyawa bioaktif merupakan suatu senyawa aktif yang termasuk metabolit sekunder. Antimikroba adalah kelompok besar bahan kimia yang diproduksi melalui alam (mikroorganisme, tumbuhan, dan hewan) cara semisintetik atau sintetis dan efektif melawan mikroorganisme (bakteri, jamur, virus, dan parasit) (Nweze, 2020). Menurut Wang (2020), telah ditemukan struktur dan aktivitas anti mikroba dari 272 senyawa yang berasal dari fungi laut terlapor dari tahun 1998 hingga 2019. Luciana *et al.* (2020) telah mengisolasi senyawa poliketida dari *Aspergillus welwitschiae* asosiasi spons untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S. Aureus*. Senyawa antibakteri aspochalasin B dan D berhasil diisolasi oleh Ratnaweera *et al.* (2016) dari ekstrak kasar *Aspergillus flavipes* fungi asosiasi dengan spons kelas Demospongiae dan ekstrak tersebut dapat menghambat pertumbuhan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Antibiotik bakteriostatik dapat menghambat biosintesis protein (atau transkripsi tertentu). Hal tersebut bergantung pada energi yang meningkatkan aktivitas metabolisme dan kerusakan makromolekul, yang berkontribusi pada pembunuhan sel bakteri setelah terpapar senyawa bakterisida (Gefen *et al.*, 2014).

Multidrug Resistance (MDR) adalah suatu keadaan dimana bakteri resisten terhadap minimal tiga jenis antibiotik. MDR ini dapat disebabkan karena beberapa hal antara lain adalah pemakaian antibiotik yang tidak memenuhi kaidah yang telah ditentukan yaitu tepat dosis, tepat diagnostik dan tepat bakteri penyebab. *Multidrug-resistant organisms* (MDRO) adalah mikroorganisme, terutama bakteri yang mengalami MDR (Estianingsih *et al.*, 2016). Resistensi antimikroba selalu ditemukan di berbagai negara. Hal ini menyebabkan WHO pada 2017 merilis daftar prioritas patogen resisten antibiotik yang secara global telah menjadi ancaman terbesar bagi kesehatan manusia (**Tabel 2**).

Tabel 2. Kategori prioritas bakteri patogen (World Health Organization, 2017).

Mikroorganisme	Kategori dan prioritas
<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Peringkat pertama dan kritis
<i>Helicobacter pylori</i> <i>Campylobacter spp.</i> <i>Salmonellae</i>	Peringkat kedua dan tinggi
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Streptococcus pneumonia</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Shigella spp.</i>	Peringkat ketiga dan sedang

2.8 *Staphylococcus aureus*

**Gambar 5.** Morfologi *Staphylococcus aureus* (Ji, 2020).

Staphylococcus aureus termasuk bakteri gram positif atau bakteri yang dapat mempertahankan zat warna mengandung kristal violet sewaktu proses pewarnaan gram (Syahrurachman *et al.*, 2014). Bakteri jenis ini akan berwarna ungu di bawah mikroskop. Bakteri ini bersel tunggal (uniseluler) dan tidak memiliki membran sel (prokariotik). *S. Aureus* tidak membentuk spora dengan

perkembangbiakan bakteri secara seksual yaitu rekombinasi genetik (konjugasi, transduksi, dan transformasi) serta aseksual yaitu pembelahan biner (Kwong *et al.*, 2017). Bakteri ini tidak bergerak, dan termasuk bakteri fakultatif anaerob yang tumbuh pada suhu optimum 37 °C. dalam waktu 0,47 jam (Prescott, 2002). Pada media padat, koloni berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5**.

S. aureus mempunyai kemampuan adaptasi pada lingkungan yang berbeda dan dapat berkolonisasi pada kulit manusia, kuku, lubang hidung, dan membran mukosa dan dapat menyebar ke manusia lain melalui kontak fisik dan aerosol. Sebaran infeksi *S. aureus* dimulai dari kulit, luka dan jaringan dalam. Infeksi dapat berlanjut sampai menyebabkan pneumonia, endokarditis, arthritis septik, dan sepsis (Kluytmans *et al.*, 1997).

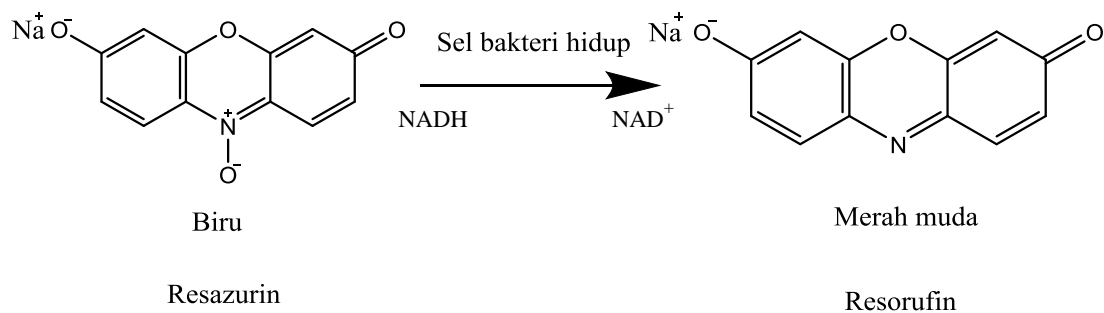
Menurut Jawetz *et al.* (2013) dan Syahrurahman *et al.* (2010), klasifikasi dari bakteri *S. aureus* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Divisi	: Protophyta
Kelas	: Schizomycetes
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Microcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.9 High-throughput Screening Assay

Keberadaan aktivitas antibakteri dapat dilihat dari potensi konsentrasi senyawa dalam memberikan efek terhadap bakteri. Teknik pengujian yang sering digunakan ialah

metode dilusi menggunakan *microtiter plate 96 wells*. Suatu konsentrasi (mg/L) pertumbuhan bakteri yang diamati dapat dihambat pada kondisi yang telah ditentukan (Wiegand *et al.*, 2008). Perkembangbiakan bakteri diamati pengukuran kekeruhan menggunakan alat *Hospitex Diagnostics*. Terjadinya perubahan wujud media tumbuh dari tak keruh menjadi keruh dengan metode dilusi cair menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. *Optical Density* (OD) merupakan parameter tingkat keberadaan mikroorganisme dengan prinsip kerapatan pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan blanko (Pratiwi, 2008). Suspensi bakteri diukur pada λ pada 635 nm untuk mendapatkan kekeruhan suspensi sesuai standar *Mc-Farland* sebesar 0,5. Setelah itu bakteri siap digunakan dalam pengujian. Mikrodilusi membutuhkan penambahan resazurin sebagai indikator redoks. Sel bakteri aktif dapat mereduksi senyawa non-fluoresen resazurin (biru) ke resorufin fluoresen (merah muda) (**Gambar 6**) dan sinyal fluoresen tersebut diukur menggunakan spektrofotometer untuk melihat aktivitas metabolik (O'Brien *et al.*, 2000).



Gambar 6. Reduksi resazurin (biru) menjadi resorufin (merah muda) akibat aktivitas sel bakteri hidup (Paul *et al.*, 2018).

2.10 Maserasi

Maserasi merupakan salah satu metode ekstraksi padat-cair. Prinsip teknik ini yaitu sampel ditempatkan dalam suatu wadah yang tertutup, dan selanjutnya ditambahkan pelarut polar atau non-polar yang dapat melarutkan analit yang diinginkan. Sampel

dibiarkan berada dalam pelarut selama $\geq 1 \times 24$ hingga ekstraksi berjalan optimal (Khopkar, 2008). Selama proses maserasi, sampel diaduk secara berkala. Selanjutnya larutan dipisahkan dari padatan sampel dengan menggunakan kertas saring atau dapat juga didekantir atau disentrifugasi untuk memisahkan larutan dari padatan yang tidak larut (Settle, 1997). Dalam proses maserasi terjadi pelunakan jaringan dengan terjadi penguraian jaringan menjadi sederhana. Jaringan melunak dan senyawa yang ada di dalam jaringan tercuci keluar ke dalam cairan (ekstrak). Ekstrak yang diperoleh mengandung banyak metabolit seperti fenol, terpen, flavonoid, dan pigmen (Azwanida, 2015).

2.11 Pemisahan Menggunakan Metode Kromatografi

Kromatografi merupakan teknik pemisahan dua atau lebih senyawa atau ion dengan prinsip distribusi senyawa tersebut diantara dua fase. Fase yang satu bergerak lalu fase yang lainnya diam. Fase tersebut dapat berupa padat-cair, cair-cair, gas-padat, atau gas-cair (Gritter *et al.*, 1991).

2.11.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu metode untuk memisahkan suatu senyawa dari suatu campuran dengan prinsip 2 fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam yang digunakan adalah silika gel sedangkan fase geraknya adalah pelarut (eluen). Fase gerak bergerak di dalam fase diam yaitu suatu lapisan berpori, karena ada gaya kapiler. Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efesiennya dan resolusinya (Wulandari, 2011).

Lapisan tipis yang digunakan sebagai penyerap juga dapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel eksklusi, dan siklodektrin yang digunakan

untuk pemisahan senyawa kiral (Gandjar dan Rohman, 2007). Penotolan cuplikan dapat dilakukan dengan memakai pipa kapiler halus yang dibuat dari pipa kaca, beberapa kali penotolan dapat dilakukan pada tempat yang sama, asal lapisan sudah kering sebelum penotolan berikutnya (Gritter *et al.*, 1991).

Perbedaan migrasi termasuk perolehan dari diferensiasi tingkat afinitas masing-masing komponen dalam fase diam dan fase gerak. Kecepatan migrasi komponen sampel bergantung pada sifat fisika kimia dari fase diam, fase gerak dan komponen sampel. Retensi dan selektivitas kromatografi ditentukan dari interaksi antara fase diam, fase gerak dan komponen sampel yang berupa ikatan hidrogen, pasangan elektron donor atau pasangan elektron-akseptor (transfer karge), ikatan ion-ion, ikatan ion-dipol, dan ikatan van der Waals (Deinstrop, 2007).

Pada umumnya senyawa aromatik terkonjugasi dan beberapa senyawa tak jenuh dapat menyerap sinar UV. Senyawa-senyawa ini dapat dianalisis dengan KLT dengan fase diam yang diimpregnasi indikator fluoresensi dan deteksi dapat dilakukan hanya dengan pemeriksaan di bawah sinar UV 254 nm (Rabel, 2003). Visualisasi fisika dilihat dengan noda kromatogram yang mengabsorpsi radiasi ultraviolet (UV) atau berfluoresensi dengan radiasi UV (254 nm atau 366 nm). Visualisasi kimia dilakukan dengan mereaksikan kromatogram dengan pereaksi warna seperti $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$, Dragendorff, dan Ninhidrin. Pereaksi $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ merupakan pereaksi *universal* yang dapat mendeteksi seluruh keberadaan komponen senyawa (Murrell dan Touchstone, 1983). Dragendorff pada umumnya mendeteksi komponen senyawa yang terkandung gugus N tersier. Sedangkan ninhidrin mendeteksi keberadaan komponen senyawa peptide. (Santiago, 2013). Setelah itu dihasilkan warna atau fluoresensi spesifik yaitu dengan penyemprotan atomizer atau memberikan uap zat kimia (Mulja dan Suharman, 1995).

Jarak perpindahan senyawa kromatografi biasanya dinyatakan dengan angka Rf atau hRf. Angka Rf berkisar antara 0,00 dan 1,00. Sedangkan hRf merupakan angka Rf dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka 0 sampai 100, namun karena

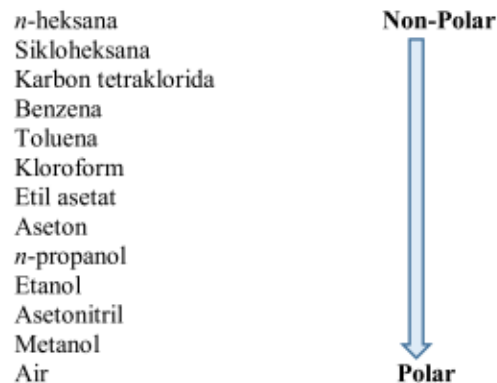
angka Rf merupakan fungsi sejumlah faktor, angka ini dianggap sebagai petunjuk saja, sehingga harga hRf menunjukkan bahwa letak suatu senyawa pada kromatogram (Stahl, 1985).

Cara menentukan nilai Rf ditunjukkan pada rumus dibawah ini.

$$R_f = \frac{\text{Jarak gerak fase elusi (cm)}}{\text{Jarak elusi bercak (cm)}}$$

2.11.2 Kromatografi Kolom (KK)

Pemurnian biomolekul dapat dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom. Sampel yang akan diambil dipisahkan terlebih dahulu, selanjutnya *buffer* pencuci (fase gerak) dialirkan. Urutan eluen yang digunakan dalam kromatografi diawali dari eluen yang memiliki tingkat kepolaran rendah sampai kepolarannya ditingkatkan secara perlahan-lahan. Kemampuan daya elusi ditunjukkan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Urutan Kemampuan Daya Elusi (Gritter *et al.*, 1991).

Prinsip pemisahan kromatografi menggunakan silika gel adalah komponen senyawa yang bersifat polar dan memiliki ikatan hidrogen yang lebih kuat akan menjadi semakin kuat tertahan pada silika gel (Cannell, 1998). Di sisi lain, pemisahan

kromatografi menggunakan sephadex LH-20 memiliki prinsip dimana komponen yang memiliki berat molekul lebih kecil akan terjebak dalam partikel berpori dan bergerak cepat di dalam kolom menuju keluar kolom (Day dan Underwood, 2002).

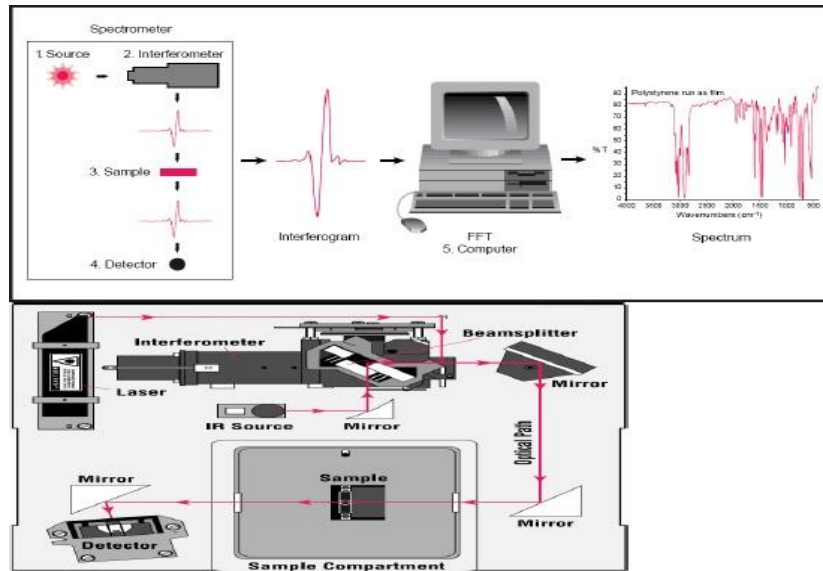
2.12 Karakterisasi Senyawa

2.12.1 Fourier Transform Infra Red (FTIR)

Spektroskopi FTIR (*fourier transform infrared*) merupakan suatu metode yang mengamati interaksi molekul dengan radiasi elektromagnetik yang berada pada daerah panjang gelombang 0,75-1.000 μm atau pada bilangan gelombang 0,1-13.000. Metode spektroskopi inframerah merupakan suatu metode yang meliputi teknik serapan (*absorption*), teknik emisi (*emission*), teknik fluoresensi (*fluorescence*). Komponen medan listrik yang banyak berperan dalam spektroskopi umumnya hanya komponen medan listrik seperti dalam fenomena transmisi, pemantulan, pembiasan, dan penyerapan. Penyerapan gelombang elektromagnetik dapat menyebabkan terjadinya eksitasi tingkat-tingkat energi dalam molekul. Dapat berupa eksitasi elektronik, vibrasi, atau rotasi (Yudhapratama, 2010).

Prinsip kerja spektrofotometer inframerah adalah fotometri. Sinar dari sumber sinar inframerah merupakan kombinasi dari panjang gelombang yang berbeda. Sinar yang melalui interferometer akan difokuskan pada tempat sampel. Sinar yang ditransmisikan oleh sampel difokuskan ke detektor. Perubahan intensitas sinar menghasilkan suatu gelombang interferens. Gelombang ini diubah menjadi sinyal oleh detektor, diperkuat oleh penguat, lalu diubah menjadi sinyal digital. Teknik pengoperasian FTIR berbeda dengan spektrofotometer infra merah. Pada FTIR digunakan suatu interferometer Michelson sebagai pengganti monokromator yang terletak di depan monokromator. Interferometer ini akan memberikan sinyal ke

detektor sesuai dengan intensitas frekuensi vibrasi molekul yang berupa interferogram (Khopkar, 2008). Prinsip – prinsip FTIR ditunjukkan pada **Gambar 8**.



Gambar 8. Prinsip Instrument FTIR (Thermonicolet Corporation, 2007)

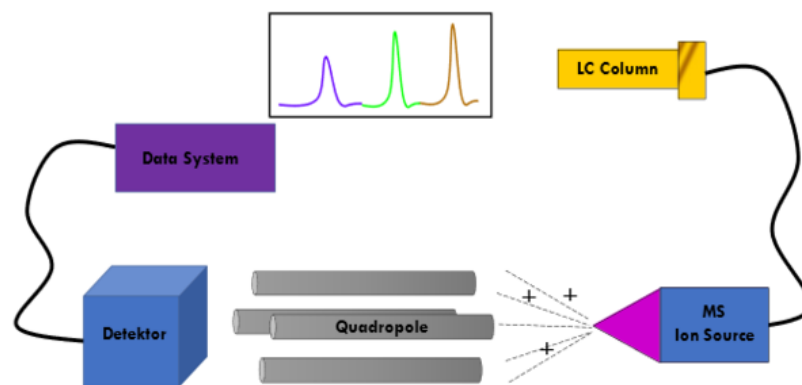
2.12.2 Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS/MS)

Kromatografi adalah teknik pemisahan fisik suatu campuran berdasarkan pada perbedaan migrasi masing-masing analit senyawa pada fase diam dibawah pengaruh fase gerak. Dasar pemisahan kromatografi adalah terjadinya perubahan dari sistem kesetimbangan distribusi statis molekul senyawa ke sistem kesetimbangan distribusi dinamik diantara fase diam dan fase gerak yang berkesinambungan. Karena molekul analit pada kondisi variabel kromatografi tertentu mempunyai tetapan kesetimbangan distribusi dinamik yang khas, maka akan terjadi pola pemisahan yang tetap (Yuwono, 2009)

Kromatografi cair merupakan dasar teknik pemisahan di bidang sains dan terkait dengan kimia. Kromatografi cair dapat dengan aman memisahkan senyawa organik dengan rentang yang sangat luas yaitu mulai dari metabolit obat dengan molekul kecil sampai peptida dan protein (Alfian, 2012).

Spektroskopi massa adalah suatu teknik analisis yang mendasarkan pemisahan bekas ion-ion yang sesuai dengan perbandingan massa dengan muatan dan pengukuran intensitas dari berkas ion-ion tersebut. Dalam spektroskopi massa, molekul-molekul senyawa organik ditembak dengan berkas elektron dan diubah menjadi ion-ion positif yang bertenaga tinggi (ion-ion molekuler atau ion-ion induk), yang dapat dipecah-pecah menjadi ion-ion yang lebih kecil (ion-ion pecahan).

Ion-ion molekuler, ion-ion pecahan, dan ion-ion radikal pecahan selanjutnya dipisahkan oleh pembelokan medan magnet yang dapat berubah sesuai dengan massa dan muatannya (Sitorus, 2009). Spektrum massa akan menghasilkan puncak-puncak yang tercatat dalam rekorder, yang dipaparkan sebagai grafik batangan. Fragment-fragment disusun sedemikian sehingga puncak ditata menurut kenaikan muatan (m/z) dari kiri ke kanan dalam spektrum (Sitorus, 2009). Prinsip-prinsip dari LC-MS ditunjukkan pada **Gambar 9**.



Gambar 9. Prinsip Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS)
(Wormwood *et al.*, 2013)

Time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) adalah metode spektrometri massa di mana rasio massa terhadap muatan ion ditentukan oleh waktu pengukuran penerbangan. Ion dipercepat oleh medan listrik dengan kekuatan yang diketahui. Percepatan ini menghasilkan ion yang memiliki energi kinetik yang sama dengan ion lain yang memiliki muatan yang sama. Kecepatan ion tergantung pada rasio massa terhadap muatan (ion yang lebih berat dengan muatan yang sama mencapai kecepatan yang lebih rendah, meskipun ion dengan muatan yang lebih tinggi juga akan meningkatkan kecepatan). Waktu yang dibutuhkan ion untuk mencapai detektor pada jarak yang diketahui diukur dan akan bergantung pada kecepatan ion, dan karena itu merupakan ukuran rasio massa terhadap muatannya. Rasio ini dan parameter eksperimental yang diketahui, seseorang dapat mengidentifikasi ion (Stephens, 1946).

Distribusi energi kinetik dalam arah penerbangan ion dapat dikoreksi dengan menggunakan reflektor. Reflektor menggunakan medan elektrostatik konstan untuk memantulkan berkas ion menuju detektor. Ion yang lebih energik menembus lebih dalam ke reflektor, dan mengambil jalur yang sedikit lebih panjang ke detektor. Keuntungan tambahan untuk pengaturan re-TOF adalah bahwa dua kali jalur penerbangan dicapai dalam panjang tertentu dari instrumen TOF (Mamyrin *et al.*, 1973).

Sumber ion kontinu umumnya dihubungkan ke penganalisis massa TOF dengan ekstraksi ortogonal yaitu ion yang dimasukkan ke dalam penganalisis massa TOF dipercepat sepanjang sumbu tegak lurus terhadap arah awal gerakannya. Akselerasi ortogonal dikombinasikan dengan pendinginan ion tumbukan memungkinkan pemisahan produksi ion di sumber ion dan analisis massa. Dalam teknik ini, resolusi yang sangat tinggi dapat dicapai untuk ion yang diproduksi dalam sumber MALDI atau ESI. Sebelum memasuki wilayah akselerasi ortogonal atau pulser, ion yang dihasilkan dalam sumber kontinu (ESI) atau berdenyut (MALDI) difokuskan dan menjadi sinar berdiameter 1-2 mm melalui tumbukan dengan gas sisa dalam pemandu multikutub RF (Dodonov *et al.*, 1994).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan sejak bulan Juli 2021–Juni 2022. Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung, Bandar Lampung, Lampung. Analisis senyawa LC/MS-MS dilakukan di Laboratorium Forensik Pusat Laboratorium Forensik Bareskrim Polri Sentul, Bogor, Jawa Barat dan FTIR dilakukan di Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi Universitas Lampung, Bandar Lampung, Lampung.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi alat-alat gelas seperti tabung reaksi (Pyrex iwaki 20 mL), beaker glass (Pyrex Iwaki 1000 mL, 250 mL, 500 mL, dan lain – lain), *Erlenmeyer tube* (Pyrex Iwaki 250 mL, 500 mL, 1000 mL, dan 2000 mL), gelas ukur (Pyrex Iwaki 50 mL dan 100 mL), cawan kaca 90 x 100 mm (Normax), botol UC 200 mL, botol kaca 500mL, botol gelap 4000 mL, wadah tabung kaca 10000 ml, botol vial (3 mL, 5 mL, 10 mL, 20mL), *chamber*, pipet tetes, pipa kapiler, *deck glass* dan *coverglass (One Med)*, mikropipet 1000 μ L (eppendorf), tip *mikropipet* 200 μ L (*One Med*), rak tip *mikropipet*, *mikrotube* 1,5 mL (*one med*), satu set perlengkapan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan plat aluminium *silica gel* 60 F254 (Merck), satu set perlengkapan kromatografi kolom (KK), neraca analitik KERN ABJ/BBJ-220-4M, *Hotplate stirrer* (Wigen Hauser), *autoclave HV-L25* (kleinfield-Germany), *Laminar Air Flow ESCO/AVC4A1*,

drying oven (Jisico) , *ultrasonic*, *sentrifuge* HITACHI, *microscope* (Axioo Zeiss Imager), *evaporator rotavapor* (Buchi R-210), *Spectrophotometer* UV-Vis, *Liquid Chromatography and Mass Spectrophotometry* (LC-MS/MS) (ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, USA), ACQUITY UPLC® HSS C18 column (1.8 μ m 2.1 \times 100 mm) (Waters, Beverly, MA, USA), dan Xevo G2-S Q-TOF-Mass Spectro (Waters, Beverly, MA, USA), dan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) (Agilent Technologies Cary 630).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Tryptic Soy Broth* (Merck), *Malt Extract* (Merck), kulit udang segar, aquades, air laut steril 30 ppt, antiseptik (EtOH) 70%, reagen (Ce₂SO₄)₃, reagen Dragendorf, reagen ninhidrin, *chloramphenicol*, *ciproflaxin*, MeOH, EtOAC, dan bahan penunjang lainnya seperti pH indikator, (Merck), *tissue*, *plastic wrap*, *alumunium foil*, kain kassa, kapas, plastik tahan panas, *methylene blue* dan lain -lain.

3.3 Biomaterial

Isolat fungi A12-RF diperoleh dari deposit UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung. Isolat fungi diperoleh dari spons perairan Buleleng, Bali, Indonesia yang diambil dengan teknik *scuba diving* pada bulan Agustus 2018 pada kedalaman 5-30 m pada titik koordinat 8°06'42.3"LS-114°36'31.0"BT di perairan Buleleng, Bali, Indonesia. Isolat murni diperoleh dengan cara pengenceran dan difusi agar media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dan *Malt Extract* (ME).

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Peremajaan Fungi *A. nomiae* A12-RF

Isolat A12-RF diremajakan pada media padat agar yang mengandung 0,6 g *Tryptic Soy Broth* (TSB), 3 g *Malt Extract* (ME), dan 100 mL air laut steril (30 ppt) (Jomori, 2019). Media yang sudah dihomogenkan dengan vortex ditutup kapas dan dilapisi lagi dengan *aluminium foil*. Disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Kurniasari, 2005). Dilakukan peremajaan terhadap isolat fungi A12-RF. Isolat lama digoreskan secara zig zag pada media baru dibagian pertama (Prihanto *et al.*, 2018). Setelah selesai cawan dibungkus dengan *plastic wrap* untuk meminimalisir adanya kontaminasi dari luar. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37° C dan ditumbuhkan hingga bertumbuh spora (Pelczar dan Chan, 1981).

3.4.2 Identifikasi Morfologi Fungi *A. nomiae* A12-RF Secara Makroskopis dan Mikroskopis

Dilakukan identifikasi morfologi koloni fungi untuk memastikan keberadaan fungi *A. nomiae* A12-RF tanpa terjadinya kontaminasi. Identifikasi morfologi fungi A12-RF dilakukan dengan metoda *cover slip*. *Coverslip* ditancapkan secara miring 45° dalam media agar lalu digoreskan fungi berdekatan pada salah satu sudut *coverslip*. Fungi diinkubasi pada suhu 30° C selama 7 hari (Gebreselema *et al.*, 2013). Setelah fungi tumbuh, bentuk hifa dan sebaran spora dapat diamati menggunakan mikroskop cahaya. Pengamatan dilakukan menggunakan alat mikroskop dengan perbesaran lensa inokuler 10x dan lensa objektif dengan variasi 5x, 10x, dan 40x.

3.4.3 Kultivasi Media Padat (*Solid State Fermentation*)

Isolat murni hasil peremajaan diinokulasi menggunakan media yang mengandung 0,6 *Tryptic Soy Broth* (TSB), 3 *Malt Extract* (ME), dan 50 mL air laut steril 30 ppt. Selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Dilakukan perbanyakan (*scale up*) menggunakan kulit udang. Sebanyak 200 gr kulit udang ditimbang lalu disterilisasi pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Kurniasari, 2005). Inokulum tersebut dituang ke dalam media fermentasi padat kulit udang, selanjutnya diinkubasi dengan kondisi statis selama 21 hari dan dimonitoring secara berkala (Tang *et al.*, 2019). Proses ini termasuk fermentasi menggunakan media padat (*solid state fermentation*).

3.4.4 Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bioaktif

Setelah diinkubasi selama 21 hari, dilakukan maserasi terhadap miselium fungi menggunakan EtOAc dengan perbandingan 1:3 lalu didiamkan selama 1x24 jam. Selanjutnya sampel dipisahkan menggunakan kertas saring dengan ukuran pori-pori 100 µm. Diambil ekstrak EtOAc lalu dipekatkan untuk memperoleh konsentrasi dan bobot kering (Wirakartakusumah *et al.*, 2004) menggunakan *rotary evaporator*. Pelarut EtOAc dapat dievaporasi dengan tekanan 95 mBar dan suhu 40°C.

3.4.5 Uji Kromatografi Lapis Tipis

Komponen senyawa pada ekstrak kasar EtOAc selanjutnya dianalisis menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) atau *Thin Layer Chromatography* dengan bantuan plat silika gel DC Kiesel 60 W sebagai fase diam dan beberapa variasi pelarut

sebagai fase gerak. Hasil elusi KLT uji visualisasi dibantu dengan UV 254 nm yang bertujuan untuk melihat keberadaan rantai terkonjugasi dan sifat UV aktif dari hasil ekstrak tersebut (Rabel, 2003). Pereaksi spesifik Dragendorf digunakan untuk melihat keberadaan senyawa metabolit sekunder, pereaksi serum sulfat melihat keberadaan komponen lain dalam ekstrak tersebut, dan pereaksi ninhidrin untuk melihat keberadaan senyawa peptida di dalamnya (Santiago, 2013).

Saat melakukan pengujian, pereaksi Dragendorf akan bekerja dengan cara memunculkan noda merah jingga (*orange*) pada kromatogram KLT dan menunjukkan bahwa dalam ekstrak tersebut terkandung gugus N tersier. Keberadaan senyawa organik dapat ditunjukkan dengan noda berwarna coklat kehitaman dengan menggunakan pereaksi visualisasi spesifik serum sulfat (Murrell dan Touchstone, 1983).

3.4.6 Fraksinasi Menggunakan Kromatografi Kolom

Fraksi yang telah diketahui kandungan senyawa yang lebih dominan, dilakukan fraksinasi lebih lanjut menggunakan kolom kromatografi. Pada penelitian ini dilakukan beberapa kali kolom kromatografi menggunakan fasa diam yang berbeda yakni silika gel dan sephadex LH-20. Elusi dilakukan dengan beberapa sistem gradien pelarut (sistem pelarut non-polar ke polar). Kolom kaca berbentuk silinder yang berisi fase diam (silika gel/sephadex LH-20) dimasukkan perlahan dari atas dengan pelarut cair (fase gerak) yang mengalir ke bawah kolom dengan bantuan gravitasi. Setelah kolom sudah siap, sampel dimuat di bagian atas kolom. Fase gerak kemudian dialirkan melalui kolom. Senyawa dalam campuran yang memiliki kemampuan interaksi yang berbeda dengan fase diam (silika gel/sephadex LH-20) maupun fase gerak, akan membutuhkan waktu yang berbeda untuk mengalir ke dalam kolom penampung. Cairan-cairan yang tertampung di kolom dikumpulkan sebagai

fraksi dan dianalisis lebih lanjut. Keberadaan komponen senyawa dari fraksi-fraksi hasil pemisahan dimonitor kembali dengan metode KLT menggunakan pereaksi serum sulfat (Bajpai *et al.*, 2016).

3.4.7 Persiapan Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.7.1 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Dibuat media pertumbuhan bakteri yang mengandung 3 % *Tryptic Soy Broth* (TSB) dalam aquades 100 mL. Kemudian media yang sudah dihomogenkan ditutup kapas dan di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Kurniasari, 2005). Stok biakan bakteri dipindahkan ke media baru yang telah steril. Pengerjaan dilakukan secara aseptis dengan meletakkan jarum ose yang mengandung biakan pada dasar kemiringan agar dan ditarik dengan gerakan zig-zag. Selanjutnya masing-masing diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-24 jam (Nera dan Ressi, 2016; La Bauve dan Wargo, 2012).

3.4.7.2 Inokulasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Disiapkan media inokulum yang mengandung 3 % *Tryptic Soy Broth* (TSB) dalam aquades 100 mL. Media yang sudah di homogenkan ditutup kapas dan di sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm (Kurniasari, 2005). Stok biakan bakteri yang masih segar diinokulasikan sebanyak satu koloni. Selanjutnya diinkubasi selama 2 jam. Disesuaikan kekeruhannya sesuai standar Mc-Farland yaitu 0,5 dengan OD_{635nm}. Bakteri *S.*

aureus diencerkan 100 kali dalam media broth sebelum dilakukannya pengujian (Elcentia, 2020).

3.4.7.3 Persiapan Ekstrak Fungi dan Antibiotik

Antibiotik, ekstrak kasar fungi, dan hasil fraksinasi diencerkan dengan MeOH PA 12,5 % sampai konsentrasi 2000 ppm (2 mg/mL). Antibiotik yang digunakan adalah *ciproflaxin* atau *chloramphenicol*. (Missiakas dan Schneewind, 2013). Masing-masing siap untuk dianalisis aktivitas antibakterinya dengan *High-throughput Screening Assay*.

3.4.8 Pengujian Antibakteri dengan *High-throughput Screening Assay*

Sampel antibiotik, ekstrak kasar fungi, dan hasil fraksinasi selanjutnya diujikan. *Well* A1-A3 digunakan sebagai blanko lalu ditambahkan 195 μ L media TSB serta 25 μ L inokulum bakteri OD 0,5. Kontrol positif (A5-A7) ditambahkan 145 μ L media TSB dan ditambah 25 μ L inokulum bakteri serta 50 μ L *Chloramfenikol*. Kontrol negatif (A9-A11) ditambahkan 145 μ L media TSB dan 50 μ L pelarut sampel yang digunakan (MeOH PA 12,5%) serta ditambah 25 μ L inokulum bakteri. Ekstrak kasar fungi (C1-C3) dan hasil fraksinasi (C5-C11) masing-masing dimasukkan 50 μ L dengan konsentrasi 2000 ppm setelah ditambahkan 145 μ L media TSB dan ditambah 25 μ L inokulum bakteri pada *well*. Kontrol media (H1-H9) ditambahkan TSB sebanyak 225 L dan dilakukan pengulangan secara triplo. Selanjutnya diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Diukur nilai OD_{635nm} menggunakan *hospitex diagnostic*. Hasil pengujian diterjemahkan sesuai *Clinical and Laboratory Standars Institute (National Committee for Clinical and Laboratory Standars, 2012)*. Setelah nilai OD_{635nm}

diukur, masing-masing ditambahkan 30 μ L larutan resazurin 0,015 % pada semua *well* dan didiamkan 4 jam pada suhu 30°C dalam inkubator. Selanjutnya diukur pada OD_{635nm} dengan *hospitex diagnostic*.

3.4.9 Karakterisasi Senyawa

Selanjutnya fraksi yang sudah tidak terlalu memberikan banyak noda dan memiliki aktivitas penghambatan terhadap *S. Aureus* dikarakterisasi menggunakan instrumen *Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS)*. Hasil analisis data LC-MS/MS akan diperoleh kromatogram berupa alur tinggi peak dan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak sehingga dapat diketahui jumlah senyawa yang terkandung setiap sampel. Selain itu dikarakterisasi juga menggunakan *Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)* untuk mengkonfirmasi gugus-gugus yang terkandung dalam sampel.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan pembahasan penelitian yang telah dilakukan maka diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil kultivasi isolat fungi *A. nomiae* A12-RF dengan metode *Solid State Fermentation* menggunakan kulit udang menunjukkan bahwa ekstrak kasar bersifat sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. aureus*. Pengujian KLT teramati ekstrak kasar positif (A12-RFC) pada pereaksi $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0,8 dan RF 0,9), Dragendorf (RF 0,85 dan RF 0,88), dan Ninhidrin (RF 0,6, RF 0,75, dan RF 0,8).
2. Fraksi CF1-40F24 memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 450 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Pengujian KLT teramati fraksi tersebut positif terhadap reagen $(\text{Ce}_2\text{SO}_4)_3$ (RF 0,68 dan RF 0,7), Dragendorf (RF 0,68 dan RF 0,8), dan Ninhidrin (RF 0,68 dan RF 0,7).
3. Hasil karakterisasi menggunakan MS/MS menunjukkan bahwa fraksi aktif antibakteri (CF1-40F24) memiliki formula molekul $\text{C}_{38}\text{H}_{48}\text{N}_9\text{O}_6$ dengan kerangka dasar triazol dan dikonfirmasi menggunakan FTIR yang terkandung gugus N-H pada serapan 3272 cm^{-1} , gugus C-H pada serapan 2929 cm^{-1} , terdapat overtone benzene pada serapan 2325 cm^{-1} , dan gugus N-H pada serapan 1669 cm^{-1} , 1602 cm^{-1} dan 1535 cm^{-1} .

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka diperlukan pengkajian lebih lanjut mengenai struktur molekul yang memiliki aktivitas antibakteri dari isolat fungi *A. nomiae* A12-RF yang dikultivasi pada fermentasi padat kulit udang serta diperlukan pengujian secara *in vivo* dan klinis.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, H., Wahyudi, A. T., Yuhana, M. 2011. Skrining Bakteri Yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis sp.* Sebagai Penghasil Antimikroba. *IJMS*. 16(1): 35-40.
- Afifurrahman, A., Samadin, K. H., & Aziz, S. 2014. Pola Kepekaan Bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap Antibiotik Vancomycin di RSUP Dr. Mohammad Hoesin Palembang. *MKS*. 46(4):266-270.
- Alboghany, T. M. dan El-Sheikh, H. H. 2018. *Mycology*. University Adelaide Press. Australia.
- Alexopoulos, C.J. dan Mimms, C. W. 1979. *Introductory Mycology*. John Wiley & Sons. New York.
- Anonymous. 2001. *Introduction to Fourier Transform Infrared Spectrometry, Madison*. Thermo Nicolet Corporation. Rockville USA.
- Arai, M., Han C., Yamano, Y., Setiawan, A., and Kobayashi, M. 2014. Aaptamines, Marine Spongean Alkaloids, as Anti-dormant Mycobacterial substances. *J Nat Med*. 68(2): 372-376.
- Aunurohim, A. dan Iwenda, B. S. 2013. Struktur Komunitas Spons Laut (Porifera) di Pantai Pasir Putih, Situbondo. *POMITS*. 2 (2): 159-165.
- Azeez, L.A., Sepiah, M., Hasnul, B.M. 2016. Identification of Volatile Secondary Metabolites From an Endophytic Microfungus *Aspergillus nomius* KUB105. *Malay J of Anal Sci*. 20(4): 751-759.
- Azwanida, N.N. 2015. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. 4(196): 2167-0412.
- Bakhtra, D. W. A., Eriadi, A., dan Putri, S. R. 2020. Skrining Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz dan Pav.*). *J. Farm Higea*. 12(1): 99-108.

- Bhadury, P., Mohammad, B. T., & Wright, P. C. 2006. The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *J. Ind Microbiol Biotec.* 33 (5):325-337.
- Blechert, O., Zheng, H., Zang, X., Wang, Q., Liu, W., Sturtevant, J. 2019. Influence of the cultivation medium and pH on the pigmentation of *Trichophyton rubrum*. *PLOS ONE*, 14(9):e0222333.
- Bleichrodt, R.; Vinck, A.; Krijgsheld, P.; van Leeuwen, M.R.; Dijksterhuis, J., Wösten, H.A.B. 2013. Cytosolic streaming in vegetative mycelium and aerial structures of *Aspergillus niger*. *Stud in Myc.* 60(1):67-68.
- ChemBL. 2022. Compound Data. data="https://www.ebi.ac.uk/chembl/embed/#mini_re_embedport_card/Compound/CHEMBL97965" width="100%" height="100%"></object>. Diakses pada: 10 Mei 2022 pukul 09.00.
- ChemSpider. 2022. Chemical Structure. http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.71275781.html?rid=b89b0381-35dd-43ca-a819-beb7ddad043e&page_num=0. Diakses pada: 20 April 2022 pukul 14.30.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty Second Informational Supplement M100-22*. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne Pennsylvania.
- Corley, D., G, Herb, R., Moore, RE., dan Scheuer, P J. 1988. Lauiimalides newpotent cytotoxic macrolides from a marine spon and a nudibranch predator. *J. of Org Chem.* 53(15):3644-3646.
- Day, R.A., dan Underwood, A.L. 2002. *Quantitative Analysis*. Sixth Edition. Prentice-Hall. New York.
- Deacon, J.W. 2006. *Fungal Biology 4th Edition*. New Jersey. John Wiley and Sons.
- Deinstrop, E.H., 2007. *Applied Thin-Layer Chromatography Best Practice and Avoidance of Mistakes*. Kleingeschaidter, Germany. WILEYVCH Verlag GmbH & Co.
- Dodonov, A. F., Chernushevich, I. V., Dodonova, T. F., Raznikov, V. V., Tal'rose, V. L. 1994. *Time-of-Flight Mass Spectrometry*. ACS Symposium Series. USA
- Eberhard, B. 2002. *Alkaloide*. Betäubungsmittel, Halluzinogene und andere Wirkstoffe, Leitstrukturen aus der Natur. B.G. Teubner Verlag. Jerman.

- Elcentia, A. 2020. *Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Mikroba Endofityang Berasosiasi Pada Tumbuhan Mangrove (Skripsi)*. Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
- Estianingsih, D., Puspitasari, I., Nuryastuti, T. 2016 Identifikasi *Infeksi Multidrug Resistant Organism* (MDRO) Pada Pasien Yang Dirawat Di Bangsal *Neonatal Intensive Care Unit* (NICU) Rumah Sakit. *J. Manajemen dan Pelayanan Farmasi*. 6(3): 243-244.
- Faddin, J. F. M. 1985. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Williams & Wilkins. Philadelphia USA.
- Fessenden, Ralph J. dan Fessenden, Joan S. 1986. *Organic chemistry (3rd ed)*. Belmont California: Brooks/Cole Publishing Company.
- Forry, F.P. Madonna, M. C., Perez, D. L. Lin, N. J., Pasco, M. D. 2016. Automation of antimicrobial activity screening. *AMB Exp*. 6(1):1-10.
- Gams W., Christensen M., Onions A.H. 1985. *Infrageneric taxa of Aspergillus*. In: *Samson R.A., Pitt J.I., editors. Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics*. Plenum Press. New York.
- Gandjar, I. G. dan Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta. Pustaka Pelajar.
- Gebreselema G, Feleke M, Samuel S, Nagappan R. 2013. Isolation and characterization of potential antibiotic producing aktinomisetes from water and sediments of Lake Tana, Ethiopia. *Asian Pac J. Biomed*. 3(26):426-435.
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I., dan Balaban, N.Q. 2014. Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *PNAS*. 111(1). 556–561.
- Geiser, D. 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. Medical mycology: official publication of the international society for human and animal mycology. *Med Mycol*. 47(1): 21-26.
- Ginting, E.L., Veibe W., dan Rizal, W.S. 2010. Aktivitas Antibakteri dari EkstrakKasar Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Acanthostrongylophora sp*. *JPKT*. 6(3):160-163.
- Goldstein, K. 1995. *The Organism*. Zone Books. Illinois USA.

- Gómez, J. M., Galán, J., Rodríguez, A. & Walker, G. M. 2014. Dye adsorption onto mesoporous materials: pH influence, kinetics and equilibrium in buffered and saline media. *J Env Man.* 146: 355–361.
- Gonzalez J., Castillo, T.E., Mejia, A. Development of high penicillin producing strains for solid-state fermentation. *Biotechnol adv.* 11(3): 525-537.
- Gritter, R.J, Bobbic, J.N., dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi II.* ITB Press Bandung.
- Harmita. 2006. *Analisis Kuantitatif Bahan Baku dan Sediaan Farmasi.* Departemen Farmasi FMIPA Universitas Indonesia. Jakarta.
- He, W. F., Xue, D. Q., Yao, L. G., Li, J. Y., Li, J., and Guo, Y. W. 2014. Hainanerectamines A–C, Alkaloids from the Hainan Spons *Hyrtios erecta*. *Mar Drugs.* 12(7): 3982–3993.
- Hernandez, M.C., Toral, F. A. L. D., Ortz, L. J. G., Pena, M. J. S., Moises, F. P. P. 2018. Two-Dimensional Thin Layer Chromatography-Bioautography Designed to Separate and Locate Metabolites with Antioxidant Activity Contained on *Spirulina p.* *International J Analytical Chemistry.* 1(3):3-8.
- Henstchel, U., Hopke J., Horn, M. A. B. 2002. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *AEM.* 68(9):4431- 4440.
- Hildebrand M., Waggoner, L. E., Lim G. E., Sharp K. H., Ridley, C.P., Haygood, M.G. 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont/bioactive metabolite genes. *Nat Prod Report.* 21(1): 122-142.
- Hoffman, J. R., & Ratamess, N. A. 2006. Medical issues associated with anabolic steroid use: are they exaggerated. *J Sports Sci Med.* 5(2):182-193.
- Hornung, B. V. H.; Zwittink, R. D; Kujiper, E. J. 2019. Issues and current standards of controls in microbiome research. *FEMS Microbiol Ecol.* 95(5): 2-5.
- Huang, H. R., Xia, X. K., She, Z. G., Lin, Y. C., Vrijmoed, L. L. P., and Jones, E. B.G. 2006. A new chloro-monoterpene from the mangrove endophytic fungus *Tryblidiopycnis sp.* *J Asian Nat Prod Res.* 8(7): 609–612.
- Hwang J.-Y., Lee J.-H., Park S.C., Lee J., Oh D.-C., Oh K.-B., Shin J. 2019. New peptides from the marine-derived fungi *Aspergillus allahabadii* and *Aspergillus ochraceopetaliformis*. *Mar Drugs.* 17(19):488.

- James, J., Baker, C., dan Swain, H. 2002. *Prinsip – prinsip Sains Untuk Keperawatan*. Erlangga. Jakarta.
- Jawetz, E., Melnick, J., dan Adelberg, E. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.
- Ji, Y. 2020. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA). Protocols Part of Methods in Molecular Biology book series (MIMB)*. New York. Humana.
- Jones E. B. G. 2000. *Marine fungi: some factors influencing biodiversity*. Fungal Diversity. Shanghai.
- Jomori, T. Hara Y., Sasaoka, M., Harada, K., Setiawan, A., Arai, M. 2019. *Mycobacteriumsmegmatis* alters the production of secondary metabolites by marine-derived *Aspergillus niger*. *J Nat Med*. 74(1):76-82.
- Junio, H. A., Sy-Cordero, A. A.; Ettefagh, K. A.; Burns, J. T., Micko, K. T., Graf, T. N.; Richter, S. J., Cannon, R. E., Oberlies, N. H.; Cech, N. B. 2011. Synergy-Directed Fractionation of Botanical Medicines: A Case Study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J Nat Prod*. 74(7):1621–1629.
- Khopkar, S.M. 2008. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. UI Press. Jakarta.
- Kifle, D., Wibetoe, G., Frøseth, M., dan Bigelius, J. 2013. Impregnation and Characterization of High-Performance Extraction Columns for Separation of Metal Ions. *J Solvent Extraction and Ion Exchange*. 31(6): 668–682.
- Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol*. 10(3):505-520.
- Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy J*. 16(9):945-960.
- Kotoku, N., Ishida, R., Matsumoto, H., Arai, M., Toda, K., Setiawan, A., Muraoka, O., dan Kobayashi, M. 2017. Biakamides A-D, Unique Polyketides from a Marine Sponge, Act as Selective Growth Inhibitors of Tumors Cells Adapted to Nutrient Starvation. *J Org Chem*. 82(3): 1705-1718.
- Kwong, S.M., Ramsay, J.P., Jensen, S. O., Firth, M. 2017. Replication of

Staphylococcal Resistance Plasmids. *Front Microbiol.* 8 (1):2279

- Limbadi S., Luo X., Lin X., Liao S., Wang J., Zhou X., Yang B., Liu Y. Bioactive novel indole alkaloids and steroids from Deep Sea-derived fungus *Aspergillus fumigatus* SCSIO 41012. *Molecules.* 23(9):2379.
- Lougham, D. M. 1997. *Nutritional Benefits of Malt Extract.* Sandoz Nutrition Ltd. Basel Switzerland.
- Luo X., Zhou X., Lin X., Qin X., Zhang T., Wang J., Tu Z., Yang B., Liao S., Tian Y. 2017. Antituberculosis compounds from a deep-sea-derived fungus *Aspergillus sp.* SCSIO Ind09F01. *Nat Prod Res.* 31(16):1958–1962.
- Mamyrin, B. A.; Karataev, V. I.; Shmikk, D. V.; Zagulin, V. A. 1973. "The mass-reflectron, a new nonmagnetic time-of-flight mass spectrometer with high resolution". *Sov Phys JETP.* 1(1) 37:45.
- Manilal, A., Sabarathnam, B., Kiran, G.S., Sujith, S., Shakir, C., and J. Selvin, J. 2010. Antagonistic Potential of Marine Sponge Associated Fungi *Aspergillus clavatus* MFD15. *Asian J. Medl Sci.* 2(4):195–200
- Mansouri, S., Foroumadi, A., Ghaneie, T., Najar, A. G. 2001. Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceut Biol.* 39(5):399–401.
- Mathivanan, A., Ravikumar, S., G. Selvakumar, G., and Devanandh, G. 2021. Utilization of Shrimp waste as a novel media for marine bacteria isolation. *Biotech.* 11(1):1-5.
- McMurry, J. 2008. *Organic Chemistry.* 7 th edition. Nelson Education, Ltd. Kanada.
- Melawaty, L. and Pasau, K. 2015. The Profile of Secondary Metabolites of Spongs *Clathria reinwardtii* Extract as a Result of Fe Accumulation in Spermonde Archipelago. *ABC.* 5(7):266-272
- Mi-Hee C, Hyeon-Jin K. K., Yeop J, Seong, C. H. 2008. The isolation and characterisation of *Pseudozyma sp.* JCC207 a novel producer of squalene. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78(16):963-972.
- Missiakas, D. M., and Schneewind, O. 2013. Growth and laboratory maintenance of *Staphylococcus aureus*. *Curr prot microbiol.* 28(1): 9C-1.

- Molen, K.M.V., Raja, H.A., Elimat, T.M., dan Oberlies, N.H. 2013. Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program. *AMB Express*. 3(1): 1-7.
- Moore dan Landecker, E. 1996. *Fundamental of The Fungi (4th Edition)*. Prentice Hall. New Jersey.
- Mulja, M, dan Suharman. 1995. *Analisis Intrumental*. Airlangga University Press Surabaya.
- Murado, M.P., Gonzalez, A., Torrado, L.M. 1996. Amylase production by solid state culture of *Aspergillus oryzae* on polyurethane foams: Some mechanistic approaches from an empirical model. *Proc Biochem*. 32(1):35-42.
- Murrell, F.D and Touchstone, J.C. 1983. *Practice of Thin Layer Chromatography 2nd Edition*. University of Pennsylvania, School of Medicine. A Wiley-Interscience Publication.
- Murti, Y. B. 2006. *Isolation and structure elucidation of bioactive secondary metabolites from sponge collected at Ujungpandang and in the Bali Sea, Indonesia*. (Dissertation). Universitas Duesseldorf.
- Mutia, D. 2019. *Isolasi Jamur Dari Spons Laut Callyspongia sp. Dan Uji Aktivitas Sitotoksik Dengan Metode Brine Shrimps Lethality Test (BSLT)*. (Skripsi). Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Padang.
- National Center for Biotechnology Information. 2021. *Aspergillus nomiae A12-RF genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2056728649>. diakses pada: 23 November 2021 pukul 16.30.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012. *Clinical and Laboratory Standards Institute "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing" twenty-second informational supplement 11th edition*. M100-S22. Standards. 32 (1)
- Nera Umilia Purwanti dan Ressi Susanti. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antifungal Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus sp.* *J. Mahasiswa PSPD*. 2 (1): 11-12
- Nisa, C., Masruhim, M. A., & Sulistiarini, R. 2016. *Uji Bioaktivitas dan Penelusuran Metabolit Sekunder Ekstrak Spons di Perairan Kampung Malahing Kota*

- Bontang. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences*. 3(2):121-125.
- Nuraini, F. 2020. *Bioaktivitas Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Terhadap Pseudomonas aeruginosa*. (Skripsi). Jurusan Kimia Universitas Lampung.
- Nweze, J. A., Florence N., Huang, G., Li, Y., Yang, L., Zhang, Y., Huang, S., Pan, L., Yang, D. 2020. Antibiotics Development and the Potentials of Marine-Derived Compounds to Stem the Tide of Multidrug-Resistant Pathogenic Bacteria, Fungi, and Protozoa. *Mar Drugs*. 18(3): 145.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., dan Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Euro J biochem*. FEBS. 267(17): 5421–5426.
- Ola, A. R., Thomy, D., Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., and Proksch, P. 2013. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *J Nat Prod*. 76(11), 2094–2099.
- Pat O'Reilly. 2011. *Fascinated by fungi*. First Nature. London. UK.
- Paul, Melanie; Strassl, Florian; Hoffmann, Alexander; Hoffmann, Marko; Schlüter, Michael; Herres-Pawlis, Sonja. 2018. Reaction systems for bubbly flows. *EurJIC*. 20(21): 2101-2124,
- Peay, K. G., Kennedy, P. G., & Bruns, T. D. 2008. Fungal community ecology: a hybrid beast with a molecular master. *Bioscience*. 58(9):799-810.
- Pelczar, M. J. dan Chan, E. S. 1981. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. UI Press. Jakarta.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. 2002. *Microbiology*. McGraw-Hill.
- Pengelly, A. 2006. *The constituents of medicinal plant an introduction to the chemistry and Therapeutics of Herbal Medicines Sunflower*. Herbals. London.
- Plotz, T. 2005. *Advanced Stochastic Protein Sequence Analysis*. Technischen Fakultät der Universität Bielefeld Vorgelegt Von. Jerman.
- Powell, M. J. 2017. *Chytridiomycota. Handbook of the Protists*. Springer.
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Penerbit Erlangga. Jakarta.

- Prihanto, A. A. 2018. Isolasi dan identifikasi bakteri endofit mangrove (*Sonneratia alba*) penghasil enzim gelatinase dari Pantai Sendang Biru, Malang, Jawa Timur. *IJH*. 1(1): 31-42.
- Putri, W. S.; N. K., Warditiani, N. K.; Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). *JFU*. 2(4): 56-60
- Rahman, A. 1989. *Pengantar Teknologi Fermentasi*. Depdiknas PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. *The Genus Aspergillus*. Williams and Wilkins. Philadelphia.
- Ratnaweera, P.B., Williams, D.E., Dilip, D. S. E., Andersen, R.J. Antibacterial metabolites from the Sri Lanka Antibacterial metabolites from the Sri Lanka demosponge-derived fungus, *Aspergillus flavipes*. *Curr. Sci.* 11(1):1473–1479.
- Rot, C., Goldfarb, I., Ilan, M., & Huchon, D. 2006. Putative cross-kingdom horizontal gene transfer in sponge (porifera) mitochondria. *BMC Evolutionary Biology*. 6(1): 1-11.
- Rija'i, H. R., Fakhrudin, N., Wahyuono, S. 2019. Isolation and Identification of DPPH Radical (2,2-diphenyl-1- pikrylhidrazyl) Scavenging Active Compound in Ethyl acetat fraction of *Piper acre* Blume. *Trad Med J*. Vol. 24(3): 204-209.
- Robinson, T., Singh D., Nigam P. 2001. Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotech*. 55(3):284-289.
- Rohman, A. .2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar.
- Roosheroe, I. G., Sjamsuridzal, W., Oetari, A. 2014. *Mikologi dasar dan Terapan (edisi ke-2)*. Yayasan Obor Indonesia. Jakarta.
- Santiago, Marina 2013. *Methods in Enzymology: Cell Lipid and Carbohydrate. Thin Layer Chromatography Edit by John Lorsch*. John Hopskin University Press. Baltimore USA.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, Laila, A., Setiawan, W.

A., Djailani, F. M., Mulyono, Hendri, J., dan Arai, A. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *J Fungi*. 8(3): 280.

Science Finder from Americal Chemical Society. 2022 Substance Search.
<http://www.scifinder-n.cas.org/search/substance/63229bc421301e755710499c>
 Diakses pada: 15 September 2022 pukul 08.00.

Schmidt, K. R., Chand, S., Gostomski, P. A., Wilson, K. S. H. B., Ford, C., Walter, M. 2005. Fungal inoculum properties and its effect on growth and enzyme activity of *Trametes versicolor* in soil. *Biotechnol prog*. 21(2):377-385.

Schneider, G., Anke, H., and Sterner, O. 1997. New secondary metabolites from a mycophilic *Hansfordia species*. *Nat Prod Lett*. 10 (2):133–138.

Settle, F. 1997. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. Prentice-Hall Inc. New Jersey.

Shilmy, S.P. 2017. *Air Cucian Beras (Oryza sativa L.) Sebagai Media Agar Alternatif Pengganti PDA (Potato Dextrose Agar) Terhadap Pertumbuhan Jamur Candida albicans. (Skripsi)*. Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Surabaya. Surabaya.

Silverstein, R. M., F. X. Webster, dan D. J. Kiemle. 2005. *Spectrometric Identification of Organic Compounds Seventh Edition*. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Smetanina O. F., Yurchenko A. N., Kalinovskii A. I., Berdyshev D. V., Gerasimenko A. V., Pivkin M. V., Slinkina N. N., Dmitrenok P. S., Menzorova N. I., Kuznetsova T. A., Afiyatullof, S. H. 2011. Biologically active metabolites from the marine isolate of the fungus *Myceliophthora lutea*. *Chem Nat Comp*. 47 (3):385-390.

Stahl, E. 1985. *Analisis Obat Secara kromatografi dan Mikroskopi*. ITB Bandung.

Stephens, W. E. 1946. A Pulsed Mass Spectrometer with Time Dispersion. *Phys. Rev*. 69(11–12):691.

Suarnadwipa, N. dan Hendra, W. 2008. *Pengeringan Jamur Dengan Dehumidifier*. *JTMC*. 2 (1):30-33.

- Sulistiyawati, N. 2011. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Binahong Anredera cordifolia (Ten.) Steenis) Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli Serta Skrining Fitokimia*. Fakultas Farmasi dan Fakultas Kesehatan Masyarakat Universitas Ahmad Dahlan.
- Syahrurachman. 2014. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Edisi Revisi. Binarupa Aksara. Jakarta.
- Syage, J. A. 2004. Mechanism of $[M + H]^+$ Formation in photoionization mass spectrometry. *Elsevier Inc.* 15(11):1521–1533
- Tan, R. X., dan Zou, W. X. 2001. Endophytes: A Rich Source of Functional Metabolites. *Nat Prod Report.* 18(4):448-59.
- Tang, R., Kimishima, A., Ishida, R., Setiawan, A., 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
- Taylor, M. W., Hill, R. T., Piel, J., Thacker, R. W., Hentschel, Ute. 2007. Soaking it up: the complex lives of marine sponges and their microbial associates. *ISME J.* 1 (3). 187-190.
- Toelle, N. N. dan Lenda, V. 2014. Identifikasi dan Karakteristik *Staphylococcus Sp.* dan *Streptococcus Sp.* dari Infeksi Ovarium Pada Ayam Petelur Komersial. *JIT.* 1(7):32–37
- Tsuchiya, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K. 1994. High level secretion of calf chymosin using a glucoamylase-prochymosin fusion gene in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol and Biochem.* 58(5):895-899.
- Verpoorte R, dan Alfermann, A. W. 2000. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. Belanda. Kluwer Academic Publishers.
- Wahab, N.M.A., Scharf, S., Ozkaya, F.C., Kurtan, T., Mandi, A., Fouad, M.A., Kamel, M.S., Muller, W.E.G., Kaischeuer, R., Lin, W., Daletos, G., Ebrahim, W., Liu, Z., dan Proksch, P. 2019. Induction of Secondary Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* through Co-Cultivation with *Bacillus subtilis*. *Planta Med.* 85(6): 503-512
- Wang, Cong; Tang, Siyan; Cao, Shugeng. 2020. Antimicrobial compounds from marine fungi. *Phytochemistry Reviews.* 20(1):85-117.

- Wang X., Mao Z.G., Song B.B., Chen CH, Xiao W.W., Hu B, Wang J.W., Jiang X.B., ZhuY.H., Wang H.J. 2013. Advances in the study of the structures and bioactivities of metabolites isolated from mangrove-derived fungi in the South China Sea. *Mar Drugs*. 11(10):3601-3616.
- Wallace, R.A., Jack, L. K. dan Gerald, P.S. 1986. *Biology The Science of Life*. Scot, Foresman & Company. New York.
- Waltraud, S., dan Helmut, T. 2007. *Endogene Alkaloide in Säugetieren. Ein Beitrag Zur Pharmakologie von körpereigenen Neurotoxinen*. In: *Naturwissenschaftliche Rundschau*.
- Warren, L. 1982. *Encyclopedia of Marine Invertebrates*. In: Walls JG (ed). TFH Publications. New Jersey.
- Wiegand, I., Hilpert, K., Hancock R.E.W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Prot*. 3(2): 163–175.
- Wirakartakusumah, M. A. 2004. *Prinsip-Prinsip Teknik Pangan*. PAU Pangan dan Gizi IPB. Bogor.
- World Health Organization. 2017. *WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed*. <https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. diakses pada: 23 November 2021 pukul 07.30.
- Wormwood, K. L., Sokolowska, I., Ryan, J. P., Russell, S., Darie, C. C., & Woods, A. G. 2013. The potential for proteomics in understanding neurodevelopmental disorders. *J Proteomics Bioinform*. 5:2.
- Wulandari, L. 2011. *Kromatografi Lapis Tipis*. Jember: PT Taman Kampus Presindo.
- Yu, H. B., Yang, F., Sun, F., Li, J., Jiao, W. H., Gan, J. H., Hu, W. Z., Lin, H. W. 2014. Aaptamine Derivatives with Antifungal and Anti-HIV-1 Activities from the South China Sea Sponge *Aaptos aaptos*. *Mar Drugs*. 12(12):6003–6013
- Yudhapratama, E. 2010. Penentuan Keberadaan Zat Aditif pada Plastik Kemasan Melalui Perlakuan Pemanasan pada Spektrometer IR. (Thesis). Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.

- Zahra, A., Afshin, E., Manan, A. 2011. Nutritional Requirements for the Improvement of Growth and Sporulation of Several Strains of *Monascus purpureus* on Solid State Cultivation. *J Biomed and Biotechy.* (11)1:1-9
- Zhang D., Son B. 2007. 12, 13-Dihydroxyfumitremorgin C, fumitremorgin C, and brevianamide F, antibacterial diketopiperazine alkaloids from the marine-derived fungus *Pseudallescheria* sp. *Nat Prod.* 13(3):251-254
- Zhang, L., Niaz, S.I., Khan, D., Wang, Z., Zhu, Y., Zhou, H., Lin, Y., Li, J., and Liu, L. 2017. Induction of diverse bioactive secondary metabolites from the mangrove endophytic fungus *Trichoderma* sp. (strain 307) by co-cultivation with *Acinetobacter johnsonii* (strain B2). *Marine drugs.* 15(2): 35.
- Zhang, X., Mo, H., Zhang, J. 2003. A solid-state bioreactor coupled with forced aeration and pressure oscillation. *Biotechnol Lett.* 25(5):417-420
- Zhang Y, Li X. M., Feng, Y., Wang, B. G. 2010. Phenethyl-alpha-pyrone derivatives and cyclodipeptides from a marine algous endophytic fungus *Aspergillus niger*. *Nat Prod Res.* 24(11): 1036-1043.
- Zhou, S., Wang, M., Feng, Q., and Zhao, H. 2016. A study on biological activity of marine fungi from different habitats in coastal regions. *Springer Plus.* 5(1). 1-8.
- Zhu F., Chen G., Chen X., Huang M., Wan X. 2011. Aspergicin, a new antibacterial alkaloid produced by mixed fermentation of two marine-derived mangrove epiphytic fungi. *Chem Nat Compd.* 47 (6): 767-769.
- Zoberi, M. H. 1972. *Tropical Macrofungi.* The Macmillan Press Ltd. London and Basingstoke