

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF DARI
MIKROORGANISME ENDOFIT YANG BERASOSIASI DENGAN
MANGROVE *Avicennia officinalis* SERTA UJI BIOAKTIVITAS
TERHADAP LARVA NYAMUK *Aedes aegypti***

(Skripsi)

Oleh:

**NIA KURNIASIH
1717011073**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

ABSTRAK

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF DARI MIKROORGANISME ENDOFIT YANG BERASOSIASI DENGAN MANGROVE *Avicennia officinalis* SERTA UJI BIOAKTIVITAS TERHADAP LARVA NYAMUK *Aedes aegypti*

Oleh

Nia Kurniasih

Demam berdarah (DBD) adalah salah satu penyakit tropis yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti*. Demam berdarah telah menjadi masalah internasional terutama dalam kesehatan masyarakat beberapa dekade terakhir. Salah satu upaya penanggulangan penyakit DBD yang efektif yaitu dengan pengendalian vektor penyebab DBD. Cara penanggulangan yang dapat digunakan yaitu dengan penggunaan biolarvasida dari senyawa bioaktif yang berasal dari mikroorganisme endofit yang berasosiasi dengan mangrove *Avicennia officinalis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi senyawa bioaktif dari mikroorganisme endofit mangrove *Avicennia officinalis* sebagai biolarvasida. Isolasi mikroorganisme endofit menghasilkan 9 isolat yang terdiri dari 2 isolat dari akar, 4 isolat dari batang, dan 3 isolat dari daun. Uji bioaktivitas dengan larva nyamuk *Aedes aegypti* menunjukkan bahwa ekstrak kasar dari isolat dengan kode 21PNA-1 menunjukkan aktivitas tertinggi dengan rata-rata jumlah kematian larva pada 72 jam yaitu 8,48. Nilai LC_{50} yang didapatkan dari hasil uji ekstrak kasar isolat 21PNA-1 yaitu 64,6 ppm. Hasil karakterisasi fraksi 9-11 dengan LC-MS/MS diprediksi sebagai senyawa yang aktif sebagai biolarvasida yaitu senyawa golongan asetamida dengan m/z 343.2944 dan 371.3284. Konfirmasi gugus dengan FTIR menunjukkan bahwa adanya gugus NH pada serapan bilangan gelombang 3428 cm^{-1} , serapan pada bilangan gelombang 2934 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-H alifatik, serapan pada bilangan gelombang 1244 cm^{-1} menunjukkan adanya ikatan C-N, serapan pada bilangan gelombang 1713 cm^{-1} menunjukkan adanya gugus C=O, dan serapan pada bilangan gelombang 1466 cm^{-1} menunjukkan adanya C-H aromatik.

Kata kunci: Demam berdarah, *Avicennia officinalis*, *Aedes aegypti*, asetamida

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM ENDOPHYTE MICROORGANISM ASSOCIATED WITH MANGROVE *Avicennia officinalis* AND BIOACTIVITY TESTS ON *Aedes aegypti* MOSQUITO LARVAE

By

Nia Kurniasih

Dengue fever (DHF) is a tropical disease that is transmitted by the *Aedes aegypti* mosquito. Dengue fever has become an international problem especially in public health in the last few decades. One of the effective efforts to control DHF is by controlling the vector that causes DHF. The countermeasure that can be used is the use of biolarvicides from bioactive compounds derived from endophytic microorganisms associated with the mangrove *Avicennia officinalis*. This study aims to isolate bioactive compounds from the mangrove endophytic microorganism *Avicennia officinalis* as biolarvicides. Isolation of endophytic microorganisms produced 9 isolates consisting of 2 isolates from roots, 4 isolates from stems, and 3 isolates from leaves. The bioactivity test with *Aedes aegypti* mosquito larvae showed that the crude extract of the isolate with code 21PNA-1 showed the highest activity with an average number of larvae deaths at 72 hours, namely 8.48. The LC₅₀ value obtained from the crude extract test results of isolate 21PNA-1 was 64.6 ppm. The results of the characterization of fractions 9-11 with LC-MS/MS predicted that the active compounds as biolarvicides were acetamide group compounds with m/z 343.2944 and 371.3284. Group confirmation with FTIR showed that the presence of NH groups in the absorption wave number 3428 cm⁻¹, absorption in wave number 2934 cm⁻¹ indicated the presence of aliphatic C-H bonds, absorption in wave number 1244 cm⁻¹ indicated the presence of C-N bonds, absorption in wave number 1713 cm⁻¹ indicates the presence of a C=O group, and absorption at wave number 1466 cm⁻¹ indicates the presence of aromatic C-H.

Keywords: Dengue fever, *Avicennia officinalis*, *Aedes aegypti*, acetamide

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF DARI
MIKROORGANISME ENDOFIT YANG BERASOSIASI DENGAN
MANGROVE *Avicennia officinalis* SERTA UJI BIOAKTIVITAS
TERHADAP LARVA NYAMUK *Aedes aegypti***

Oleh

NIA KURNIASIH

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Lampung**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2023**

Judul Skripsi

: ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA
BIOAKTIF DARI MIKROORGANISME
ENDOFIT YANG BERASOSIASI DENGAN
MANGROVE *Avicennia officinalis* SERTA
UJI BIOAKTIVITAS TERHADAP LARVA
NYAMUK *Aedes aegypti*

Nama

: Nia Kurniasih

Nomor Pokok Mahasiswa

: 1717011073

Jurusan

: Kimia

Fakultas

: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



MENYETUJUI
1. Komisi Pembimbing

Syaiful Bahri, M.Si.
NIP. 197308252000031001

Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed.
NIP. 196405171988032001

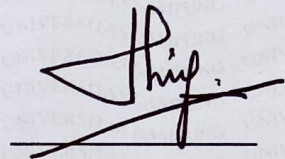
2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA

Mulyono, Ph.D.
NIP. 197406112000031002

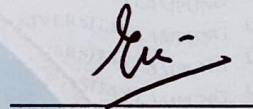
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

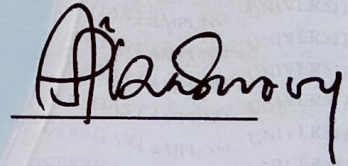
Ketua : Syaiful Bahri, M.Si.



Sekretaris : Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed.



Anggota : Prof. Noviany, M.Si., Ph.D.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T.
NIP. 197407052000031001

Tanggal Lulus Ujian Skripsi: **18 Januari 2023**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nia Kurniasih
NPM : 1717011073
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif dari Mikroorganisme Endofit yang Berasosiasi dengan Mangrove *Avicennia officinalis* serta Uji Bioaktivitas terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*”** adalah benar karya dan hasil penelitian saya sendiri dan tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini sebagaimana disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila ada pernyataan yang tidak benar, maka saya bersedia dikenai sanksi sesuai dengan hukum yang berlaku.

Bandar Lampung, 31 Januari 2023

Yang Menyatakan



Handwritten signature of Nia Kurniasih.

Nia Kurniasih
NPM. 1717011073

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Nia Kurniasih lahir di Kota Metro, pada tanggal 18 Agustus 1999. Penulis sebagai anak bungsu dari tujuh bersaudara, dari Bapak Alm. Juremi dan Ibu Sayem.

Penulis pertama kali menempuh pendidikan dasar di MI Darul Ulum Rempelas pada tahun 2004-2010, kemudian melanjutkan sekolah tingkat pertama di SMP Negeri 1 Way Jepara pada tahun 2010-2013. Selanjutnya penulis melanjutkan sekolah tingkat atas di SMA Negeri 1 Way Jepara pada tahun 2013-2016. Saat menempuh pendidikan SMA penulis aktif sebagai anggota Palang Merah Remaja (PMR).

Pada tahun 2017 penulis diterima sebagai mahasiswa jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SBMPTN). Selama menjadi mahasiswa penulis aktif sebagai anggota bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila (2018) dan anggota bidang Dana dan Usaha (Danus) ROIS FMIPA Unila (2018). Pada tahun 2019 penulis diamanahkan sebagai sekretaris bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK) Himpunan Mahasiswa Kimia (Himaki) FMIPA Unila.

KATA INSPIRASI

"Allah tidak akan pernah membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya,"
(Q.S. Al-Baqarah (2): 286)

"Dan berbuat baiklah, karena sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang berbuat baik."
(Q.S Al-Baqarah (2): 195)

"Yang terbaik di antara kamu adalah orang yang tidak menyakiti orang lain dengan lidah dan tangannya."
(Nabi Muhammad SAW)

"Ilmu itu lebih baik dari kekayaan, karena kekayaan itu harus dijaga, sedangkan ilmu menjaga kamu"
(Ali bin Abi Thalib)

"Boleh jadi keterlambatanmu dari suatu perjalanan adalah keselamatanmu"
(Quraish Shihab)

PERSEMBAHAN

Alhamdulillah Puji Syukur kehadiran Allah SWT, yang senantiasa memberikan limpahan nikmat sehat, kemudahan, rahmat, dan hidayah-Nya. Sholawat beserta salam semoga selalu tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW. Dengan penuh rasa syukur penulis persembahkan skripsi ini kepada:

Orang tua dan Keluarga Tercinta

Terimakasih sudah mendukung semua keputusan dan pilihan dalam hidup saya serta tidak pernah putus mendoakan saya, terima kasih atas semangat, motivasi, pengorbanan, nasihat serta kasih sayang yang tidak pernah henti sampai saat ini.

Bapak Syaiful Bahri, M.Si., Ibu Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed.,

Ibu Nismah Nukmal, Ph.D., dan Ibu Prof. Noviany, Ph.D.

Atas segala arahan, bimbingan, saran, ilmu dan nasihat yang telah diberikan selama penelitian dan penulisan tugas akhir.

Dosen Jurusan Kimia

Atas segala bimbingan, ilmu, dan pembelajaran yang telah diberikan selama di kampus

Sahabat-sahabat Tercinta

Selalu menemani selama masa perkuliahan maupun penelitian, senantiasa memberikan doa, dukungan, dan motivasi untuk menjadi lebih baik

Almamater tercinta, Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillah *rabbil'alamin*, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT karena atas limpahan nikmat sehat, kemudahan, dan rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif dari Mikroorganisme Endofit yang Berasosiasi dengan Mangrove *Avicennia officinalis* serta Uji Bioaktivitas terhadap Larva Nyamuk *Aedes aegypti*”**. Penulisan skripsi ini dilakukan dalam rangka memenuhi salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Sains pada Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari banyak pihak yang memberikan dukungan dan bantuan selama menyelesaikan studi dan tugas akhir ini. Oleh karena itu, penulis dengan penuh hormat mengucapkan terimakasih dan mendoakan semoga Allah memberikan balasan terbaik kepada:

1. Orang tua tercinta, Bapak (Alm.) Juremi dan Ibu Sayem atas curahan kasih sayang yang selalu diberikan, dukungan, doa yang tidak pernah putus sampai saat ini.
2. Bapak Syaiful Bahri, M.Si., selaku pembimbing 1 atas segala ilmu, arahan, bimbingan, motivasi, dukungan, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penulisan skripsi dengan baik.
3. Ibu Dr. Endah Setyaningrum, M.Biomed., selaku pembimbing 2 atas segala bimbingan, dukungan, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi dengan baik.
4. Ibu Prof. Noviany, M.Si., Ph.D., selaku penguji atas saran dan masukan dalam penelitian dan penulisan skripsi.

5. Ibu Nismah Nukmal, Ph.D., atas segala bimbingan, masukan, dan arahan selama pernah menjadi pembimbing 2.
6. Ibu Dr. Ilim, M.S., selaku pembimbing akademik atas bimbingan, saran, dan motivasi dalam segala hal terkait dengan perkuliahan.
7. Bapak Dr. Eng. Suropto Dwi Yuwono, M.T., selaku Dekan FMIPA Universitas Lampung.
8. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Ibu Dr. Mita Rilyanti, S.Si., M.Si., selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
10. Bapak Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Unila atas segala ilmu, pembelajaran, nasihat, dan dukungan yang telah diberikan selama masa perkuliahan.
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.
12. Mas, Mba, dan seluruh keluarga besar atas segala bentuk dukungan, doa, dan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
13. Ustadzah RQM atas doa, nasihat, dan dukungan yang selalu diberikan sampai saat ini.
14. Sahabat-sahabat terdekatku Agustina Ayu Pangestu, Azizah Malik, Merriezka Ismaini, Ramy Zahra Mahdiyah, Rana Aprilia Rinjani, Rosalinda Yuliani, Lia Madyo Ratri, Anies Lutfi, dan Pirani terimakasih atas kebersamaan baik selama perkuliahan maupun penelitian, bantuan, dukungan, semangat, dan doa yang telah diberikan sampai saat ini.
15. Teman bercerita Mba Sri, Mba Upik, Nunu, Devi Rahmawati, Dela Puspita, Dian Permatasari, dan teman-teman RQM 2 terimakasih atas segala dukungan dan doa yang telah diberikan.
16. Sahabat dari SMA Indah Lestari, Novia Restiana, dan Jyoti Krisna M. atas segala bantuan, dukungan, dan semangat sampai saat ini.
17. Teman seperbimbingan Anisya Reika A., Merriezka Ismaini, Pandu Tris Mahendra terimakasih atas kebersamaan selama penelitian.

18. Teman-teman penelitian labaratorium UPT LTSIT Mba Nafila, Mba Caca, Kak Fendi, Kak Ridho, Indra, Ikrom, Lanang, Mega, Reyzka, Rizky, Saras, dan teman-teman lain atas saran, dukungan, dan masukan selama penelitian.
19. Keluarga kimia 2017 atas segala bantuan yang telah diberikan selama masa studi.

Terimakasih atas bantuan dan dukungan semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu. Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan di dalam penyusunan skripsi ini dan masih jauh dari kata sempurna. Semoga skripsi ini dapat berguna dan bermanfaat bagi penulis dan pembaca.

Bandar Lampung, 31 Januari 2023

Penulis,

Nia Kurniasih

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
I. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar belakang.....	1
1.2. Tujuan Penelitian	3
1.3. Manfaat Penelitian	3
II. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1. Tinjauan Mangrove.....	4
2.1.1. Ekosistem Mangrove	4
2.1.2. Siklus Hidup Mangrove	5
2.1.3. Mangrove <i>Avicennia officinalis</i>	6
2.1.4. Klasifikasi <i>Avicennia officinalis</i>	7
2.2. Mikroba Endofit.....	8
2.3. Senyawa Bioaktif Mangrove Asosiasi Endofit	8
2.3.1. Alkaloid.....	9
2.3.2. Terpenoid	10
2.3.3. Steroid	11
2.3.4. Flavonoid	12
2.3.5. Poliketida	13
2.3.6. Kuinon.....	14
2.4. Biopestisida.....	14
2.5. Kitin	15
2.6. <i>Solid State Fermentation (SSF)</i>	16

2.7. Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	17
2.7.1. Klasifikasi Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	17
2.7.2. Siklus Hidup Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	17
2.8. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder	19
2.8.1. Maserasi	20
2.8.2. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair).....	20
2.9. Metode Pemisahaan dan Pemurnian	21
2.9.1. Kromatografi Lapis Tipis.....	21
2.9.2. Kromatografi Kolom.....	21
2.10. Karakterisasi Senyawa	22
2.10.1. Karakterisasi Senyawa dengan Spektrofotometri IR	22
2.10.2. Karakterisasi Senyawa dengan LC-MS/MS	22
III. METODE PENELITIAN	24
3.1. Waktu dan Tempat.....	24
3.2. Alat dan Bahan.....	24
3.3. Prosedur	25
3.3.1. Pembuatan Media Selektif Kitin	25
3.3.2. Isolasi Mikroba Endofit	27
3.3.3. Pemurnian Mikroba Endofit	28
3.3.4. Kultivasi Mikroba Endofit	28
3.3.5. Ekstraksi Kultivasi	29
3.3.6. Uji Bioaktivitas	29
3.3.7. Identifikasi Mikroba Endofit.....	30
3.3.8. Kultivasi (<i>Scaling-up</i>).....	30
3.3.9. Ekstraksi Kultivasi (<i>Scaling-up</i>).....	30
3.3.10. Uji Bioaktivitas dengan Larva Nyamuk <i>Aedes aegypti</i>	30
3.3.11. Ekstraksi Cair-cair (Partisi).....	31
3.3.12. Uji Kromatografi Lapis Tipis.....	31
3.3.13. Fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi.....	32
3.3.14. Uji Bioaktivitas Fraksi dengan Larva Nyamuk <i>Ae. aegypti</i>	32
3.3.15. Karakterisasi Senyawa dalam Sampel	32
3.4. Bagan Alir Penelitian.....	33

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1. Pembuatan Media Selektif Kitin	34
4.2. Isolasi dan Pemurnian Mikroba Endofit	36
4.3. Kultivasi Mikroba Endofit dan Ekstraksi Senyawa	40
4.4. Uji Bioaktivitas dan Identifikasi Mikroba Endofit	41
4.5. Kultivasi (<i>Scaling-up</i>) dan Uji Bioaktivitas	42
4.6. Ekstraksi Cair-cair (Partisi).....	45
4.7. Fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi.....	46
4.8. Karakterisasi Fraksi	50
V. SIMPULAN DAN SARAN	56
5.1. Simpulan	56
5.2. Saran	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	67

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Isolat tunggal dari akar, batang, dan daun mangrove <i>A. officinalis</i>	39
2. Data persen mortilitas (kematian) larva nyamuk <i>Ae. aegypti</i> pada uji lanjutan ekstrak 21PNA-1	44
3. Letal <i>Concentration</i>	44
4. Klasifikasi tingkat toksisitas berdasarkan nilai LC_{50}	45
5. Data fraksi gabungan dari hasil fraksinasi kolom kromatografi	48
6. Data uji bioaktivitas terhadap larva nyamuk <i>Ae. aegypti</i>	49
7. Data hasil interpretasi puncak-puncak pada kromatogram LC-MS/MS.....	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Ekosistem Mangrove.....	5
2. Siklus hidup mangrove <i>A. officinalis</i>	6
3. Bentuk (a) akar, (b) bunga, (c) buah, (d) daun, dan (e) batang.....	7
4. Struktur 2,4,6-trifenilamin	10
5. Struktur diaporpenoid A.....	11
6. Struktur (9R, 10R)- <i>dihydro-harzianone</i> (1).....	11
7. Struktur phosterols A-B	12
8. Struktur <i>flavogadorinin</i>	13
9. Struktur turunan <i>xanthene</i>	13
10. Struktur <i>avicenol C</i>	14
11. Struktur <i>stenocarpoquinone B</i>	14
12. Struktur kitin	16
13. Siklus hidup nyamuk <i>Ae. aegypti</i>	18
14. Bagan alir penelitian.	33
15. Reaksi deproteinasi	35
16. Koloid kitin	36
17. Lokasi sampling mangrove	36
18. (a) Mangrove <i>A. officinalis</i> (b) Kondisi tanah mangrove <i>A. officinalis</i>	37
19. Koloni (a) akar, (b) batang, dan (c) daun	38
20. Inokulum pada hari ke-7	40
21. Kultivasi pada hari ke-14	40
22. (a) Isolat 21PNA-1 setelah peremajaan berulang dan (b) Hasil mikroskop isolat 21PNA-1.....	42

23. (a) Genus <i>Streptomyces</i> dan (b) Bentuk spora <i>actinomycetes</i>	42
24. Kultivasi (<i>scaling-up</i>) isolat 21PNA-1.....	43
25. Ekstak kasar isolat 21PNA-1	43
26. Partisi ekstrak dengan EtOAc dan Aquades.....	45
27. Hasil KLT (a) ekstrak kasar, (b) fraksi etil, dan (c) fraksi air.....	46
28. Fraksinasi dengan kolom kromatografi.....	47
29. Hasil KLT fraksi 1-50	47
30. Fraksi 9-11 (a) sebelum pencucian dan (b) setelah pencucian.....	48
31. Hasil KLT fraksi 9-11 (a) sebelum pencucian dan (b) setelah pencucian berulang.....	49
32. Kromatogram LC-MS/MS fraksi 9-11	50
33. Hasil KLT dengan (a) peraksi dragendorff, (b) pereaksi ninhidrin, dan (c) lampu UV 254nm.....	52
34. Spektrum MS pada waktu retensi 10.20	53
35. Prediksi struktur senyawa puncak nomor 4 pada m/z 343.2944.....	53
36. Prediksi struktur senyawa puncak nomor 8 pada m/z 371.3284.....	54
37. Spektrum FTIR fraksi 9-11	55

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar belakang

Demam berdarah adalah salah satu penyakit tropis paling umum yang menyerang manusia. Demam berdarah telah menjadi masalah internasional terutama dalam kesehatan masyarakat beberapa dekade terakhir (Wang *et al.*, 2020). Demam Berdarah *Dangue* (DBD) disebabkan oleh infeksi virus *dengue*. Virus ini dapat ditularkan oleh nyamuk *Aedes aegypti* (*Ae. aegypti*) betina, nyamuk dengan kecepatan berkembang biak cukup tinggi yang menyebabkan 390 juta orang terinfeksi setiap tahunnya (Kemenkes, 2018). Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan sekitar 2,5 - 3 miliar orang saat ini tinggal di zona yang ditularkan oleh demam berdarah (Wang *et al.*, 2020). Berdasarkan data WHO, Asia Pasifik memiliki persentase penyakit DBD di dunia antara tahun 2004 sampai 2010 diangka 75 persen. Indonesia merupakan salah satu negara terbesar di kawasan Asia Pasifik dengan jumlah penduduk sebesar 270,20 juta jiwa (BPS, 2021). Sementara itu, Indonesia sebagai negara ke-2 dengan kasus DBD terbesar diantara 30 negara wilayah endemis lainnya.

Penyakit Demam Berdarah *Dengue* (DBD) merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat Indonesia yang jumlah penderitanya terus meningkat serta penyebarannya yang semakin luas. Wabah periodik ini telah terjadi di Indonesia dengan jumlah yang terus meningkat kasus dan tingkat keparahannya (Karyanti dkk., 2014). Pada tahun 2019 jumlah pasien DBD di Provinsi Lampung mencapai 66,42/100.000 penduduk (Kemenkes, 2019).

Salah satu upaya penanggulangan penyakit DBD yang sudah dilakukan yaitu dengan pengendalian vektor penyebab DBD. Pengendalian vektor nyamuk sampai saat ini dianggap cukup efektif dalam menanggulangi penyakit ini. Salah satu cara penanggulangan yang banyak digunakan sampai saat ini yaitu dengan penggunaan insektisida untuk membunuh larva nyamuk. Tetapi, penggunaan insektisida sintesis dapat menimbulkan berbagai efek buruk alergi seperti gatal-gatal pada kulit, ensefalopati kulit, gangguan pernapasan serta berbahaya bagi lingkungan. Penggunaan insektisida dalam jangka waktu lama juga dapat menimbulkan efek resistensi pada vektor (Adenan dkk., 2018). Berdasarkan fakta tersebut, diperlukan metode alternatif untuk mengontrol pertumbuhan larva nyamuk yang mudah untuk didegradasi, tidak berbahaya bagi kesehatan manusia, dan juga ramah lingkungan. Oleh karena itu, banyak peneliti yang mulai mengembangkan biolarvasida sebagai repelan untuk mengurangi efek buruk akibat pemakaian insektisida sintetis. Biolarvasida memiliki kelebihan yaitu bersifat spesifik terhadap target, *biodegradable*, murah, mudah didapat, dan ramah lingkungan (Shinde *et al.*, 2018).

Biolarvasida dapat berasal dari hewan, tumbuhan, dan juga mikroorganisme yang berasal dari lingkungan. Beberapa metabolit sekunder yang berasal dari mikroorganisme endofit memiliki aktivitas sebagai biolarvasida. Senyawa metabolit yang diperoleh dari mikroorganisme endofit mangrove, digunakan dalam industri farmasi dan *nutraceutical* untuk menghasilkan antimikroba, antikanker, antioksidan, antidiabetes, dan agen terapeutik lainnya. Selain itu, mikroorganisme endofit mangrove tertentu juga berkontribusi terhadap produksi bioinsektisida yang berguna dalam pengendalian hama serangga. Biolarvasida menjadi salah satu metode terpenting dalam pengendalian nyamuk. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan adanya sifat larvasida yang diekspresikan *Aspergillus sp* terhadap spesies nyamuk (Thatoi *et al.*, 2013). Pada penelitian Baskar *et al.* (2020) menunjukkan bahwa *Aspergillus tamarii* menunjukkan efek larvasida yang tinggi terhadap nyamuk. Sedangkan pada penelitian Bai *et al.* (2019) senyawa baru turunan *xanthene* yang diisolasi dari fungi endofit mangrove *Penicillium sp.* menunjukkan penghambatan aktivitas pertumbuhan terhadap larva

Helicoverpa armigera hubner yang baru menetas, dan larva *Culex quinquefasciatus* yang baru menetas.

Data penelitian Sonawane *et al.* (2020) menunjukkan bahwa masih banyak mikroorganisme endofit yang belum dieksplorasi terutama yang berasal dari tanaman mangrove spesies *Avicennia officinalis* (*A. officinalis*). Berdasarkan penelitian Bai *et al.* (2019) senyawa yang berhasil diisolasi dari mikroorganisme endofit mangrove memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai biolarvasida, hal ini memberikan peluang besar untuk menemukan senyawa dan sumber daya baru dengan potensi sebagai biolarvasida terhadap larva nyamuk yang dapat digunakan sebagai pengendalian vektor penyebab penyakit DBD.

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Mengisolasi mikroorganisme endofit yang terdapat pada akar, batang, dan daun mangrove *A. officinalis* yang tumbuh di sekitar kawasan hutan mangrove Lampung.
2. Mengisolasi dan melakukan uji senyawa bioaktif dari mikroorganisme endofit mangrove *A. officinalis* terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*.
3. Melakukan uji efektivitas senyawa terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti*.
4. Melakukan karakterisasi senyawa bioaktif dari mikroorganisme endofit mangrove *A. officinalis*.

1.3. Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai potensi mikroorganisme endofit yang berasosiasi pada tumbuhan mangrove *A. officinalis* di Lampung sebagai sumber senyawa bioaktif dan aktivitas larvasida terhadap nyamuk *Ae. aegypti*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Mangrove

2.1.1. Ekosistem Mangrove

Mangrove merupakan tumbuhan yang ditemukan di daerah pasang surut seperti pantai pada daerah tropis. Tanaman ini terdiri dari beberapa genus yaitu *Avicennia*, *Sonneratia*, *Rhizophora*, *Bruguiera*, *Ceriops*, *Lumnitzera*, *Excoecaria*, *Xylocarpus*, *Aegiceras*, *Scyphyphora* dan *Nypa*. Di Indonesia, keanekaragaman jenis mangrove yang tumbuh antar pulau sangat berbeda. Jenis mangrove yang paling banyak ditemukan di Jawa dan Sumatera dibandingkan pulau-pulau lain, di mana 202 spesies mangrove dikenal, 166 di antaranya ditemukan di pulau Jawa, 157 jenis di pulau Sumatera, 150 jenis di pulau Kalimantan, 142 jenis di Irian Jaya, 135 jenis di pulau Sulawesi, dan 120 jenis spesies di kepulauan Sunda Kecil (Giesen *et al.*, 2007).

Ekosistem mangrove (Gambar 1) mendominasi wilayah pesisir perairan tropis dan subtropik di seluruh dunia. Ekosistem ini berkontribusi pada perlindungan ekosistem pantai, penyaringan air, penyediaan area untuk pembudidayaan ikan dan udang, penyediaan bahan bangunan, bahan obat, dan banyak fungsi lainnya. Pada saat ini, mangrove menjadi ekosistem yang paling terancam di seluruh dunia (Kuenzer *et al.*, 2013).

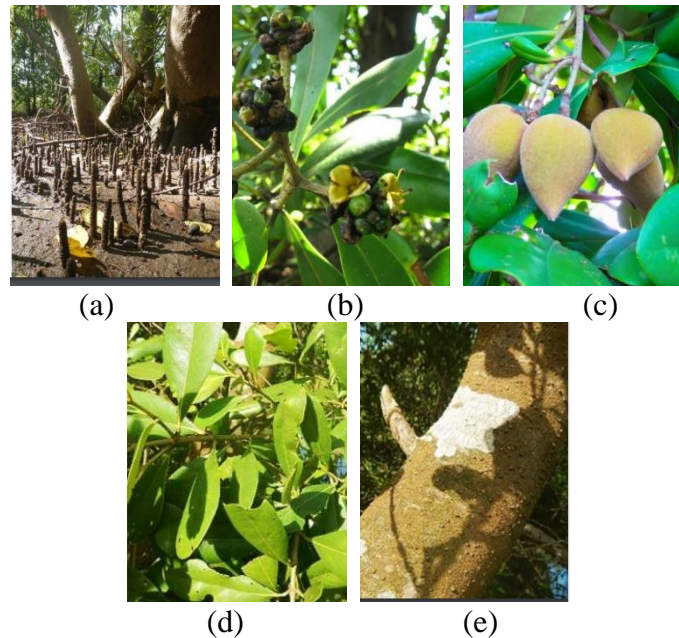


Gambar 1. Ekosistem Mangrove (Sumber: dokumen pribadi).

Lingkungan mangrove menurut Eldeen and Effendy (2013), memiliki nutrisi yang baik bagi pertumbuhan kelompok bakteri tertentu, termasuk bakteri endofit yang berasosiasi dengan tumbuhan-tumbuhan di daerah mangrove. Interaksi endofit di bawah kondisi lingkungan mangrove dapat menyebabkan adaptasi khusus, termasuk menghasilkan metabolit-metabolit atau enzim-enzim yang penting bagi industri farmasi, pangan, dan industri berbasis bioteknologi lainnya. Mangrove juga dilaporkan sebagai tanaman yang kaya akan sumber fungi. Fungi endofit yang berasal dari ekologi mangrove merupakan kelompok terbesar kedua setelah fungi endofit dari laut (Sridhar, 2004).

2.1.2. Siklus Hidup Mangrove

Untuk bisa bertahan dan berkembang pada kondisi alam yang tidak menentu, jenis mangrove sejati mempunyai cara yang khas yaitu mekanisme reproduksi dengan buah yang disebut vivipar. Cara berkembang biak vivipar yaitu dengan menyiapkan bakal pohon (*propagule*) dari buah atau bijinya sebelum lepas dari pohon induk. Mangrove dapat menghasilkan buah yang mengecambah atau mengeluarkan akar sewaktu masih tergantung pada ranting pohon dan berada jauh di atas permukaan air laut. Biji mangrove mengeluarkan tunas berupa akar tunjang sebagai kecambah, sehingga pada waktu telah matang dan jatuh lepas dari tangkai telah siap untuk tumbuh. Buah ini akan berkembang sampai tuntas, siap untuk dijatuhkan ke laut sehingga dapat tumbuh menjadi pohon baru. Bakal



Gambar 3. Bentuk (a) akar, (b) bunga, (c) buah, (d) daun, dan (e) batang (Sumber: Sidik dkk., 2018).

A. officinalis merupakan tumbuhan mangrove yang penting dalam bidang pengobatan yang dapat digunakan dalam pengobatan tradisional untuk mengobati berbagai macam penyakit seperti rematik, kelumpuhan, asma, dispepsia, tumor dan penyakit lainnya. Ekstrak daun dan kulit batang mangrove *A. officinalis* memiliki potensi sebagai antioksidan, antimikroba (Das *et al.*, 2018), antifungi, antiinflamasi, antivirus, dan antikanker (Prakashamani *et al.*, 2019).

2.1.4. Klasifikasi *Avicennia officinalis*

Klasifikasi mangrove *A. officinalis* menurut Prakashamani *et al.* (2019) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Lamiales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Avicennia</i>
Spesies	: <i>Avicennia officinalis</i>

2.2. Mikroba Endofit

Endofit dapat berupa bakteri atau fungi atau aktinomisetes, yang menghabiskan seluruh atau sebagian dari siklus hidupnya di jaringan antar atau intraseluler di bagian tumbuhan yang berbeda (batang, tangkai daun, daun, dan akar) tanpa menyebabkan penyakit pada tanaman inangnya (Singh, 2019). Komunitas endofit tidak hanya menguntungkan tanaman tetapi juga lingkungan. Misalnya, endofit membantu tanamannya tumbuh sehat dengan memproduksi hormon pertumbuhan, mengikuti fitoremediasi, biodegradasi, dan siklus hara yang selanjutnya (Nair and Padmavathy, 2014).

Endofit bertahan hidup dengan nutrisi yang dihasilkan tanaman dan sebagai gantinya, endofit menghasilkan metabolit fungsional untuk tanaman inangnya. Ada hubungan linier positif antara endofit dan tanaman inangnya dalam hal produksi senyawa bioaktif (Palanichamy *et al.*, 2018). Dengan demikian, organisme ini dapat berfungsi sebagai sumber agen antimikroba yang menghasilkan berbagai senyawa penting, termasuk agen antitumor, insektisida, vitamin, immunosupresan, modulator imun, dan produk alami lainnya (Thatoi *et al.*, 2013).

Mangrove tumbuh di lingkungan dengan konsentrasi garam dan kelembaban yang tinggi, sering terkena air pasang surut dan kondisi berlumpur, secara fisiologis akan beradaptasi menghasilkan beragam metabolit sekunder bioaktif seperti alkaloid, benzopiranon, flavonoid, kuinon, terpenoid, tetralon, xanthon (Eldeen and Effendy, 2013).

2.3. Senyawa Bioaktif Mangrove Asosiasi Endofit

Menurut Chatterjee and Abraham (2020) senyawa metabolit sekunder dapat disekresikan oleh mikroorganisme endofit seperti alkaloid, isokoumarin, steroid, terpenoid, kuinon, fenilpropanoid, fenol, asam fenolik, metabolit alifatik, dan

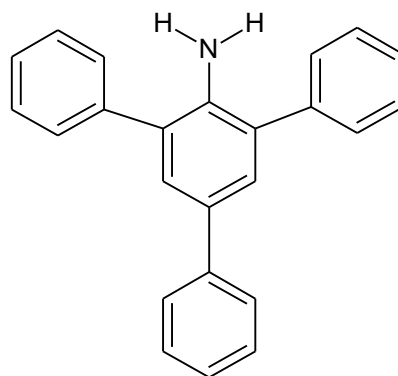
lakton. Senyawa ini dapat bekerja sebagai agen antivirus, antimikroba dan sitotoksik yang potensial (Palanichamy *et al.*, 2018).

Pada penelitian Sonawane *et al.* (2020) berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi fungi endofit *Fusarium solani* dari daun mangrove *A. officinalis*. Ekstrak fungi menunjukkan adanya beberapa senyawa dengan aktivitas antikanker. Ekstrak etil asetat *A. officinalis* menunjukkan aktivitas antibakteri yang luar biasa terhadap *Eschericia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Ekstrak dengan aktivitas antibakteri terbukti dapat dimanfaatkan dalam pengobatan kanker sebagai penghambat pertumbuhan sel kanker (Valentin *et al.*, 2010).

2.3.1. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa karbon yang mengandung unsur C, H, N, dan biasanya O. Kata alkaloid artinya seperti alkali, kata tersebut dapat menggambarkan tentang sifat zat ini karena, menjelaskan bahwa golongan senyawa ini bersifat basa dengan derajat tertentu, yang dapat bereaksi dengan asam membentuk garam. Golongan senyawa ini paling banyak mirip dengan alkali ammonia, dan dapat bereaksi dengan asam membentuk garam yang sesuai tanpa menggantikan hidrogen dari asam. Alkaloid dapat ditemukan baik di tumbuhan maupun hewan, pada tumbuhan ditemukan pada semua bagian tumbuhan, yaitu akar, batang, dan daun (Coqueiro and Verpoorte, 2019).

Senyawa golongan alkaloid 2,4,6-trifenilamin (Gambar 4) berhasil diisolasi dari jamur endofit *Alternaria longipes* tumbuhan mangrove *A. officinalis*. Senyawa ini menunjukkan aktivitas penghambatan glukosidase pada diabetes tipe 2 (Ranganathan and Mahalingam, 2018).



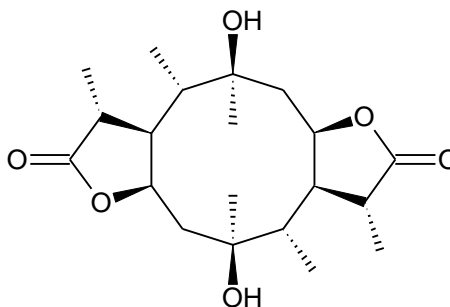
Gambar 4. Struktur 2,4,6-trifenilamin (Sumber: Ranganathan and Mahalingam, 2018).

2.3.2. Terpenoid

Terpenoid juga dikenal sebagai isoprenoid, adalah produk alami yang paling banyak dan beragam secara struktural. Terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah dan struktur karbon yang dibentuk oleh susunan linier unit isoprena diikuti dengan siklisasi dan penataan ulang kerangka karbon dengan ciri empiris, dikenal sebagai aturan isoprena. Isoprena atau pembangun terpenoid adalah 2-metilbuta-1,3-diena (C_5H_8). Unit isoprena tunggal mewakili kelas terpenoid yang paling dasar yaitu hemiterpenoid (Ludwiczuk *et al.*, 2017).

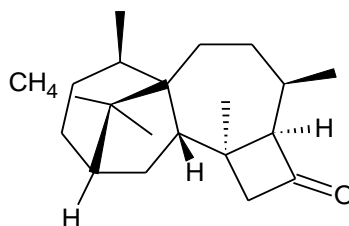
Lebih dari 70.000 struktur terpenoid yang berbeda telah diketahui sejauh ini, banyak dari terpenoid memiliki potensi aplikasi yang sangat menarik sebagai obat-obatan, perasa dan wewangian. Terpenoid dari mikroba menawarkan alternatif yang berkelanjutan dan ramah lingkungan mulai dari sumber karbon sederhana (Moser and Pichler, 2019).

Satu diterpenoid baru, *diaporpenoid A* (Gambar 5) diisolasi dari ekstrak MeOH yang diperoleh dari kultur fungi endofit mangrove *Diaporthe sp.* Senyawa menunjukkan aktivitas anti-inflamasi yang kuat dengan menghambat produksi nitrogen oksida (NO) (Chen *et al.*, 2021).



Gambar 5. Struktur *diaporpenoid A* (Sumber: Chen *et al.*, 2021).

Diterpenoid *harziane* baru, bernama (9R, 10R)-*dihydro-harzianone* (1) (Gambar 6), diisolasi dari fungi endofit mangrove *Trichoderma sp.* Xy24. Senyawa ini adalah produk reduktif dari *harzianone*. Senyawa ini menunjukkan aktivitas sitotoksik (Zhang *et al.*, 2016).

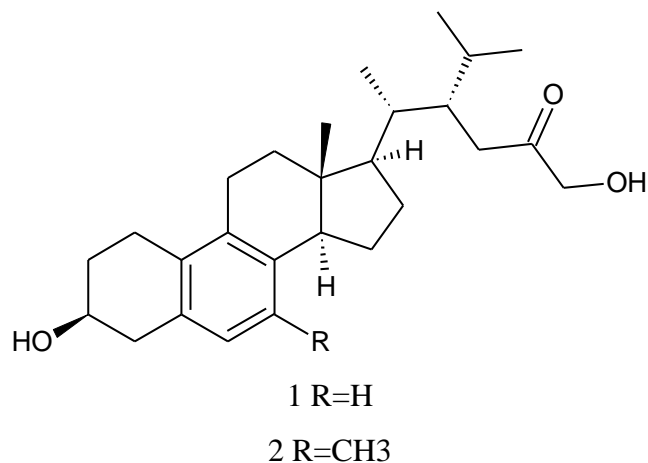


Gambar 6. Struktur (9R, 10R)-*dihydro-harzianone* (1) (Sumber: Zhang *et al.*, 2016).

2.3.3. Steroid

Steroid adalah kelompok senyawa yang penting dari hasil produk alam, menunjukkan variasi yang memiliki aktivitas biologis yang luas. Penambahan satu atau lebih heteroatom pada atom karbon dalam steroid dapat memvariasikan aktivitas biologisnya. Terkadang penambahan gugus fungsi lainnya dan cincin heterosiklik pada steroid dapat mengubah aktivitas fisiologisnya (Saeed *et al.*, 2017).

Steroid baru *phomosterols A-B* (Gambar 7), diisolasi dari fungi endofit mangrove *Phoma sp.* SYSU-SK-7. Senyawa 1-2 mengandung kerangka cincin B aromatik yang tidak biasa dalam sterol. Senyawa 1 dan 2 memiliki aktivitas penghambatan terhadap produksi NO di lipopolisakarida (LPS) (Chen *et al.*, 2020).

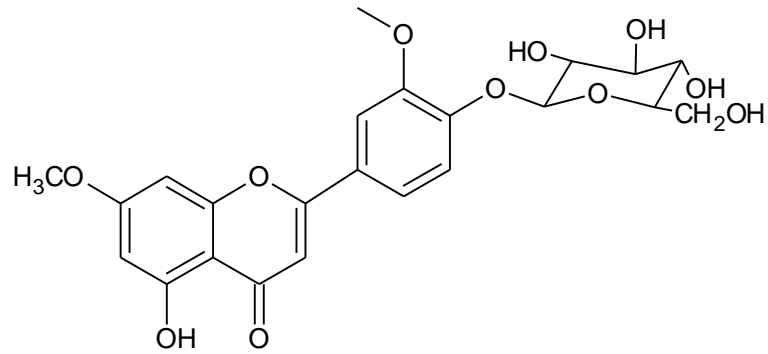


Gambar 7. Struktur *phomosterols* A-B (Sumber: Chen *et al.*, 2020).

2.3.4. Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa polifenol yang dibagi lagi menjadi 6 golongan: isoflavonoid, flavanon, flavanol, flavonol, flavon dan antosianidin ditemukan di berbagai tumbuhan, buah-buahan, sayur mayur, minuman seperti teh hijau, anggur dan produk makanan berbahan dasar kakao adalah sumber utama flavonoid. Flavonoid telah terbukti memiliki berbagai macam aktivitas sebagai antikanker, berpartisipasi dalam menghentikan siklus sel, menginduksi apoptosis, autophagy, dan menekan proliferasi sel kanker dan invasi. Flavonoid memiliki kerja sebagai antioksidan dalam kondisi normal dan merupakan pro-oksidan yang kuat dalam sel kanker yang memicu jalur apoptosis dan menurunkan jalur pensinyalan pro-inflamasi (Kopustinskiene *et al.*, 2020).

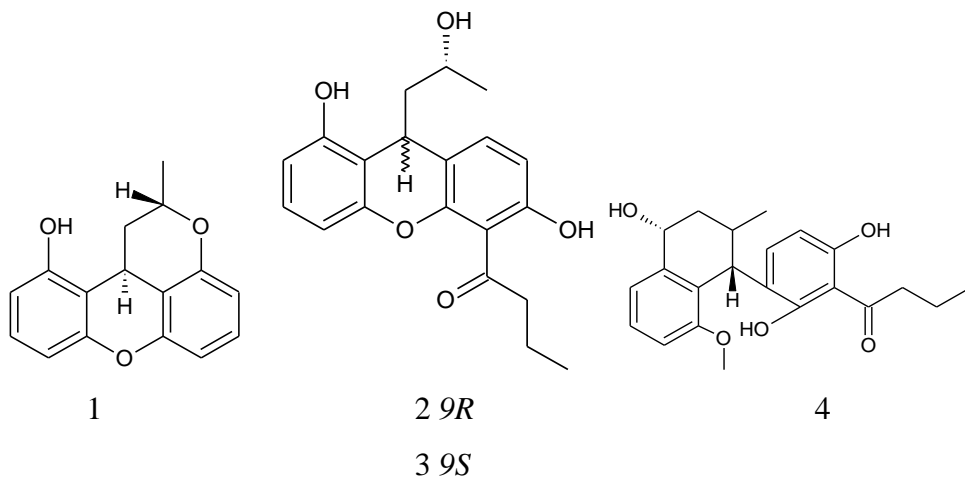
Senyawa golongan flavonoid, flavogadorinin (Gambar 8) berhasil diisolasi dari tumbuhan mangrove *A. officinalis*. Senyawa menunjukkan aktivitas yang signifikan pada penghambatan asetilkolinesterase dan butirilkolinesterase. *A. officinalis* juga menunjukkan aktivitas sebagai anti-HIV dengan menghambat virus dengan dua mekanisme yang berbeda termasuk interferensi dengan interaksi dan penghambatan transkriptase balik virus (Nguyen *et al.*, 2019).



Gambar 8. Struktur *flavogadorinin* (Sumber: Nguyen *et al.*, 2019).

2.3.5. Poliketida

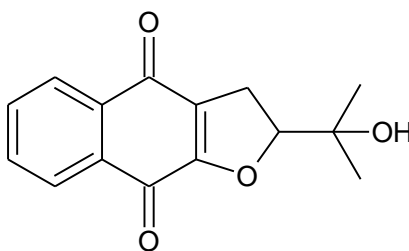
Empat turunan baru *xanthene* (Gambar 9) yang diisolasi dari fungi endofit mangrove *Penicillium sp.* yang diperoleh dari batang *Ceriops tagal*. Semua senyawa yang diisolasi diperiksa aktivitas insektisida. Senyawa 2 dan 3 menunjukkan penghambatan pertumbuhan aktivitas terhadap larva *Helicoverpa armigera Hubner* yang baru menetas, dan senyawa 1, 3, dan 4 menunjukkan aktivitas insektisida terhadap larva *Culex quinquefasciatus* yang baru menetas. Keempat turunan *xanthene* tersebut berpotensi untuk dikembangkan sebagai biopestisida baru (Bai *et al.*, 2019).



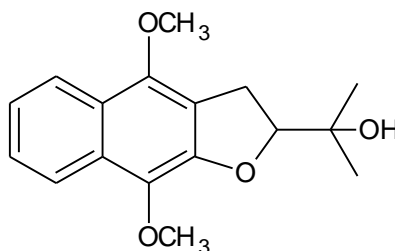
Gambar 9. Struktur turunan *xanthene* (Sumber: Bai *et al.*, 2019).

2.3.6. Kuinon

Senyawa metabolit aktif sebagai antibakteri dan antioksidan berhasil diisolasi dari ranting *A. officinalis* oleh Assaw *et al.* (2019). Aktivitas antibakteri dari fraksi *A. officinalis* terlihat adanya selektivitas yang kuat untuk bakteri gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* dan *Bacillus subtilis*). Fraksi menunjukkan dua *naphthofuranquinones*, yaitu *avicenol C* (Gambar 10) dan *stenocarpoquinone B* (Gambar 11). Sementara itu, aktivitas antioksidan dari fraksi *A. officinalis* menunjukkan aktivitas antioksidan yang rendah.



Gambar 10. Struktur *avicenol C* (Sumber: Assaw *et al.*, 2019).



Gambar 11. Struktur *stenocarpoquinone B* (Sumber: Assaw *et al.*, 2019).

2.4. Biopestisida

Produk alami dan mikroorganisme telah digunakan sebagai biopestisida di seluruh dunia yang dapat bersumber dari lingkungan, pada umumnya aman untuk organisme non-target termasuk manusia. Biopestisida telah mengurangi persistensi di lingkungan, dan berpotensi untuk digunakan dalam pertanian organik. Dibandingkan dengan pestisida sintetis, biopestisida baru dapat dikembangkan dalam waktu yang lebih singkat dan jauh lebih murah (Liu *et al.*, 2019).

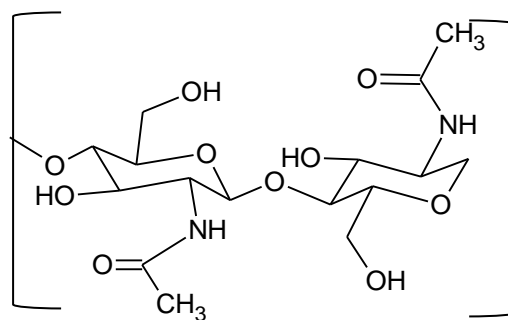
Biopestisida mikroba mencakup beberapa mikroorganisme seperti bakteri, fungi, baculovirus, dan bakteri asosiasi-nematoda yang bekerja melawan hama invertebrata di agro-ekosistem dengan memperhatikan lingkungan dan kesehatan manusia. Biopestisida mengalami pertumbuhan yang signifikan dan banyak penemuan yang sedang dikembangkan menjadi produk biopestisida baru untuk memenuhi permintaan pasar global yang terus meningkat. Setelah beberapa dekade keberhasilan penggunaan biopestisida dari bakteri entomopatogen *Bacillus thuringiensis* dan beberapa spesies mikroba lainnya. Penelitian akademisi dan industri baru-baru ini telah mengarah pada penemuan spesies dan strain mikroba baru, serta toksin spesifik dan faktor virulensinya (Ruiu, 2018).

Biopestisida telah menarik perhatian dalam pengelolaan hama dalam beberapa dekade terakhir, dan telah lama dipromosikan sebagai alternatif pengganti pestisida sintesis. Biopestisida juga menarik minat yang besar komunitas penelitian internasional, ditunjukkan peningkatan secara signifikan jumlah publikasi yang berhubungan dengan biopestisida. Baru-baru ini, senyawa baru dari fungi *Talaromyces flavus* SAY-Y-94-01 dilaporkan sebagai senyawa yang dapat digunakan sebagai biopestisida. Namun, biopestisida belum mencapai tingkat penggunaan yang diinginkan, untuk menggantikan dominasi pestisida kimia. Nanoformulasi dan teknologi mikroenkapsulasi dapat digunakan untuk meningkatkan stabilitas dan kerja biopestisida, sehingga meningkatkan penggunaannya (Damalas and Koutroubas, 2018).

2.5. Kitin

Kitin adalah salah satu polimer organik yang paling melimpah di bumi, yang merupakan komponen struktural dari eksoskeleton arthropoda, radula moluska, endoskeleton cephalopoda, dinding sel fungi, sisik ikan dan lissamphibian (Morin-Crini *et al.*, 2019). Kitin adalah polisakarida amino alami terbanyak kedua setelah selulosa. Kitin berupa homopolisakarida linier yang dimodifikasi nitrogen, berbobot molekul tinggi, yang terdiri dari unit berulang *N-acetyl-D-*

p[glukosamin], terikat bersama dalam β - (1 4) -N-asetil-D-glukosamin obligasi. Kitin memiliki rumus kimia $(C_8H_{13}O_5N)_n$, oleh karena itu dianggap sebagai polisakarida kompleks, yang strukturnya menyerupai selulosa tetapi dengan satu gugus hidroksil pada setiap monomer digantikan oleh gugus asetil amina. Ada tiga alomorf kitin yang berbeda yaitu α -kitin, β -kitin, dan γ - kitin. Perbedaan utama antara ketiganya adalah derajat hidrasi, ukuran sel satuan, dan jumlah kitin rantai per sel unit. Polimorf paling melimpah adalah α -kitin,yang memiliki sel ortorombik padat yang dibentuk secara bergantian (Oyatogun *et al.*, 2020).



Gambar 12. Struktur kitin (Sumber: Younes and Marguerite, 2015).

2.6. *Solid State Fermentation (SSF)*

SSF merupakan suatu proses fermentasi dimana mikroorganisme ditumbuhkan pada lingkungan tanpa air atau dengan kandungan air yang sangat sedikit. Walaupun digunakan media padat sebagai substrat tetapi substrat tetap membutuhkan kelembaban untuk mendukung pertumbuhan dan aktivitas metabolisme mikroorganisme (Lizardi-Jime´nez and Herna´ndez-Marti´nez, 2017). *Actinomyces* seperti *Streptomyces* disarankan untuk menggunakan metode SSF dalam proses fermentasinya untuk menghasilkan metabolit sekunder, karena mereka memiliki karakteristik kolonisasi residu padat yang melimpah, produksi berbagai macam enzim degradatif, dan ketahanan yang tinggi terhadap kondisi ekstrim yang dialaminya (Soccol *et al.*, 2017).

2.7. Nyamuk *Aedes aegypti*

Ae. aegypti merupakan nyamuk sebagai vektor penyakit demam berdarah. Penyakit demam berdarah adalah penyakit menular yang disebabkan oleh virus. Salah satu upaya yang dilakukan untuk pengendalian penyakit tersebut adalah dengan pengendalian vektornya (Yulidar dan Wilya, 2015).

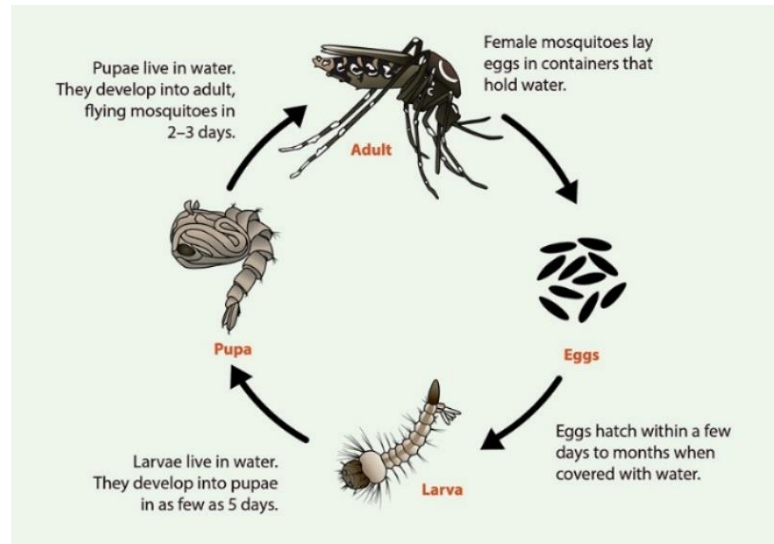
2.7.1. Klasifikasi Nyamuk *Aedes aegypti*

Klasifikasi nyamuk *Ae. aegypti* menurut Hidayani (2020) adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Arthropoda
Kelas	: Insecta
Ordo	: Diptera
Familia	: Culicida
Genus	: <i>Aedes</i>
Spesies	: <i>Aedes aegypti</i>

2.7.2. Siklus Hidup Nyamuk *Aedes aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* memiliki siklus hidup yang sempurna, dimana tahapan siklus hidupnya terdiri dari empat fase, yaitu mulai dari telur, jentik, pupa, dan nyamuk dewasa (Gambar 13). Telur nyamuk berbentuk elips berwarna hitam dan terpisah satu dengan yang lain. Telur akan menetas dalam waktu satu sampai dua hari menjadi jentik (Susanti dan Suharyo, 2017).



Gambar 13. Siklus hidup nyamuk *Ae. aegypti* (Sumber : CDC, 2022).

2.7.2.1. Stadium Telur *Aedes aegypti*

Telur *Ae. aegypti* berwarna hitam, berukuran 0,7 mm, berbentuk elips menyerupai torpedo dengan titik-titik poligonal pada seluruh dinding selnya. Telur yang baru dikeluarkan oleh induk nyamuk berwarna putih dan lunak, tetapi setelah selang waktu 1-2 jam akan berubah menjadi warna hitam dan keras (Susanti dan Suharyo, 2017). Telur *Ae. aegypti* dapat bertahan pada kondisi kering pada waktu dan intensitas yang bervariasi hingga 8 bulan (CDC, 2022).

2.7.2.2. Stadium Larva *Aedes aegypti*

Menurut Susanti dan Suharyo (2017), larva *Ae. aegypti* memiliki 4 tahapan dalam perkembangan yang disebut dengan instar. Perkembangan dari instar I ke instar IV membutuhkan waktu sekitar 5 hari. Proses perubahannya adalah sebagai berikut:

1. Larva instar I: berukuran 1-2 mm, duri-duri (*spinae*) pada dada belum jelas, dan corong pernapasan pada sifon belum jelas.
2. Larva instar II: berukuran 2,5-3,5 mm, duri-duri dada belum jelas, dan corong kepala mulai menghitam.

3. Larva Instar III: berukuran 4-5 mm, duri-duri dada mulai jelas, dan corong pernapasan berwarna coklat kehitaman. Larva instar III menurut Sulistyoko dkk. (2018) dianggap cukup mewakili kondisi larva dengan ukuran yang tidak terlalu kecil sehingga mudah untuk diamati.
4. Larva instar IV: berukuran 5-6 mm, dengan warna kepala gelap.

2.7.2.3. Stadium Pupa *Aedes aegypti*

Stadium pupa atau kepompong merupakan fase akhir siklus hidup nyamuk dalam lingkungan air. Stadium ini membutuhkan waktu sekitar 2 hari pada suhu optimum. Pada fase ini adalah periode waktu tidak makan dan sedikit bergerak (Ditjen P2PL, 2014).

2.7.2.4. Stadium Nyamuk Dewasa *Aedes aegypti*

Nyamuk *Ae. aegypti* dewasa memiliki ukuran sedang dengan tubuh berwarna hitam kecokelatan. Tubuh dan tungkainya ditutupi sisik dengan garis-garis putih keperakan. Dibagian punggungnya tampak 2 garis melengkung vertikal dibagian kiri dan kanan. Ukuran dan warna nyamuk jenis ini kerap berbeda antar populasi, tergantung dari kondisi lingkungan dan nutrisi yang diperoleh nyamuk selama perkembangan (Ditjen P2PL, 2014). Nyamuk dewasa biasanya tinggal ditempat gelap dan lembab seta banyak tempat untuk hinggap (Kemenkes, 2017).

2.8. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam bahan-bahan yang akan diekstrak. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Ekstrak awal sulit dipisahkan melalui teknik pemisahan tunggal untuk mengisolasi senyawa tunggal. Oleh

karena itu, ekstrak awal perlu dipisahkan ke dalam fraksi yang memiliki polaritas dan ukuran molekul yang sama (Tetti, 2014).

2.8.1. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan. Faktor- faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain waktu, suhu, jenis pelarut, perbandingan bahan dan pelarut, dan ukuran partikel (Suharto dkk., 2016). Ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kelebihan yaitu zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak (Pratiwi, 2010). Pada saat proses perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan (Novitasari dan Putri, 2016).

2.8.2. Partisi (Ekstraksi Cair-Cair)

Ekstraksi cair-cair juga dikenal sebagai ekstraksi pelarut adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan bahan kimia dari satu larutan ke larutan lainnya berdasarkan perbedaan kelarutan bahan kimia terlarut dalam dua pelarut. Tiga komponen yang terlibat dalam proses ekstraksi cair-cair yaitu zat terlarut, pelarut, dan ekstraktan. Senyawa diekstraksi dari pelarut dan dilarutkan ke dalam pelarut lain. Proses ekstraksi cair-cair didasarkan pada kelarutan zat terlarut dalam pelarut yang berbeda. Untuk sistem tertentu, zat terlarut akan didistribusikan dalam pelarut yang berbeda pada rasio partisi tertentu, dan rasio ini tidak akan berubah seiring sistem mencapai keseimbangan (Zhang and Hu, 2013).

2.9. Metode Pemisahan dan Pemurnian

Kromatografi adalah salah satu teknik pemisahan yang banyak digunakan, teknik ini bergantung pada interaksi diferensial molekul antara fase diam dan fase gerak. Metode kromatografi kolom berbasis laboratorium untuk pemisahan protein menggunakan tiga teknik kromatografi yang umum, seperti eksklusi ukuran, pertukaran ion, dan kromatografi afinitas (Chakravarti *et al.*, 2016).

2.9.1. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah teknik yang dapat digunakan dalam kimia industri dan penelitian. KLT adalah teknik yang murah dan sederhana (Silver, 2020). Kromatografi lapis tipis (KLT) berperan dalam menentukan metode pemisahan untuk analisis sejumlah sampel atau untuk menganalisis sampel dimana sampel sulit dianalisis menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi. KLT memiliki keunggulan yaitu tidak memerlukan instrumentasi analitik yang canggih dan mahal. Beberapa sampel dapat dianalisis secara bersamaan dan memberikan kemungkinan berbagai metode deteksi untuk komponen yang terpisah dengan menggunakan UV atau reaksi kimia yang menghasilkan bintik-bintik atau noda berwarna. Untuk lokasi noda setelah pemisahan KLT, RF (*Retention Factor*) digunakan dan dapat dihitung menurut persamaan sebagai berikut:

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

RF diukur dari pusat titik dan berkisar antara 0 dan 1,00 atau diberikan sebagai persentase, sehingga mencakup rentang dari 0 hingga 100 (Kalász *et al.*, 2020).

2.9.2. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom biasanya mengarah ke resolusi yang lebih tinggi dan dengan demikian lebih efisien dalam hal pemurnian. Pada kromatografi kolom, salah satu

ujung kolom berisi cakram bertautan atau berlubang, yang mempertahankan fase diam di dalam kolom sambil membiarkan cairan terelusi melewatinya. Jadi, kromatografi kolom dapat dibayangkan sebagai perangkat filtrasi kontinu. Cairan dielusi dari kolom, eluen disalurkan perlahan melalui bagian atas kolom. Untuk pengumpulan fraksi yang dipisahkan dapat menggunakan pengumpul fraksi otomatis atau secara manual (Chakravarti *et al.*, 2016).

2.10. Karakterisasi Senyawa

2.10.1. Karakterisasi Senyawa dengan Spektrofotometri IR

Metode karakterisasi *Fourier transform infrared* (FTIR) adalah salah satu metode yang digunakan untuk menentukan gugus fungsi dengan kemungkinan ikatan molekul antara senyawa kimia. Posisi pita serapan IR dalam spektrum sebagai bilangan gelombang dapat digunakan untuk identifikasi berbagai komponen kimia. Umumnya, spektroskopi IR dapat diterapkan untuk berbagai macam bahan dan kondisi, serta dapat digunakan untuk analisis kualitatif dan kuantitatif (Mohamed *et al.*, 2017).

2.10.2. Karakterisasi Senyawa dengan LC-MS/MS

Metode analisis LC-MS merupakan metode analisis di mana campuran zat dipisahkan menggunakan kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC) dan dideteksi dengan spektrometri massa. Analit diidentifikasi berdasarkan waktu retensi dan melalui fragmen ion yang didapatkan.

Keuntungan dari LC-MS/MS adalah sebagai berikut:

- Spesifisitas dan sensitivitas yang lebih tinggi
- Lebih mudah dalam preparasi sampel
- Tidak diperlukan derivasi
- Mengurangi waktu analisis
- Jumlah sampel yang dibutuhkan jauh lebih sedikit (Keifer and Effenberger, 2017).

Analisis LC-MS adalah teknik analisis yang penting dalam bidang profil metabolik. LC-MS menawarkan keunggulan dibandingkan platform analisis lainnya seperti kecepatan, sensitivitas kemudahan dalam persiapan sampel, dan rentang dinamis yang besar (Want, 2018).

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan di laboratorium Biopolimer dan Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT LTSIT) Universitas Lampung pada bulan Oktober 2021 sampai Oktober 2022. Uji bioaktivitas terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* dilakukan di UPT-LTSIT, Universitas Lampung. Sampel mangrove *A. officinalis* diperoleh dari pantai Kunjir Lempasing, Kabupaten Pesawaran, Lampung dengan titik koordinat 5°30'30"S 105°15'28"E. Analisis menggunakan instrumen *Fourier transform infrared* (FTIR) dilakukan di Institut Teknologi Bandung (ITB) dan analisis menggunakan instrumen LC-MS/MS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik, Bogor.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat-alat gelas diantaranya: erlenmeyer, pipet tetes, gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, batang pengaduk, pinset, kawat ose, aluminium *foil*, plastik *wrap*, bunsen, *hot plate stirrer*, *spin bar*, lemari asam, neraca analitik, *cutter*, cawan petri, oven, *autoclave* Tomy SX-700, blender, kapas, kasa, plastik tahan panas, dan mikropipet digunakan untuk pembuatan koloid kitin, pengambilan sampel, pembuatan media agar kitin, isolasi mikroba endofit, pemurnian mikroba endofit, dan kultivasi. Corong pisah digunakan untuk partisi. Alat sentrifugasi dan tabung sentrifuse digunakan untuk pembuatan koloid kitin. *Laminar air flow* (LAF) digunakan untuk isolasi,

pemurnian, dan identifikasi mikroba endofit. *Rotary evaporator* Buchii/R210 digunakan untuk memekatkan ekstrak. *Coverslip*, kaca preparat, dan mikroskop *Axioo Zeiss Imager A1* digunakan untuk identifikasi mikroba endofit. Gelas plastik digunakan untuk uji bioaktivitas terhadap nyamuk *Ae. aegypti*. Satu set alat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan lampu UV digunakan untuk uji KLT. Satu set alat kromatografi kolom digunakan untuk fraksinasi kolom kromatografi. Spektrofotometer FTIR *Shimadzu - Prestige 21* dan instrumen LC-MS/MS digunakan untuk karakterisasi senyawa bioaktif yang diisolasi.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah limbah kulit udang digunakan untuk membuat koloid kitin dan media kultivasi. HCl dan NaOH digunakan untuk membuat koloid kitin. Aquades (H_2O) digunakan untuk membuat koloid kitin dan partisi. Agar-agar, air laut buatan, koloid kitin, dan antibiotik digunakan untuk membuat media pertumbuhan. Alkohol 70% digunakan pada tahapan pengambilan sampel dan tahapan yang membutuhkan sterilisasi. Etil asetat (EtOAc) digunakan untuk ekstraksi senyawa yang dihasilkan mikroba endofit, partisi, KLT, fraksinasi menggunakan kolom kromatografi. n-Heksana digunakan untuk eluen pada KLT dan fraksinasi menggunakan kolom kromatografi. Plat KLT, pereaksi serum sulfat, pereaksi ninhidrin, dan pereaksi dragendorff digunakan untuk uji KLT. Telur nyamuk *Ae. aegypti* digunakan untuk uji bioaktivitas. Silika gel dan Metanol (MeOH) digunakan untuk fraksinasi menggunakan kolom kromatografi.

3.3. Prosedur

3.3.1. Pembuatan Media Selektif Kitin

3.3.1.1. Persiapan Sampel Kulit Udang

Limbah kulit udang yang telah dikumpulkan dibersihkan dari kotoran dan sisa-sisa daging yang masih menempel, kemudian dicuci dengan air sampai bersih dan dikeringkan di dalam oven sampai diperoleh kulit udang yang kering. Kulit

udang yang telah kering kemudian dihancurkan dengan menggunakan blender sampai diperoleh serbuk kulit udang yang halus. Kulit udang yang telah halus siap digunakan untuk bahan utama pembuatan kitin.

3.3.1.2. Pembuatan Koloid Kitin

Pembuatan kitin merujuk pada Hendri dan Aspita (2013) dengan beberapa modifikasi. Tahapan awal yaitu sebanyak 100 gram serbuk kulit udang dilakukan demineralisasi menggunakan HCl 1,25 N dengan perbandingan 1:10 kemudian distirer tanpa pemanasan selama 2 jam, kemudian campuran disaring dan residu dinetralkan dengan aquades hingga pH 7, lalu residu dioven pada suhu 60°C selama 24 jam. Hasil dari demineralisasi kemudian ditambahkan NaOH dengan konsentrasi 20% dengan perbandingan 1:10 dan distirer dengan pemanasan selama 2 jam pada suhu 90°C. Kemudian campuran disaring dan residu dinetralkan dengan aquades. Residu yang diperoleh dikeringkan di dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam. Kitin yang sudah kering siap digunakan dalam proses pembuatan koloid kitin.

Sebanyak 10 gram kitin ditambahkan secara perlahan ±150 mL HCl pekat, kemudian distirer di dalam lemari asam selama 30 menit. Campuran ditambah dengan aquades sampai volume campuran menjadi 2 L kemudian diaduk dan dibiarkan selama 24 jam di dalam kulkas hingga terbentuk suspensi. Selanjutnya dicuci dengan air laut buatan dan disaring hingga pH netral. Endapan yang sudah netral disentrifuse selama 5 menit dengan kecepatan 7000 rpm. Endapan yang diperoleh diautoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, dan disimpan di dalam lemari pendingin. Koloid kitin siap digunakan sebagai bahan utama pembuatan media pertumbuhan.

3.3.1.3. Pembuatan Media Agar Kitin

Media agar kitin dibuat dengan menimbang 1% (w/w) koloid kitin dan 2% (w/w) agar kemudian dilarutkan dengan penambahan air laut buatan sebanyak yang

digunakan kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian, larutan dipanaskan di atas *hot plate* hingga homogen dan mengental. Selanjutnya campuran yang berada di dalam erlenmeyer ditutup dengan sumbat dan dilakukan sterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai, media agar kitin di bawa ke dalam LAF kemudian media ditambahkan 50 µg/mL *ciprofloxacin*, dihomogenkan dengan cara digoyangkan kemudian dituang ke dalam cawan petri, selanjutnya diberi sinar UV pada keadaan terbuka. Media agar kitin yang sudah mengeras kemudian ditutup dan dibungkus dengan plastik *wrap*. Media agar kitin siap digunakan untuk isolasi mikroba endofit.

3.3.2. Isolasi Mikroba Endofit

Isolasi mikroba endofit dilakukan di dalam *laminar air flow* (LAF). Isolasi mikroba endofit merujuk pada Kjer *et al.* (2010) dengan beberapa modifikasi. Pada penelitian ini dilakukan isolasi pada bagian akar, batang, dan daun tumbuhan mangrove.

Masing-masing bagian sampel (akar, batang, dan daun mangrove) yang diperoleh dari hasil sampling dicuci dengan aquades hingga bersih. Kemudian, dipotong menggunakan pisau yang sudah disterilisasi menjadi 4 bagian kecil dengan ukuran ±1x1 cm. Selanjutnya masing-masing potongan akar, batang, dan daun tersebut dicelupkan ke dalam alkohol 70% untuk proses sterilisasi permukaan potongan selama 60-120 detik dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian potongan (akar, batang, dan daun) dicelupkan ke dalam air laut buatan steril untuk menghentikan proses sterilisasi. Selanjutnya potongan akar, batang, dan daun kembali dikeringkan dengan cara diangin-anginkan untuk mencegah terjadinya kontaminasi.

Masing-masing potongan (akar, batang, dan daun) yang telah steril diletakkan di atas media kitin dalam cawan petri menggunakan pinset steril dengan posisi bagian dalam akar, batang, dan daun menempel pada media agar kitin. Kemudian

cawan petri ditutup dan disimpan pada suhu kamar selama 7-14 hari, pertumbuhan dari mikroba endofit akan terlihat disekitar potongan akar, batang, dan daun pada media.

3.3.3. Pemurnian Mikroba Endofit

Pemurnian mikroba endofit merujuk pada Ntabo *et al.* (2018). Setelah masa inkubasi selesai, koloni dengan morfologi dan karakteristik yang berbeda dipilih kemudian dimurnikan dengan teknik gores pada media agar kitin yang baru untuk mendapatkan isolat tunggal (murni). Pengamatan morfologi dilakukan setiap hari dan apabila ditemukan pertumbuhan koloni yang berbeda maka dipisahkan kembali hingga diperoleh isolat tunggal.

3.3.4. Kultivasi Mikroba Endofit

Mikroba endofit dikultivasi untuk memproduksi metabolit sekunder pada media padat kulit udang dengan merujuk Setiawan *et al.* (2021) dengan beberapa modifikasi. Sebelum dikultivasi pada media padat, masing-masing isolat mikroorganisme dihidupkan terlebih dahulu pada media cair. Media cair dibuat dengan melarutkan 2% koloid kitin pada air laut, kemudian dilakukan sterilisasi. Masing-masing isolat tunggal diinokulasikan sebanyak 1-2 ose pada media cair. Lalu, diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang dan dilakukan pengamatan pertumbuhan. Proses selanjutnya yaitu menyiapkan media padat untuk kultivasi dengan cara membersihkan kulit udang segar kemudian diblender. Media padat dari kulit udang yang digunakan disesuaikan dengan volume inokulum yang akan dituang. Kemudian, media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Lalu, dituang inokulum yang sudah diinkubasi selama 7 hari pada media padat di dalam LAF, kemudian diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang dan dilakukan pengamatan pertumbuhan.

3.3.5. Ekstraksi Kultivasi

Hasil kultivasi isolat diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat (EtOAc) selama 3x24 jam. Kemudian ekstrak disaring dan dipekatkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar yang diperoleh digunakan untuk uji skrining bioaktivitas untuk mengetahui keaktifan sampel tersebut. Sampel yang aktif selanjutnya siap digunakan untuk kultivasi skala besar (*scaling-up*).

3.3.6. Uji Bioaktivitas

3.3.6.1. Penyediaan Bahan Uji

Telur nyamuk *Ae. aegypti* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Loka Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Pangandaran.

3.3.6.2. Rearing Larva

Telur ditetaskan dalam wadah plastik yang berisi air bersih untuk pemeliharaan larva nyamuk. Telur menetas dalam waktu 5 hari menjadi larva instar III.

3.3.6.3. Uji

Uji bioaktivitas merujuk pada Rajesh *et al.* (2015) dengan beberapa modifikasi. Larva *Ae. aegypti* sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam wadah plastik yang telah berisi 25 mL air. Kemudian ditambahkan filtrat dari ekstrak kasar etil asetat dengan konsentrasi 250 ppm. Kontrol positif dibuat dengan menambahkan abate dengan konsentrasi 1% pada air yang telah berisi larva. Kontrol negatif terdiri dari air dan larva. Pengamatan sampel dan kontrol dilakukan pada waktu 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Pengamatan berakhir pada waktu 72 jam setelah perlakuan dengan cara menghitung jumlah larva yang mati pada setiap patokan waktu. Mengapungnya atau tidak Bergeraknya larva walaupun wadah larva tersebut sudah diguncangkan merupakan tanda larva tersebut sudah mati. Dilakukan pengulangan uji sebanyak 3 kali.

3.3.7. Identifikasi Mikroba Endofit

Isolat terpilih atau unggul yang didapatkan dari tahapan uji bioaktivitas kemudian dilakukan identifikasi menggunakan mikroskop dengan meletakkan *coverslip* yang telah ditumbuhi mikroba endofit pada kaca preparat kemudian diamati dan didokumentasi hasilnya.

3.3.8. Kultivasi (*Scaling-up*)

Strain terpilih (aktif) yang didapatkan dari skrining bioaktivitas dikultivasi dalam skala yang lebih besar, kultivasi ini dilakukan dengan menumbuhkan *actinomycetes* pada media yang berisi air laut buatan steril dan 2% koloid kitin yang telah diinkubasi selama 7 hari. Proses kultivasi ini menggunakan botol gelap 2,5 L yang diisi dengan 200 gram kulit udang yang telah diblender. Kemudian, dituang inokulum pada media kultivasi dan diinkubasi selama 14 hari. Kultivasi ini dilakukan dengan 6 kali pengulangan.

3.3.9. Ekstraksi Kultivasi (*Scaling-up*)

Setelah masa inkubasi kultivasi berakhir, hasil kultivasi diekstraksi dengan pelarut EtOAc sampai tidak berwarna lagi. Kemudian ekstrak disaring dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak pekat EtOAc. Ekstrak kasar yang diperoleh digunakan untuk uji bioaktivitas dan sebagiannya lagi digunakan untuk pemurnian senyawa.

3.3.10. Uji Bioaktivitas dengan Larva Nyamuk *Aedes aegypti*

Larva *Ae. aegypti* sebanyak 10 ekor dimasukkan ke dalam wadah plastik yang berisi 25 mL air. Kemudian ditambahkan filtrat dari ekstrak kasar EtOAc hasil *scaling-up* dengan 3 variasi konsentrasi 100 ppm, 200 ppm, dan 300 ppm. Kontrol positif dibuat dengan menambahkan abate 1% pada air yang telah berisi larva. Kontrol negatif terdiri dari air dan larva. Pengamatan sampel dilakukan pada waktu 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Pengamatan

berakhir pada waktu 72 jam setelah perlakuan dengan cara menghitung larva yang mati pada setiap patokan waktu. Mengapungnya atau tidak Bergeraknya larva walaupun wadah larva tersebut sudah diguncangkan merupakan tanda larva tersebut sudah mati. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

Pengamatan dilakukan dengan menghitung jumlah kematian larva instar III dengan rumus mortalitas sebagai berikut:

$$M = (a/b) \times 100\% \text{ (Melanie } et al., 2018)$$

Keterangan:

- M : Mortalitas %
a : Jumlah larva instar III yang mati
b : Jumlah total larva instar III

Kemudian dianalisis dengan uji Probit untuk menentukan nilai LC₅₀.

3.3.11. Ekstraksi Cair-cair (Partisi)

Metode ini dilakukan untuk memisahkan kandungan senyawa yang polar pada ekstrak kasar. Pada metode ini digunakan aquades untuk menarik komponen polar dan EtOAc digunakan untuk menarik komponen semi polar. Fraksi-fraksi yang telah diperoleh kemudian dicek pola pemisahannya menggunakan uji KLT dan dibandingkan dengan pola KLT ekstrak kasar. Setelah terlihat pola pemisahan fraksi EtOAc kemudian dipekatkan menggunakan *vacum rotary evaporator*.

3.3.12. Uji Kromatografi Lapis Tipis

Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan untuk mengetahui pola pemisahan senyawa yang terdapat pada sampel. Ekstrak kasar selanjutnya dianalisis dengan KLT menggunakan plat silika F254 sebagai fase diam. Eluen yang digunakan merupakan kombinasi dari n-Heksana dan etil asetat dengan perbandingan

tertentu yang telah dijenuhkan terlebih dahulu. Setelah dilakukan elusi terhadap plat KLT yang telah ditotol sampel, bercak atau noda dilihat di bawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 nm, kemudian disemprot dengan menggunakan pereaksi serium sulfat dan dragendorff untuk mendapatkan noda hasil KLT, lalu plat dikeringkan.

3.3.13. Fraksinasi menggunakan Kolom Kromatografi

Pada fraksinasi menggunakan kolom kromatografi digunakan fase diam silika gel dan elusi dilakukan dengan beberapa sistem gradien pelarut (non-polar ke polar). Kolom kaca yang berisi fase diam dimasukkan fase gerak secara perlahan dari atas, setelah kolom siap sampel dimuat dibagian atas kolom kemudian dialirkan fase gerak melalui kolom. Fraksi yang dihasilkan dikumpulkan untuk diuji bioaktivitasnya.

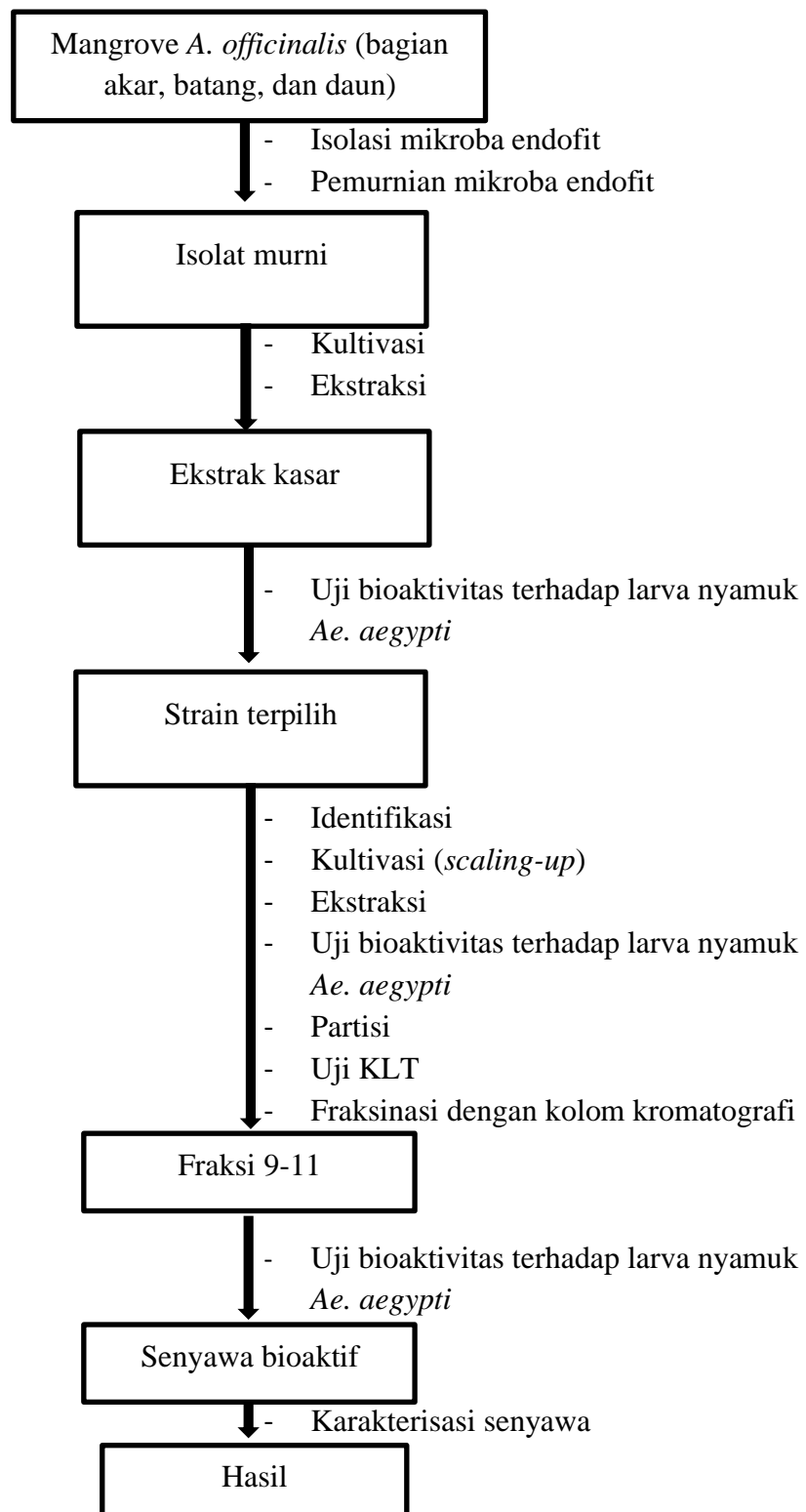
3.3.14. Uji Bioaktivitas Fraksi dengan Larva Nyamuk *Ae. aegypti*

Fraksi terpilih yang diperoleh dari fraksinasi dengan kolom kromatografi diuji bioaktivitasnya dengan larva nyamuk *Ae. aegypti* dengan konsentrasi LC₅₀ yang didapatkan dari uji sebelumnya. Kontrol positif dibuat dengan menambahkan abate dengan konsentrasi 1% pada air yang telah berisi larva. Kontrol negatif terdiri dari air dan larva. Pengamatan sampel dilakukan pada waktu 1 jam, 3 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Pengamatan berakhir pada waktu 72 jam setelah perlakuan dengan cara menghitung jumlah larva yang mati pada setiap patokan waktu. Mengapungnya atau tidak Bergeraknya larva walaupun wadah larva tersebut sudah diguncangkan merupakan tanda larva tersebut sudah mati. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

3.3.15. Karakterisasi Senyawa dalam Sampel

Fraksi terpilih dianalisis menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR), dan *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS).

3.4. Bagan Alir Penelitian



Gambar 14. Bagan alir penelitian.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1. Simpulan

Berdasarkan penelitian dapat diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Hasil isolasi mikroorganisme endofit dari mangrove *A. officinalis* diperoleh 9 isolat mikroorganisme endofit terdiri dari 2 isolat dari akar (21PNA-1 dan 21PNA-2), 4 isolat dari batang (21PNB-1, 21PNB-2, 21PNB-3, dan 21PNB-4), dan 3 isolat dari daun (21PND-1, 21PND-2, dan 21PND3).
2. Hasil dari uji aktivitas biolarvasida terhadap larva nyamuk *Ae. aegypti* menunjukkan bahwa ekstrak kasar dari isolat 21PNA-1 memiliki aktivitas yang paling unggul dengan jumlah rata-rata kematian larva yaitu 8,48.
3. Nilai LC_{50} yang didapatkan dari hasil uji ekstrak kasar isolat 21PNA-1 yaitu 64,6 ppm.
4. Hasil karakterisasi fraksi 9-11 menggunakan LC-MS/MS dan FTIR diperoleh 13 prediksi rumus molekul dengan prediksi senyawa yang aktif sebagai larvasida yaitu senyawa 2-(5-{{[Isopropyl (methyl) amino]methyl}}-1-tetrazolidinyl)-N-methyl-N-[2-(2-methyl-1-imidazolidinyl)ethyl] acetamide dan N-[1-(1-Imidazolidinyl)-3,3-dimethyl-2-butanyl]-2-(5-{{[isopropyl(methyl) amino]methyl}}-1-tetrazolidinyl)acetamide.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut, dimana dapat dilihat pada kromatogram LC-MS/MS masih terdapat banyak puncak yang menandakan senyawa belum murni, serta dilakukan elusidasi struktur dengan *nuclear magnetic resonance* (NMR).

DAFTAR PUSTAKA

- Adenan, H. A., Irfa'i, M., & Isnawati. 2018. Efektivitas Larvasida Nabati dalam Membunuh Larva *Aedes spp.* *Jurnal Kesehatan Lingkungan*. 15(1): 549–554.
- Alshaibani, M. M., Mohamadzin, N., Jalil, J., Sidik, N. M., Ahmad, S. J., Kamal, N., & Edrada-Ebel, R. 2017. Isolation, Purification, and Characterization of Five Active Diketopiperazine Derivatives from Endophytic *Streptomyces* SUK 25 with Antimicrobial and Cytotoxic Activities. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 27(7): 1249–1256.
- Al Shaqsi, N. H. K., Al Hoqani, H. A. S., Hossain, M. A., & Al Sibani, M. A. 2020. Optimization of the Demineralization Process for the Extraction of Chitin from *Omani portunidae segnis*. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 23(1):1-5.
- Ameh, A. O., David A., Muhammed, T. I., & Umar. R. 2014. Kinetics of Demineralization of Shrimp Shell using Lactic Acid. *Leornado Electronic Journal of Practices and Technologies*. 4(2): 13–22.
- Arnida, & Sutomo. 2015. Identifikasi Golongan Senyawa Kimia Dari Fraksi Kayu Sanrego (*Lunasia amara blanco*) Secara Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Sains Dan Terapan Kimia*. 2(1): 23–29.
- Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V. 2020. *Microbial Lipases and Their Versatile Applications*. Springer. India.
- Assaw, S., Mohd Amir, M. I. H., Khaw, T. T., Bakar, K., Mohd Radzi, S. A., & Mazlan, N. W. 2019. Antibacterial and Antioxidant Activity of Naphthofuranquinones from the Twigs of Tropical Mangrove *Avicennia officinalis*. *Natural Product Research*. 34(16): 2403–2406.

- Badan Pusat Statistika. 2021. *Hasil Sensus Penduduk 2020*. Berita Resmi Statistik. Jakarta.
- Bai, M., Zheng, C. J., Nong, X. H., Zhou, X. M., Luo, Y. P., & Chen, G. Y. 2019. Four New Insecticidal Xanthene Derivatives from the Mangrove-Derived Fungus *Penicillium sp.* JY246. *Marine Drugs*. 17(12): 5–13.
- Baskar, K., Chinnasamy, R., Pandey, K., Venkatesan, M., Sebastian, P. J., Subban, M., Thomas, A., Kweka, E. J., & Devarajan, N. 2020. Larvicidal and Histopathology Effect of Endophytic Fungal Extracts of *Aspergillus tamarii* Against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. *Heliyon*. 6(10): 1-11.
- Begen, D. G. 2004. *Sinopsis Ekosistem dan Sumberdaya Pesisir dan Laut Serta Prinsip Pengelolaannya*. Cetakan Ketiga. Pusat Kajian Sumber Daya Pesisir dan Lautan, Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Bertini, L., Perazzolli, M., Proietti, S., Capaldi, G., Savatin, D. V., Bigini, V., Longa, C. M. O., Basaglia, M., Favaro, L., Casella, S., Fongaro, B., Polverino de Laureto, P., & Caruso, C. 2022. Biodiversity and Bioprospecting of Fungal Endophytes from the Antarctic Plant *Colobanthus quitensis*. *Journal of Fungi*. 8(9): 1–23.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2022. *Dengue and the Aedes aegypti Mosquito*. San Juan.
- Chakravarti, B., Mallik, B., & Chakravarti, D. N. 2016. *Column Chromatography*. Current Protocols in Essential Laboratory Techniques. New York.
- Chatterjee, A., & Abraham, J. 2020. *Mangrove endophytes : a rich source of bioactive substances In Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. Vellore Institute of Technology. India.
- Chen, Y., Ge, Z., Wencong Y., Yingying Z., Qi T., Lin C., Jinmei W., Changyang M., Wenyi, K. and Zhigang, S. 2021. Metabolites with Anti-Inflammatory Activity from the Mangrove Endophytic Fungus *Diaporthe sp.* QYM12. *Marine Drugs*. 19(56): 2–11.

- Chen, Y., Yang, W., Zou, G., Yan, Z., Qiu, P., Long, Y., & She, Z. 2020. Metabolites with Anti-Inflammatory and α -Glucosidase Inhibitory Activities from the Mangrove Endophytic Fungus *Phoma* sp. SYSU-SK-7. *Tetrahedron Letters*. 61(48): 1-4.
- Chen, Y., Zhang, L., Zou, G., Li, C., Yang, W., Liu, H., & She, Z. 2020. Anti-inflammatory Activities of Alkaloids from the Mangrove Endophytic Fungus *Phomopsis* sp. SYSUQYP-23. *Bioorganic Chemistry*. 97(10): 1-5.
- Coqueiro, A., & Verpoorte, R. 2019. Alkaloids. *Encyclopedia of Analytical Science*. Elsevier. Leiden.
- Damalas, C. A., & Koutroubas, S. D. 2018. Current Status and Recent Developments in Biopesticide use. *Agriculture (Switzerland)*. 8(1): 1-6.
- Das, S. K., Samantaray, D., Mahapatra, A., Pal, N., Munda, R., & Thatoi, H. 2018. Pharmacological Activities of Leaf and Bark Extracts of a Medicinal Mangrove Plant *Avicennia officinalis* L. *Clinical Phytoscience*. 4(13): 1–10.
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. 2008. An Antifungal Compound: 4' Phenyl -1-Naphthyl -Phenyl Acetamide from *Streptomyces* sp. DPTB16. *Facta Universitatis: Medicine and Biology*. 15(1):7–12.
- Ditjen P2PL. 2014. *Petunjuk Teknis Jumantik-PSN Anak Sekolah*. Kemenkes RI. Jakarta.
- Dompeipen, E. J., Kaimudin, M., Dewa, R. P., Riset, B., Ambon, I., Cengkeh, J. K., & Ambon, B. M. 2016. Isolasi kitin dan kitosan dari limbah kulit udang. *Majalah Biam*. 12(1): 32–38.
- Eldeen, M., & Effendy, A.W.M. 2013. Antimicrobial Agents from Mangrove Plants and their Endhopytes, In: Mendez-Vilas, A. (Ed.). *Microbial pathogens and strategies for combinating them: Science, Technology and Education*. Formatex, Spain. 872-882.
- Giesen W, Wulffraat S, Zieren M and Schoelten L. 2007. Mangrove Guidebook for Southeast Asia. FAO and Wetlands International. *FAO Regional Office for Asia and the Pacific*. Bangkok.

- Grueters, U., Rodila, M., Satyanarayana, B., Dahdouh-guebas, F., Tharandt, D., Dresden, T. U., & Strasse, P. 2019. Estuarine, Coastal, and Shelf Science Individual-Based Modeling of Mangrove Forest Growth : MesoFON – Recent Calibration and Future irection. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 227(106302): 1–20.
- Hammado, N., & Ilmiati, I. 2013. Identifikasi senyawa bahan aktif alkaloid pada tanaman Lahuna (*Eupatorium odoratum*). *Jurnal Dinamika*. 4(2): 1–18.
- Hendri, J., & Aspita L. 2013. *Kitin Kitosan*. Lembaga Penelitian Universitas Lampung. Lampung.
- Hidayani, W. R. 2020. Demam Berdarah Dengue : Perilaku Rumah Tangga Dalam Pemberantasan Sarang Nyamuk dan Program Penanggulangan Demam Berdarah Dengue. *Pena Persada*. Banyumas.
- Joe, S., & Sarojini, S. 2017. An Efficient Method of Production of Colloidal Chitin for Enumeration of Chitinase Producing Bacteria. *Mapana - Journal of Sciences*. 16(4): 37–45.
- Kalász, H., Báthori, M., & Valkó, K. L. 2020. Basis and Pharmaceutical Applications of Thin-layer Chromatography. *Handbook of Analytical Separations*. 10(8): 523-585.
- Karyanti, M. R., Uiterwaal, C. S. P. M., Kusriastuti, R., Hadinegoro, S. R., Rovers, M. M., Heesterbeek, H., Hoes, A. W., & Bruijning-Verhagen, P. 2014. The Changing Incidence of Dengue Haemorrhagic Fever in Indonesia: A 45-year registry-based analysis. *BMC Infectious Diseases*. 14(1): 1–7.
- Keifer, G., & Effenberger, F. 2017. LC-MS. *Angewandte Chemie International Edition*. 11(6): 951–952.
- Kementerian Kesehatan RI. 2017. Pedoman Survei Entomologi Demam Berdarah Dengue dan Kunci Identifikasi Nyamuk Aedes. *Kementrian Kesehatan RI*. Jakarta.
- Kementerian Kesehatan RI. 2018. Situasi Penyakit Demam Berdarah di Indonesia 2017. *Journal of Vector Ecology*. 31(1): 71–78.

- Kementrian Kesehatan RI. 2019. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2019. *Kementrian Kesehatan RI*. Jakarta.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., & Proksch, P. 2010. Methods for Isolation of Marine-derived Endophytic Fungi and their Bioactive Secondary Products. *Nature Protocols*. 5(3): 479–490.
- Kopustinskiene, D. M., Jakstas, V., Savickas, A., & Bernatoniene, J. 2020. Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*. 12(2): 1–25.
- Kuenzer, C., Bluemel, A., Gebhardt, S., Quoc, T. V., & Dech, S. 2013. Remote Sensing of Mangrove Ecosystems. *Remote Sensing*. 3(5): 878–928.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., & Jiang, C. 2016. *Morphological Identification of Actinobacteria*. In *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*. Intech. China.
- Liu, X., Cao, A., Yan, D., Ouyang, C., Wang, Q., & Li, Y. 2019. Overview of Mechanisms and uses of Biopesticides. *International Journal of Pest Management*. 67(1): 65–72.
- Lizardi-Jime'nez, M. A., & Herna'ndez-Marti'nez, R. 2017. Solid State Fermentation (SSF): Diversity of Applications to Valorize Waste and Biomass. *Springer*. 44(7): 1–9.
- Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I. 2017. *Terpenoids*. Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategy. Belanda.
- Maulana, S., Fadli, A., & Drastinawati. 2017. Kinetika Reaksi Demineralisasi Isolasi Kitin dari Cangkang Ebi. *Jom Fteknik*. 4(2): 1–5.
- Meesaragandla, B., Sarkar, D., & Mahalingam, V. 2019. Methylene Blue-Loaded Upconverting Hydrogel Nanocomposite: Potential Material for Near-Infrared Light-Triggered Photodynamic Therapy Application. *ACS Omega*. 4(16): 3169–3177.

- Melanie, Mia, M.R., Inriyani, S.S., & Hikmat, K. 2018. Effectiveness of Storage Time Formulation of *Bacillus thuringiensis* Against *Aedes aegypti* Larvae (Linnaeus, 1757). *Jurnal Cropsaver*. 1(1) :48-52.
- Mikolaszek, BarbaraMarzena Jamrógiewicz, M., Mojsiewicz-Pieńkowska, K., & Sznitowska, M. 2022. Microscopic and Spectroscopic Imaging and Thermal Analysis of Acrylates, Silicones and Active Pharmaceutical Ingredients in Adhesive Transdermal Patches. *Polymers*. 14(2888): 1–26.
- Mohamed, M. A., Jaafar, J., Ismail, A. F., Othman, M. H. D., & Rahman, M. A. 2017. *Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. In Membrane Characterization*. Universitas Teknologi Malaysia. Malaysia.
- Moqejwa, T., Marimuthu, T., & Choonara, Y. E. (2022). Development of Stable Nano-Sized Transfersomes as a Rectal Colloid for Enhanced Delivery of Cannabidiol. *Pharmaceutics Article*. 14(703): 1–18.
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. 2019. Applications of Chitosan in Food, Pharmaceuticals, Medicine, Cosmetics, Agriculture, Textiles, Pulp and Paper, Biotechnology, and Environmental Chemistry. *Environmental Chemistry Letters*. 17(4): 1667–1692.
- Moser, S., & Pichler, H. 2019. Identifying and Engineering the Ideal Microbial Terpenoid Production Host. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(14): 5501–5516.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. 2014. Impact of Endophytic Microorganisms on Plants, Environment and Humans. *Scientific World Journal*. 5(3): 1-11.
- Nguyen, T. T. H., Lam, K. P., Pham, T. N. K., & Nguyen, P. K. P. 2019. A new flavonoid from leaves of *Avicennia officinalis* L. *Pharmaceutical Sciences Asia*. 46(1): 19–24.
- Novitasari, A.E. dan D.Z. Putri. 2016. Isolasi dan identifikasi Saponin pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa dengan Ekstraksi Maserasi. *Jurnal Sains*. 6(12):10-14.
- Ntabo, R. M., Nyamache, A. K., Lwande, W., Kabii, J., & Nonoh, J. 2018. Enzymatic Activity of Endophytic Bacterial Isolates from Selected

Mangrove Plants in Kenya. *The Open Microbiology Journal*. 12(1): 354–363.

Oyatogun, G. M., Esan, T. A., Akpan, E. I., Adeosun, S. O., Popoola, A. P. I., Imasogie, B. I., Soboyejo, W. O., Afonja, A. A., Ibitoye, S. A., Abere, V. D., Oyatogun, A. O., Oluwasegun, K. M., Akinwole, I. E., & Akinluwade, K. J. 2020. *Chitin, Chitosan, Marine to Market In Handbook of Chitin and Chitosan*. Elsevier. Belanda.

Palanichamy, P., Krishnamoorthy, G., Kannan, S., & Marudhamuthu, M. 2018. Bioactive Potential of Secondary Metabolites Derived from Medicinal Plant Endophytes. *Egyptian journal of Basic and Applied Sciences*. 5(1): 303-312.

Prakashamani, G., Srivani, A., & Mohan, G. K. 2019. A Review on *Avicennia officinalis*. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences-IJPBS TM*. 9(1): 553-557.

Pratiwi, E. 2010. *Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi Dan Reperkolasi Dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambiloto (Andrographis paniculata Nee)*. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Putri, W. S., Warditiani, N. K., & Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2(4): 56–59.

Ranganathan, N., & Mahalingam, G. 2018. Secondary Metabolite as Therapeutic Agent from Endophytic Fungi *Alternaria longipes* Strain VITN14G of Mangrove Plant *Avicennia officinalis*. *Journal of Cellular Biochemistry*. 120(3): 4021–4031.

Rajesh, K., Dhanasekaran, D., & Tyagi, B. K. 2015. Mosquito Survey and Larvicidal Activity of Actinobacterial Isolates Against *Culex* Larvae (*Diptera: Culicidae*). *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*. 14(2): 116–122.

Rasweefali, M. K., Sabu, S., Azad, K. S. M., Rahman, M. K. R., Sunooj, K. V, Sasidharan, A., & Anoop, K. K. 2022. Advances in Biomarker Sciences and Technology Influence of Deproteinization and Demineralization

Process Sequences on the Physicochemical and Structural Characteristics of Chitin Isolated from Deep-sea Mud Shrimp (*Solenocera hextii*). *Advances in Biomarker Sciences and Technology*. 4(1): 12–27.

- Rizk, M., Attia, A. K., Mohamed, H. Y., & Elshahed, M. S. 2020. Thermo Analytical Study and Purity Determination of Anti-diabetic Drugs Linagliptin and Empagliflozin in Drug Substances Thermo Analytical Study and Purity Determination of Anti-diabetic Drugs Linagliptin and Empagliflozin in Drug Substances. *Chemistry Research Journal*. 5(4): 6–20.
- Rochmat, A., Adiati, M. F., & Bahiyah, Z. 2016. Pengembangan Biolarvasida Jentik Nyamuk *Aedes aegypti* Berbahan Aktif Ekstrak Beluntas (*Pluchea indica* Less.). *Reaktor*. 16(3): 103–108.
- Ruiu, L. 2018. Microbial Biopesticides in Agroecosystems. *Agronomy*. 8(11): 1–12.
- Saeed, A., Mehfooz, H., Larik, F. A., Faisal, M., & Channar, P. A. 2017. Applications of Lawesson's Reagent in the Synthesis of Naturally Occurring Steroids and Terpenoids. *Journal of Asian Natural Products Research*. 19(11): 1114–1123.
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., & Hendri, J. 2021. Fermentation Shrimp Shell Waste In Solid State Using *Pseudonocardia Carboxydivorans* 18A1301 To Produce Bioactive Metabolites. *Fermentation MDPI*. 7(4): 1–10.
- Shinde, L., Goyal, M., Bayas, R., & Patil, S. 2018. Review on Potential Eco-friendly Biolarvicides against Dengue Vector: *Aedes aegypti* (Linn) (Diptera: Culicidae). *International Journal of Life Sciences Research*. 6(3): 61–80.
- Sidik, F., Kadarisman, H. P., & Widagti, N. 2018. *Buku panduan mangrove Estuari Perancak*. Balai Riset dan Observasi Laut. Bali.
- Silver, J. 2020. Let Us Teach Proper Thin Layer Chromatography Technique. *Journal of Chemical Education*. 97(12): 4217–4219.

- Singh, B.P. 2019. *Advances in Endophytic Fungal research*. Springer. Switzerland.
- Singha, S., & Chandra, G. 2020. Control of JE Vector by Organic Compounds Isolated and Green Nanoparticles Synthesised from Leaf Extract of *Holoptelea integrifolia* (Roxb .). *Research Square*. 3(1): 1–22.
- Soccol, C. R., Costa, E. S. F. da, Letti, L. A. J., Karp, S. G., Woiciechowski, A. L., & Vandenberghe, L. P. de S. 2017. Recent Developments and Innovations in Solid State Fermentation. *Biotechnology Research and Innovation*. 1(1): 52–71.
- Sonawane, H. B., Borde, M. Y., Nikalje, G. C., Terkar, A., & Math, S. K. 2020. HR-LC-MS Based Metabolic Profiling of *Fusarium Solani* a Fungal Endophyte Associated with *Avicennia officinalis*. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*. 10(1): 262–273.
- Sridhar KR. 2004. *Mangrove Fungi in India*. Current Science. India.
- Suharto, M.A.P., H.J. Edy dan J.M. Dumanauw. 2016. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.). *Jurnal Sains*. 3(1): 86-92.
- Sulistyo, D. A., Muflikhah, N. D., & Aditya, R. H. 2018. Uji Larvasida Ekstrak Daun Oregano terhadap Larva *Aedes Aegypti*. *Prosiding Seminar Nasional Sains, Teknologi dan Analisis*. 1(1): 64–67.
- Susanti, S., & Suharyo, S. 2017. Hubungan Lingkungan Fisik dengan Keberadaan Jentik *Aedes* pada Area Bervegetasi Pohon Pisang. *Unnes Journal of Public Health*. 6(4): 271–276.
- Tetti, Mukhriani. 2014. Eksmukhtraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal kesehatan*. 7(2): 361-367.
- Thatoi, H., Behera, B. C., & Mishra, R. R. 2013. Ecological Role and Biotechnological Potential of Mangrove Fungi: A review. *Mycology*. 4(1): 54–71.

- Valentin Bhimba, B., Meenupriya, J., Joel, E. L., Naveena, D. E., Kumar, S., & Thangaraj, M. 2010. Antibacterial Activity and Characterization of Secondary Metabolites Isolated from Mangrove Plant *Avicennia officinalis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 3(7): 544–546.
- Wang, W. H., Urbina, A. N., Chang, M. R., Assavalapsakul, W., Lu, P. L., Chen, Y. H., & Wang, S. F. 2020. Dengue Hemorrhagic Fever a Systemic Literature Review of Current Perspectives on Pathogenesis, Prevention and Control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 53(6): 963–978.
- Want, E. J. 2018. LC-MS Untargeted Analysis. *Methods in Molecular Biology*. 17(38): 99–116.
- Younes, I., & Marguerite, R. 2015. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources: Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*. 13(3): 1133–1174.
- Yulidar, Y., & Wilya, V. 2015. Siklus Hidup *Aedes Aegypti* Pada Skala Laboratorium. *Sel*. 2(1): 22–28.
- Yuliusman & Adelina, P. W. 2010. Pemanfaatan Kitosan Dari Cangkang Rajungan Pada Proses Adsorpsi Logam Nikel Dari Larutan NiSO₄. *Seminar Rekayasa Kimia Dan Proses*. 3(27): 1–7.
- Zhang, J., & Hu, B. 2013. Liquid-Liquid Extraction (LLE). *Separation and Purification Technologies in Biorefineries*. 2(1): 61–78.
- Zhang, M., Liu, J. M., Zhao, J. L., Li, N., Chen, R. D., Xie, K. B., Zhang, W. J., Feng, K. P., Yan, Z., Wang, N., & Dai, J. G. 2016. Two New Diterpenoids from the Endophytic Fungus *Trichoderma* sp. Xy24 Isolated from Mangrove Plant *Xylocarpus granatum*. *Chinese Chemical Letters*. 27(6): 957–960.