

**IDENTIFIKASI ISOLAT JAMUR ENDOFIT AKAR *MANGROVE*
Avicennia sp. DARI PERAIRAN LAMPUNG YANG MEMILIKI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN
Aeromonas hydrophila (Chester, 1901)**

Skripsi

Oleh

**Muhammad Bagus Michael Nursyahid
NPM 1714221021**



**PROGRAM STUDI ILMU KELAUTAN
JURUSAN PERIKANAN DAN KELAUTAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
2022**

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF *MANGROVE Avicennia sp.* ENDOPHYTIC FUNGUS FROM LAMPUNG WATERS THAT HAVE ANTIBACTERIAL ACTIVITY AGAINST PATHOGEN BACTERIA *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901)

BY

MUHAMMAD BAGUS MICHAEL NURSYAHID

Aeromonas hydrophila is a pathogen that can cause mass death in various types of freshwater fish such as catfish, cyprinidae, cichlidae, rainbow trout, salmonidae, frogs, snails, and shrimp. The disease occur in a short time, which is around 1-2 weeks. Due to the harmful effects caused by infection from *A. hydrophila* bacteria, the research in antibacterial compounds from mangrove endosymbiont microbes can be a solution because these microbes can produce secondary metabolites as antibacterial compounds. The purpose of this study was to obtain isolates of endophytic fungi from the roots of the mangrove *Avicennia sp.* which had inhibitory activity against *A. hydrophila* bacteria. The endophytic fungi samples were derived from the roots of *Avicennia alba* and then isolated on malt extract agar media. The selected fungi then scaled up for extraction using the maceration method with semi polar ethyl acetate solvent. The fungi extract were used to test the inhibitory zone using the *Kirby-Bauer* method. The results obtained 5 fungal isolates that had inhibitory activity against *Aeromonas hydrophila* bacteria, which consisted of isolates WB-A02, WB-A05, WB-A06, PJ-A01 and PJ-A02. Isolate WB-A05 had the biggest inhibitory zone against *A. hydrophila*. The molecular identification showed that the isolate WB-A05 had similarity 96,59% to *Tritirachium oryzae* strain NTOU 4172.

Keywords : *Avicennia sp.*, *A. hydrophila*, endophytic fungi, identification.

ABSTRAK

IDENTIFIKASI ISOLAT JAMUR ENDOFIT AKAR *MANGROVE* *Avicennia* sp. DARI PERAIRAN LAMPUNG YANG MEMILIKI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901)

Oleh

Muhammad Bagus Michael Nursyahid

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri patogen yang dapat menyebabkan kematian massal pada berbagai jenis ikan air tawar seperti lele, cyprinidae, cichlidae, rainbow trout, salmonidae, katak, siput, dan udang. Penyakit ini terjadi dalam waktu singkat, yaitu sekitar 1-2 minggu. Efek merugikan yang ditimbulkan oleh infeksi bakteri *A. hydrophila* membuat penelitian senyawa antibakteri dari mikroba endosimbion mangrove dapat menjadi solusi karena mikroba tersebut dapat menghasilkan metabolit sekunder sebagai senyawa antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendapatkan isolat fungi endofit dari akar mangrove *Avicennia* sp. yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *A. hydrophila*. Sampel jamur endofit berasal dari akar *Avicennia alba* kemudian diisolasi pada media *Malt Extract Agar*. Isolat terpilih kemudian diperbanyak untuk ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etil asetat semi polar. Ekstrak jamur digunakan untuk menguji zona hambat menggunakan metode *Kirby-Bauer*. Hasil penelitian diperoleh 5 isolat jamur yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*, yang terdiri dari isolat WB-A02, WB-A05, WB-A06, PJ-A01 dan PJ-A02. Isolat WB-A05 memiliki zona hambat terbesar terhadap *A. hydrophila*. Identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat WB-A05 memiliki kemiripan sekitar 96,59% dengan *Tritirachium oryzae* strain NTOU 4172.

Kata kunci : *Avicennia* sp., *Aeromonas hydrophila*, jamur endofit, identifikasi.

**IDENTIFIKASI ISOLAT JAMUR ENDOFIT AKAR *MANGROVE*
Avicennia sp. DARI PERAIRAN LAMPUNG YANG MEMILIKI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN
Aeromonas hydrophila (Chester, 1901)**

Oleh

Muhammad Bagus Michael Nursyahid

Skripsi

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

Pada

**Jurusan Perikanan dan Kelautan
Fakultas Pertanian Universitas Lampung**



**FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2022**

Judul Penelitian

: **IDENTIFIKASI ISOLAT JAMUR ENDOFIT
AKAR *MANGROVE Avicennia* sp. DARI
PERAIRAN LAMPUNG YANG MEMILIKI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
BAKTERI PATOGEN *Aeromonas hydrophila*
(Chester, 1901)**

Nama Lengkap

: **Muhammad Bagus Michael Nursyahid**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **1714221021**

Program Studi

: **Ilmu Kelautan**

Jurusan

: **Perikanan dan Kelautan**

Fakultas

: **Pertanian**



Menyetujui,

1. Komisi Pembimbing

~~**Dr. Indra Gumay Yudha S. Pi., M. Si.**~~

~~NIP 19700185 199903 1 001~~

Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.

NIP 19881001 201903 2 014

2. Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan

~~**Dr. Indra Gumay Yudha, S. Pi., M. Si.**~~

~~NIP 19700185 199903 1 001~~

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Dr. Indra Gumay Yudha, S.Pi., M.Si.**

Sekretaris : **Oktora Susanti, S.Pi., M.Si.**

Anggota : **Eko Efendi, S.T., M.Si.**

2. Dekan Fakultas Pertanian



Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa, M. Si.
NIP. 19611020 198603 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **8 Februari 2022**

PERNYATAAN KEASLIAN KARYA

Saya yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Muhammad Bagus Michael Nursyahid

NPM : 1714221021

Judul Skripsi : Identifikasi Isolat Jamur Endofit Akar *Mangrove Avicennia* sp. dari Peraran Lampung yang Memiliki Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901)

Menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini adalah murni hasil karya saya sendiri berdasarkan pengetahuan dan data yang saya dapatkan. Karya ini belum pernah dipublikasikan sebelumnya dan bukan plagiat dari karya orang lain. Demikian pernyataan ini saya buat, apabila di kemudian hari terbukti terdapat kecurangan dalam pembuatan karya ini, maka saya siap mempertanggungjawabkannya.

Bandar Lampung, 16 Januari 2023



Muhammad Bagus Michael Nursyahid
NPM 1714221021

RIWAYAT HIDUP



Penulis lahir di Kota Bekasi, Jawa Barat pada tanggal 7 Maret 1999, dari Bapak Mohammad Fahrurizal Farid Ansori Nazib dan Ibu Fri Herlina. Penulis merupakan anak ketiga dari empat bersaudara. Penulis menempuh pendidikan formal sebagai berikut; Taman Kanak-Kanak Bhakti Pertiwi (2003-2004), SDN Kranji 1 (2005-2011), SMPN 4 Bekasi (2011-2014), dan SMAN 2 Bekasi (2014-2017). Penulis kemudian melanjutkan pendidikan ke jenjang Perguruan Tinggi di Program Studi Ilmu Kelautan, Jurusan Perikanan dan Kelautan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada tahun 2017.

Selama perkuliahan penulis aktif sebagai anggota organisasi Karya Salemba Empat (KSE) pada periode 2018-2020. Penulis menjadi asisten dosen salah satu mata kuliah yaitu Ekologi Perairan. Dalam perlombaan Program Kreativitas Mahasiswa Riset (PKM-R) pada tahun 2020 penulis berhasil lolos seleksi pendanaan dengan judul “Agen Pendegradasi Mikroplastik dari Mikroba Endofit Mangrove *Avicennia marina*”. Penulis mengikuti Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Sribandung, Kecamatan Abung Tengah, Kabupaten Lampung Utara, Provinsi Lampung. Penulis juga telah melaksanakan Praktik Umum di Laboratorium Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung dengan judul “Bioaktivitas Fungi Endosimbion *Mangrove Avicennia* sp. terhadap Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila*”.

PERSEMBAHAN

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillah, puji syukur penulis ucapkan ke hadirat Allah Subhanahu wa ta'ala, karena atas rahmat dan hidayah-Nya serta kemudahan yang Engkau berikan akhirnya skripsi ini dapat terselesaikan.

Kupersembahkan karya ini kepada orang yang sangat kusayangi dan kukasihi

Ibunda dan Ayahanda Tercinta

Sebagai tanda bukti dan rasa terima kasih tiada terhingga kupersembahkan karya sederhana dan imbuhan kecil di belakang namaku kepada Ibu Fri Herlina dan Bapak Mohammad Fahrurizal Farid Ansori Nazib yang telah memberikan kasih sayang, dukungan, ridho, dan cinta kasih yang tiada terhingga. Semoga ini menjadi langkah awal untuk membuat Bunda dan Ayah bahagia, karena kusadar selama ini belum bisa berbuat lebih untuk membahagiakan kalian.

Kakak-adikku dan Orang terdekatku

Sebagai tanda terima kasih, kupersembahkan karya ini untuk kakak-adikku tersayang, Kakak Indah Gabriella Nursyahida dan Adik Ayu Frihatini Nursyahida, serta keluarga besar Nahrawi dan Catem.

Teman-teman

Kepada teman-teman seperjuangan Jurusan Perikanan dan Kelautan 2017, khususnya Program Studi Ilmu Kelautan 2017, yang sangat kusayangi serta teman-teman semua yang tak dapat kusebutkan namanya satu per satu yang telah memberikan motivasi, nasihat dukungan moral dan material.

MOTTO HIDUP

“Let us not forget that human knowledge and skills alone cannot lead humanity to a happy and dignified life.”

(Albert Einstein)

“Sebaik-baik manusia adalah yang paling bermanfaat bagi manusia”

(Hadits Riwayat Ahmad, ath-Thabrani, ad-Daruqutumi)

“Life is too short when you chasing everything. Life is not a race, enjoy every moment, no matter how messed your life and dont forget to keep making friends with everyone”

(Muhammad Bagus Michael Nursyahid)

SANWACANA

Segala puji bagi Allah SWT yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, yang telah melimpahkan segala kenikmatan-Nya sehingga penulis mampu menyusun skripsi yang berjudul “Identifikasi Isolat Jamur Endofit Akar *Mangrove Avicennia* sp. di Peraran Lampung yang Memiliki Aktivitas Antibakteri terhadap Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila*”. Sholawat dan salam tak lupa disanjungkan untuk Nabi besar yaitu Nabi Muhammad SAW yang telah menyampaikan petunjuk syariaah agama yang merupakan suatu karunia besar dan sempurna bagi seluruh alam semesta

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapat dukungan, bimbingan, serta bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan kali ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Irwan Sukri Banuwa selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Lampung.
2. Dr. Indra Gumay Yudha, S. Pi., M. Si. selaku Ketua Jurusan Perikanan dan Kelautan sekaligus Dosen Pembimbing I yang telah memberi arahan serta bimbingan dalam proses penulisan skripsi
3. Eko Effendi, S.T., M.Si. selaku Dosen Pembahas/Penguji.
4. Oktora Susanti, S.Pi., M.Si selaku Dosen Pembimbing II yang telah membantu memberi arahan dan bimbingan dalam melaksanakan kegiatan tersebut.
5. Dr. Hengky Mayaguezz, S. Pi., M. T. selaku Ketua Program Studi Ilmu Kelautan yang selalu memberikan bimbingan untuk segala macam kegiatan perkuliahan termasuk kegiatan penelitian yang telah dilaksanakan.
6. Ayah, Ibu, dan keluarga besar yang telah mendoakan dan memberi semangat pantang menyerah, serta memberikan dukungan penuh.

7. Teman-teman angkatan 2017 yang selalu memberi dukungan dan masukan dalam setiap kegiatan kuliah selama ini.

Dengan adanya penelitian ini penulis berharap dapat membantu dan memberi informasi kepada mahasiswa lain dan juga masyarakat. Semoga segala bimbingan, arahan dan dukungan baik moril maupun materil yang telah diberikan kepada penulis akan mendapatkan balasan dari Allah Subhanahu wa ta'ala. Aamiin.

Bandar Lampung, 10 Agustus 2022

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'DAGUS H' with a stylized flourish.

Muhammad Bagus Michael Nursyahid

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN	i
SANWACANA	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR GAMBAR	x
I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	2
1.3 Manfaat Penelitian	2
1.4 Kerangka Pikir	2
II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Klasifikasi <i>Mangrove</i>	5
2.2 Karakteristik Biologi dan Habitat <i>Mangrove</i>	6
2.3 Mikroba Endosimbion <i>Mangrove</i>	7
2.4 Potensi Senyawa Antibakteri	7
2.5 Bakteri Patogen <i>Aeromonas hydrophila</i>	9
2.6 Identifikasi Molekuler Fungi Endofit	10
III. METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat	13
3.2 Alat dan Bahan.....	15
3.3 Metode Pelaksanaan Penelitian.....	17
3.3.1 Prosedur Penelitian	17
3.3.1 Pengambilan Sampel.....	17
3.3.2 Identifikasi <i>Mangrove</i>	18
3.3.3 Sterilisasi	18
3.3.4 Pembuatan Media.....	18
3.3.5 Isolasi Jamur	18
3.3.6 Pemurnian Jamur Endofit	19
3.3.7 Uji Antagonisme Terhadap Bakteri Patogen <i>A. hydrophila</i>	19
3.3.8 Uji Ekstrak Jamur Potensial.....	19

3.3.9 Screening Aktivitas Antibakteri.....	20
3.3.10 Identifikasi Molekuler.....	21
3.3.10.1 Eksraksi DNA Jamur	22
3.3.10.2 Amplifikasi PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)	23
3.3.10.3 Elektroforesis	23
3.3.10.4 Purifikasi dan Sekuensing.....	23
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Identifikasi Jenis <i>Mangrove</i>	24
4.2 Inventarisasi Isolat Jamur.....	25
4.3 Uji Antagonis Jamur Endofit	27
4.4 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jamur Endofit.....	28
4.5 Identifikasi Molekuler Jamur Endofit <i>Mangrove</i> Potensial	28
V. PENUTUP	
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran.....	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	43

DAFTAR TABEL

Tabel

1. Alat-alat yang digunakan	15
2. Bahan yang digunakan	16
3. Komposisi pembuatan media	18
4. Kategori penghambatan bakteri	21
5. Data isolat jamur endofit akar mangrove dari perairan Way Belau dan Pagar Jaya	25
6. Data morfologi isolat jamur	26
7. Uji antagonisme terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i>	27
8. Uji ekstrak jamur terhadap <i>Aeromonas hydrophila</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar

1. Kerangka pikir penelitian	4
2. Diagram alir metode penelitian	17
3. Bagian mangrove	24
4. Hasil elektroforesis DNA divisualisasi dengan UV-transluminator	29
5. Pasang basa isolat WB-A05	29
6. Hasil sekuensing isolat menggunakan BLAST	30
7. Pohon filogenik isolat	30
8. Bentuk <i>Tritirachium oryzae</i>	32

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Mangrove merupakan kelompok tumbuhan yang sangat dipengaruhi salinitas air laut. Mangrove dapat bertahan hidup dengan salinitas yang tinggi karena dilengkapi berbagai macam organ khusus untuk menyesuaikan diri dengan salinitas lingkungannya. Di dalam tubuh mangrove hidup berbagai mikroorganisme yang berasosiasi sehingga menunjang kemampuannya untuk bertahan hidup. Mikroorganisme tersebut antara lain bakteri, kapang, dan fungi yang biasa hidup sebagai endosimbion. Endosimbion mangrove dapat menghasilkan senyawa antibakteri dalam bentuk metabolit sekunder sehingga pohon mangrove dapat bertahan dari serangan bakteri, jamur dan hama (Taechowisan *et al.*, 2005).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu bakteri yang sangat umum dijumpai dalam suatu ekosistem perairan sebagai mikroflora normal. Bakteri *A. hydrophila* akan sangat mematikan ketika populasinya berlebihan karena dapat menimbulkan wabah penyakit ikan. Menurut Noga (2000), bakteri *A. hydrophila* dapat menginfeksi banyak jenis ikan air tawar seperti *catfish*, *cyprinidae*, *cichlidae*, *rainbow trout*, *salmonidae*, katak, siput, dan udang air dengan tingkat kematian berkisar 80-100 %. Wabah penyakit tersebut terjadi dalam waktu yang singkat yaitu berkisar 1-2 minggu (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011). Bakteri ini memproduksi toksin berupa *cytotoxin*, *protease*, *s-layers*, dan *aerolysin* sehingga menyebabkan tingkat kematian yang tinggi (Kusdawarti *et al.*, 2019).

Oleh karena tingginya tingkat kematian yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, pencarian senyawa antibakteri dari mangrove dapat menjadi suatu solusi karena mangrove diketahui mempunyai senyawa aktif antibakteri yang dihasilkan dari mikroba endosimbion (Ramadan *et al.*, 2018). Mikroba

endosymbion seperti jamur endofit dapat diuji lebih lanjut terhadap bakteri patogen *A. hydrophila* dengan melakukan uji antagonis. Dari uji antagonis dapat diketahui seberapa potensial jamur endofit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* berdasarkan diameter zona hambat yang dihasilkan. Semakin luas zona hambat maka semakin potensial dalam menghambat bakteri penyebab infeksi yaitu *A. hydrophila*.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini yaitu ;

1. Skrining jamur endofit mangrove *Avicennia* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*
2. Memperoleh besaran kemampuan daya hambat isolat jamur potensial terhadap bakteri *A. hydrophila*
3. Identifikasi molekuler isolat jamur endofit mangrove yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian yaitu memberikan informasi berupa identifikasi spesies dari isolat jamur endofit mangrove *Avicennia* sp. yang memiliki bioaktivitas terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*.

1.4 Kerangka Pikir

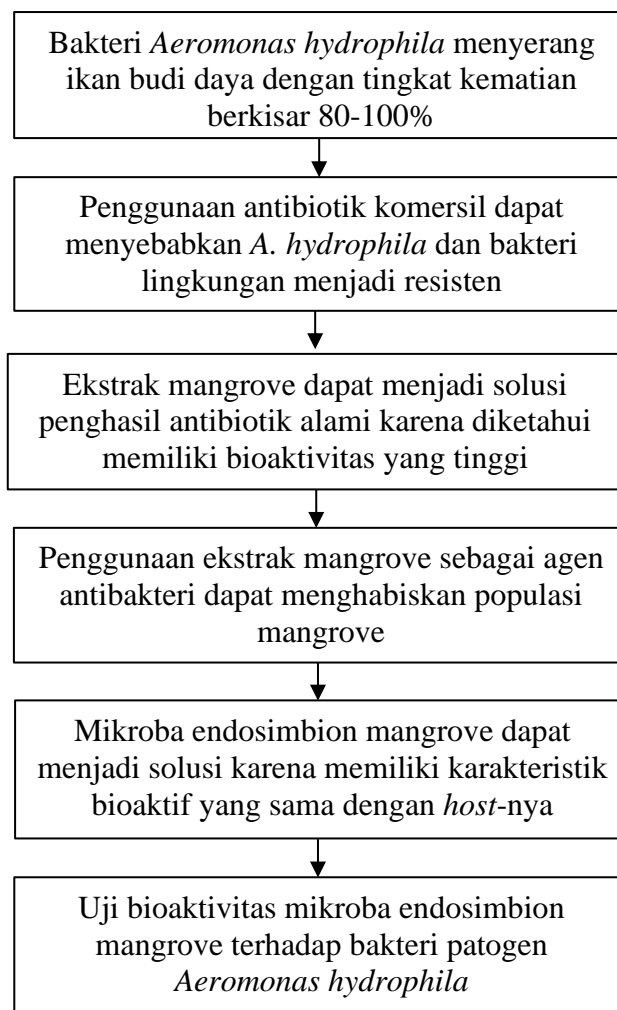
Bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* dapat menyerang ikan dan menimbulkan kerugian yang besar karena bakteri tersebut dapat mematikan populasi ikan budi daya secara massal dengan tingkat *mortality rate* berkisar 80-100 %. Pencegahan infeksi *A. hydrophila* sebenarnya sudah banyak dilakukan oleh para pembudi daya ikan dengan pemberian antibiotik komersil yang mudah dijangkau, namun hal tersebut mengakibatkan dampak negatif, yaitu menjadikan bakteri *A. hydrophila* dan bakteri-bakteri di lingkungan menjadi resisten terhadap antibiotik. Dalam hal ini dibutuhkan penggunaan antibakteri lain yang bersifat alami, efektif untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri, ramah lingkungan dan mudah terurai di perairan.

Salah satu sumber untuk mendapat antibakteri alami yang memiliki kriteria seperti alami, efektif dan mudah terurai di perairan yaitu mangrove. Mangrove sangat potensial untuk diteliti karena memiliki metabolit sekunder yang kaya akan bioaktivitas. Namun demikian, mengandalkan penggunaan mangrove sebagai kandidat pembuatan produk antibakteri dalam jangka panjang dapat menghabiskan populasi mangrove karena pembuatan antibakteri dari mangrove membutuhkan ekstrak simplisia kering dalam jumlah yang sangat banyak sehingga dapat menimbulkan masalah pada ketersediaan lahan mangrove sebagai daerah konservasi yang wajib dilindungi.

Telah ditelitinya aktivitas mikroba endosimbion mangrove memberi gambaran bahwa mikroba endosimbion mangrove memiliki karakteristik bioaktif yang sama dengan mangrove sehingga pembuatan antibakteri alami dapat dilakukan dengan menggunakan senyawa aktif mikroba endosimbion mangrove. Hal tersebut mendorong penelitian-penelitian mengenai bioaktivitas mikroba endosimbion mangrove semakin banyak dilakukan. Walaupun demikian, topik penelitian mengenai bioaktivitas jamur endosimbion mangrove terhadap bakteri patogen *A. hydrophila* belum banyak diteliti sebelumnya. Oleh karena itu, penelitian mengenai uji bioaktivitas dan identifikasi molekuler jamur endofit mangrove dapat menjadi solusi dalam pencarian kandidat sumber antibakteri *A. hydrophila* terbaru.

Isolasi jamur endofit mangrove adalah langkah pertama untuk mendapatkan isolat jamur endofit mangrove yang dapat diuji terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Dalam proses isolasi akan didapatkan banyak jamur endofit dengan berbagai macam perbedaan morfologi. Jamur yang berbeda-beda tersebut dapat diinventarisasi untuk diuji antagonis terhadap *A. hydrophila*. Bioaktivitas yang dihasilkan jamur endofit tersebut juga dapat berbeda-beda sehingga dapat diketahui jamur endofit yang memiliki bioaktivitas yang paling tinggi. Jamur yang telah diisolasi kemudian dapat diuji antagonis dengan bakteri patogen *A. hydrophila* untuk menentukan isolat yang memiliki aktivitas antibakteri atau tidak memiliki aktivitas sama sekali. Isolat yang telah terbukti memiliki aktivitas dalam uji antagonisme kemudian dapat di-*scale up* atau perbanyak dalam media yang

lebih besar untuk dilakukan proses ekstraksi. Proses ekstraksi berguna untuk mendapatkan ekstrak senyawa aktif atau metabolit sekunder yang dihasilkan jamur dalam menghambat bakteri patogen. Ekstrak jamur kemudian digunakan dalam uji ekstrak menggunakan metode kertas cakram untuk menentukan apakah jamur memiliki aktivitas yang sama setelah diekstrak sehingga dapat menunjukkan jamur manakah yang memiliki aktivitas paling besar. Jamur yang memiliki aktivitas paling besar baik pada uji antagonis dan uji ekstrak kemudian diidentifikasi secara molekuler untuk mengetahui jenis spesiesnya.



Gambar 1. Kerangka pikir penelitian

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Klasifikasi Mangrove

Klasifikasi *Avicennia* sp. menurut Cronquist (1981) adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Sub Class	: Asteridae
Order	: Lamiales
Family	: Acanthaceae
Genus	: <i>Avicennia</i>
Species	: <i>Avicennia</i> sp.

2.2 Karakteristik Biologi dan Habitat Mangrove

Mangrove hidup di sepanjang tepi pantai yang terpengaruh pasang tertinggi hingga surut terendah atau dapat dikatakan mangrove dapat hidup bebas dari genangan air laut hingga terendam air laut. Daerah pantai yang mengalami dinamika pasang surut yang sesuai dengan kriteria habitat mangrove antara lain muara sungai, pantai yang terlindung, dan laguna. Habitat mangrove merupakan tempat yang bersalinitas sehingga tumbuhan mangrove memiliki toleransi yang tinggi terhadap salinitas air laut (Kusmana *et al.*, 2003).

Komunitas tumbuhan mangrove dapat menghasilkan biji yang bentuk bunganya mencolok. Biji mangrove umumnya lebih besar dibandingkan dengan biji tumbuhan lain dan dapat mengalami perkecambahan saat biji masih berada di induknya. Pada saat biji jatuh biasanya akan terapung di lautan dan menunggu substrat yang tepat untuk dapat tumbuh. Lamanya periode biji mangrove dapat terapung

bergantung pada jenisnya. Ada beberapa spesies yang bijinya dapat bertahan terapung hingga satu tahun (Noor *et al.*, 1999).

Menurut Chapman (1977) Sebagian besar mangrove tumbuh optimal pada substrat berlumpur seperti di daerah akumulasi endapan lumpur. Salah satu contohnya yaitu substrat berlumpur di Indonesia yang sangat baik untuk tegakkan *Rhizophora mucronata* dan *Avicennia marina*. Jenis mangrove *Avicennia* menjadi salah satu yang memiliki kemampuan toleransi salinitas yang luas dibandingkan dengan genus lainnya. *Avicennia marina* dapat tumbuh pada salinitas mulai dari mendekati tawar hingga 30 ‰. Pada salinitas sangat tinggi atau ekstrim, pohon mangrove *Avicennia marina* tumbuh kerdil dan kemampuan reproduksi berupa menghasilkan buah menjadi hilang (Macnae, 1966).

Tempat tumbuhnya mangrove terbagi menjadi 4 zona, yaitu zona *Avicennia*, zona *Rhizophora*, zona *Bruguiera*, dan zona nipah. Zona *Avicennia* merupakan zona yang terletak di luar hutan bakau, substratnya berlumpur, bertekstur lunak, dan mengandung sedikit humus (Badrudin, 1993). Daerah yang paling menjorok ke laut didominasi oleh hutan mangrove jenis *Avicennia* spp. yang memiliki tipe akar nafas.

Pemanfaatan berbagai jenis tumbuhan mangrove (terutama jenis pohon dari marga *Rhizophora*, *Bruguiera*, *Avicennia* dan *Sonneratia*) secara tradisional oleh masyarakat pesisir di Indonesia telah lama berlangsung sejak beberapa abad yang lalu. Pemanfaatan secara tradisional dari berbagai jenis tumbuhan mangrove tersebut merupakan pemanfaatan tingkat awal dari sumber daya mangrove berdasarkan pengetahuan lokal masyarakat yang sampai saat ini tidak terdokumentasikan secara baik. Khusus untuk jenis mangrove api-api atau *Avicennia* sp., masyarakat pesisir di Indonesia sudah sejak lama memanfaatkannya secara tradisional untuk memenuhi kebutuhan seperti obat-obatan, kayu bakar, konstruksi bangunan rumah, dan pakan ternak (Kusmana *et al.*, 2009).

Spesies mangrove yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis mangrove *Avicennia* sp. yang berasal di Pulau Pasaran dan Pantai Pagar Jaya. Bagian mangrove yang diambil untuk diteliti adalah bagian akar. Mangrove *Avicennia* sp.

dipilih sebagai mangrove yang diambil sampelnya karena di Pulau Pasaran dan Pantai Pagar Jaya mangrove tersebut paling banyak ditemui dan memiliki vegetasi yang lebih banyak dibandingkan dengan mangrove jenis lainnya.

2.3 Mikroba Endosimbion Mangrove

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup di dalam jaringan tumbuhan. Mikroba endofit mampu membentuk koloni dalam jaringan tumbuhan tanpa memberikan efek negatif pada inangnya. Penelitian yang dilakukan oleh Xiang (2007) membuktikan bahwa dalam satu tumbuhan dapat diisolasi lebih dari satu, bahkan puluhan jenis mikroba endofit. Masing-masing mikroba mempunyai potensi untuk memproduksi satu atau lebih senyawa bioaktif.

Organisme endofitik memiliki potensi yang sangat besar untuk dieksplorasi dan menghasilkan produk alami baru yang bermanfaat di bidang kedokteran, pertanian, dan industri. Sebagai gambaran, terdapat sekitar 300 ribu spesies tumbuhan tingkat tinggi di alam yang tersebar di bumi, masing-masing individu tumbuhan tersebut merupakan inang dari satu atau lebih mikroba endofit (Strobel *et al.*, 2004). Tumbuhan tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba, salah satunya yaitu jamur endofit. Mikroorganisme endofit di dalam bagian tanaman dapat terdiri dari bermacam mikroorganisme, salah satunya yang paling banyak diisolasi yaitu kapang. Penelitian dan eksploitasi kapang dapat bermanfaat untuk mengetahui potensi serta manfaat kapang bagi manusia (Ilyas, 2007).

Eksplorasi tentang isolasi jamur endofit dari tumbuhan akan bermanfaat untuk mencari jenis-jenis jamur endofit yang memiliki kemampuan spesifik dan unik. Berbagai jenis tumbuhan seperti tumbuhan tingkat tinggi yang banyak ditemui di darat ataupun di pantai dapat berpotensi sebagai sumber isolat jamur endofit. Jamur endofit dapat diisolasi dari jaringan akar, batang, dan daun (Noverita *et al.*, 2009). Jamur endofit dapat diisolasi dari bagian organ tumbuhan yang masih segar dan telah disterilkan permukaan (Agusta, 2009).

2.4 Potensi Senyawa Antibakteri

Mangrove merupakan tanaman yang hidup di tepi laut dan memiliki manfaat ekologi. Manfaat mangrove bagi ekologi yaitu sebagai tempat bernaung organisme

yang berasosiasi baik itu organisme yang bersimbiosis mutualisme ataupun komensalisme (Purnobasuki, 2004). Salah satu organisme yang bersimbiosis dengan tumbuhan mangrove adalah fungi endofit. Fungi tersebut hidup didalam jaringan tubuh mangrove yang berperan sebagai agen antibakteri alami. Dengan demikian bagian-bagian tubuh mangrove telah diketahui banyak mengandung antibakteri karena organisme endosimbion yang dapat mensintesis senyawa bioaktif (Prihanto, 2012).

Tumbuhan mangrove mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid, steroid, fenol hidrokuinon, dan tanin yang aktif sebagai bahan antimikroba. Menurut Naiborhu (2002) tumbuhan mangrove yakni berupa ekstrak kelopak dan buah dari *Sonneratia caseolaris* mampu membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyi*. Menurut Bachtiar (2010) menyatakan bahwa hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan mangrove jenis *Rhizophora* dan *Avicennia* yang ada di Kabupaten Ciamis mengandung senyawa flavonoid dan saponin.

Menurut Susilawati *et al.* (1992), pemanfaatan mikroba endofitik dalam memproduksi senyawa aktif memiliki beberapa kelebihan antara lain; lebih cepat menghasilkan dengan mutu yang seragam, dapat diproduksi dengan skala yang besar, kemungkinan diperoleh komponen bioaktif baru dengan memberikan kondisi berbeda. Beberapa tahun terakhir ini, penggalian sumber daya mikroba yang terdapat di dalam jaringan tumbuhan (mikroba endofitik) mulai banyak mendapat perhatian. Mikroba tersebut mulai dipelajari untuk berbagai tujuan, karena mikroba endofitik yang berasal dari tumbuhan tersebut masih banyak yang belum diketahui karakter dan potensinya, khususnya di Indonesia (Clay, 1988; Melliawati *et al.*, 2006).

Bakteri atau fungi dapat menghasilkan senyawa metabolit yang dapat berfungsi sebagai antibiotik (antifungi/antibakteri), antivirus, antikanker, anti-diabetes, antimalaria, antioksidan, antiimmunosupresif (Strobel dan Daisy, 2003), anti serangga (Azevedo *et al.*, 2000), zat pengatur pertumbuhan (Tan dan Zou, 2001) dan penghasil enzim-enzim hidrolitik seperti amilase, selulase, xilanase, ligninase (Choi *et al.*, 2005), dan kitinase (Zinniel *et al.*, 2002).

2.5 Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila*

Aeromonas hydrophila merupakan bakteri patogen yang terkenal menyebabkan kematian massal dalam budi daya perikanan. Bakteri *A. hydrophila* dikategorikan sebagai bakteri Gram negatif yang dapat menyerang ikan air tawar seperti ikan lele dengan menyebabkan penyakit *motile aeromonas septicemia* (MAS) (Sarkar dan Rashid, 2012). Penyakit tersebut menyerang beberapa organ dalam seperti hati, limpa, dan ginjal. Berdasarkan penelitian Laith dan Najiah (2013), bahwa 73,3% dari strain bakteri yang diisolasi dari ikan lele yang sakit adalah *Aeromonas hydrophila*, sehingga dapat disimpulkan bahwa serangan bakteri ini yang paling umum menyebabkan penyakit dalam budi daya ikan lele.

Bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* juga bersifat patogen oportunistik pada penyakit *hemoragic septicemia* atau disebut dengan penyakit bercak merah pada ikan berkondisi stress (Yogananth *et al.*, 2009). Bakteri ini diketahui sering kali menjadi penyebab infeksi sekunder (Richards dan Roberts, 1978; Tonguthai, 1985; Roberts *et al.*, 1993; Thune *et al.*, 1993). Kemampuan *A. hydrophila* dalam menimbulkan penyakit diketahui cukup tinggi dengan tingkat patogenisitas yang ditunjukkan dari LD₅₀ cukup bervariasi, yaitu berkisar antara 10⁴-10⁶ sel/ml (Saroni *et al.*, 1993). Kematian yang disebabkan bakteri tersebut berlangsung cukup singkat dengan mortality rate sebesar 80-100% (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011).

Bakteri *Aeromonas* sp. terdapat di mana-mana, seperti di tanah, di perairan tawar, di air PAM, dan juga merupakan bakteri flora normal di ikan (Thune *et al.*, 1993). Bakteri *Aeromonas hydrophila* paling banyak ditemukan di perairan yang mengandung bahan organik tinggi. Di samping itu, bakteri ini dapat tumbuh pada suhu 4-45°C, meskipun tumbuh lambat dan pertumbuhan optimumnya pada suhu 37°C (Farmer *et al.*, 2006).

Penelitian tentang bakteri *Aeromonas hydrophila* sudah banyak dilakukan dan bakteri tersebut diketahui dapat memproduksi endotoksin dan produk ekstraseluler seperti hemolisin α dan β , cytotoxin, enterotoksin, *protease* dan *leucocidin* (Allan dan Stevenson 1981; Lallier dan Daigneault 1984; Morgan *et al.*, 1985; Kanai dan Takagi, 1986; Thune *et al.*, 1986; Santos *et al.*, 1988). Galur bakteri

Aeromonas hydrophila yang diisolasi dari ikan sakit lebih bersifat virulen dibandingkan dengan isolat yang berasal dari perairan (de Figueiredo dan Plumb, 1977). Virulensi *Aeromonas hydrophila* juga tergantung pada interaksi *in vivo* dari endotoksin, permukaan antigen, dan produk ekstraseluler. Pertumbuhan bakteri yang cepat dan produksi ekstraseluler yang dihasilkannya adalah penyebab terjadinya gangguan fisiologis hingga kematian ikan yang terinfeksi (Brenden dan Huizinga, 1986).

Mekanisme patogenitas *A. hydrophila* belum banyak diketahui walaupun penelitian tentang toksin yang dihasilkannya sudah banyak dilakukan. Setidaknya telah ditemukan 6 toksin dari *strain* bakteri tersebut (Austin dan Austin, 1987). Bakteri *A. hydrophila* dapat memanfaatkan albumin, casein, fibrinogen, dan gelatine sebagai substrat protein maka dapat disimpulkan galur bakteri ini bersifat proteolitik (Shotts *et al.*, 1985), sehingga berpotensi besar sebagai patogen ikan. Menurut Nieto dan Ellis (1991), setidaknya ada empat atau mungkin lima macam enzim protease ekstraseluler dari *A. hydrophila*.

Sebagai perbandingan, beberapa bakteri golongan Gram negatif sebenarnya tidak mengeluarkan cairan racun, tetapi membuat endotoksin yang hanya bisa dilepaskan ketika sel mati atau pecah. Endotoksin adalah lipopolisakarida pada dinding sel bakteri. Walaupun demikian, bakteri juga menghasilkan enzim ekstraseluler yang dapat menyerang ikan sehat (Afrianto *et al.*, 2015).

2.6 Identifikasi Molekuler Jamur Endofit

Mengidentifikasi jamur dengan menentukan taksonominya biasanya didasarkan perbandingan morfologi yang paling menonjol (Lodge *et al.*, 1996; Sette *et al.*, 2006; Crous *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Menghubungkan persamaan morfologi jamur endofit yang diidentifikasi harus diperhatikan dengan baik karena karakteristik morfologi beberapa jamur bergantung pada medium dan kondisi kultur yang dapat memengaruhi kemampuan vegetatif dan kemampuan seksual (Zhang *et al.*, 2006; Hyde dan Soyong, 2007). Selanjutnya, metode identifikasi morfologi konvensional dengan cara pengamatan langsung sudah tidak dapat diterapkan lagi untuk mengidentifikasi isolat jamur karena saat kultur fase sporulasi

bisa tidak terjadi, sehingga jamur dapat dikategorikan sedang dalam fase *mycelia sterilia* (Lacap *et al.*, 2003).

Berbagai cara agar jamur tidak dalam fase *mycelia sterilia* dilakukan dengan mengubah kondisi pertumbuhan agar fase sporulasi bisa terjadi, seperti penggunaan media kultur yang berbeda yaitu *potato dextrose agar* (PDA), *malt extract agar* (MEA), *corn meal agar* (CMA), *potato carrot agar* (PCA), dan *water agar* (WA), serta dimasukkannya jaringan inang ke dalam kultur jamur (Guo *et al.*, 2000). Namun demikian, sejumlah cara tersebut masih belum berhasil untuk mengembalikan fase sporulasi jamur endofit. Kejadian *mycelia sterilia* ini sangat umum ditemukan pada penelitian endofit (Lacap *et al.*, 2003).

Sebaliknya, teknik identifikasi molekuler menunjukkan tingkat sensitivitas dan spesivitas yang tinggi untuk mengidentifikasi mikroorganisme dan dapat digunakan untuk mengklasifikasikan strain mikroba pada tingkat hierarki taksonomi yang beragam (Sette *et al.*, 2006). Beberapa penelitian terbaru telah menunjukkan bahwa metode identifikasi secara genetik ini berhasil digunakan dalam penelitian (Gao *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Arnold *et al.*, 2007; Ligrone *et al.*, 2007; Sánchez Márquez *et al.*, 2007; Morakotkarn *et al.*, 2007).

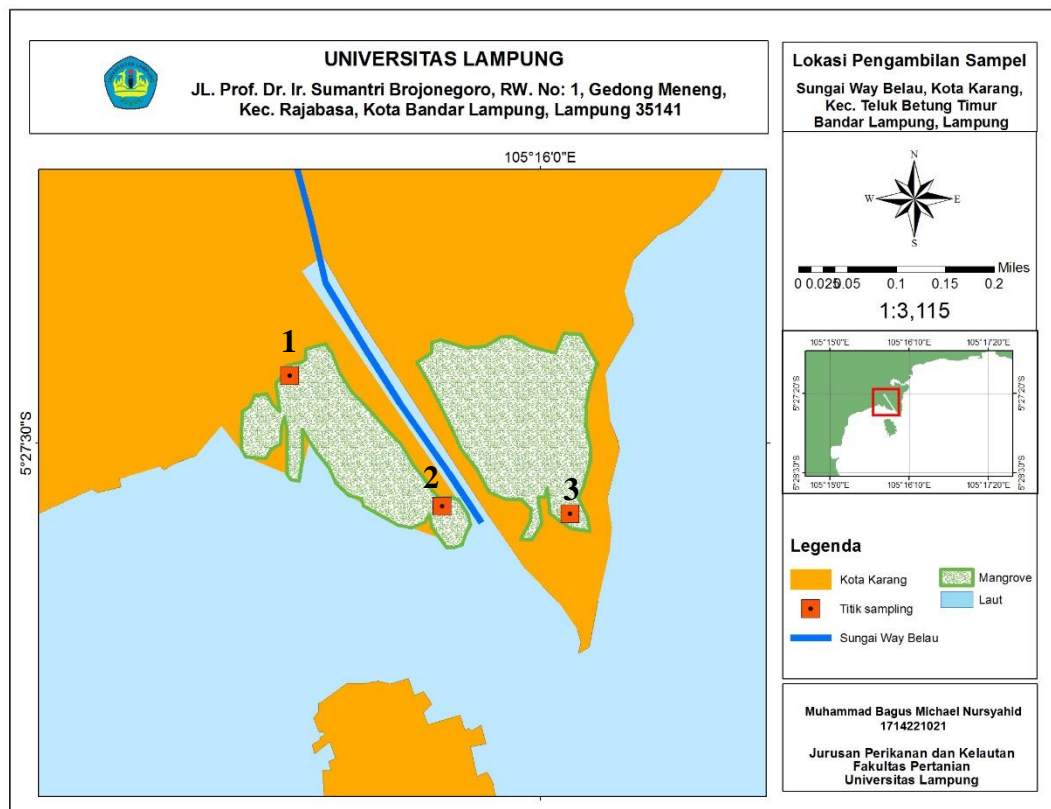
Sebagian besar jamur endofitik telah dideteksi dan diidentifikasi secara komparatif melalui analisis urutan DNA ribosom, terutama pada wilayah ITS (*internal transcribed spacer*). Sebagai contoh, Harney *et al.* (1997) mengidentifikasi cendawan mikoriza arbus-kula dari tumbuhan *Artemisia californica* menggunakan wilayah ITS. Guo *et al.* (2000) dan Lacap *et al.* (2003) mengevaluasi konsep morfotipe fungi endofit dalam fase *mycelia sterilia* juga dilakukan berdasarkan urutan DNA ribosom. Selain itu, keanekaragaman fungi endofit yang tinggi juga terungkap dari *Heterosmilax japonica* atau *Livistona chinensis* menggunakan pendekatan *cultivation independent* dengan menganalisis urutan DNA fungi yang diambil dari jaringan tanaman (Guo *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2005). Peintner *et al.* (2003), juga pertama kali mencatat ekto mikoriza spesies Cortinari dari India dan daerah tropis untuk menetapkan posisi filogenetiknya menggunakan urutan ITS.

Isolasi DNA dan amplifikasi PCR pada daerah ITS rDNA merupakan tahap awal yang perlu dilakukan dalam identifikasi molekuler jamur. Daerah *internal transcribed spacers* (ITS) merupakan daerah sekuens DNA yang tidak menyandikan protein fungsional dan berada di daerah RNA ribosom (rRNA). Daerah ini dapat digunakan sebagai penanda genetika karena memiliki variasi sekuens yang cukup tinggi bahkan dalam spesies yang sama, dan semua fungi memiliki ITS rDNA. Oleh karena itu, ITS banyak digunakan untuk analisis filogenetik, proses evolusi, dan penentuan identitas taksonomi (Purnamasari *et al.*, 2012). Sekuens DNA pada daerah ITS rDNA berevolusi lebih cepat dibandingkan dengan daerah gen lainnya sehingga akan bervariasi pada setiap spesies (White *et al.*, 1990). Hal ini akan mempermudah dalam identifikasi spesies dengan membandingkan tingkat kemiripan (homologi) sekuens DNA daerah ITS yang dimiliki suatu fungi dengan fungi lainnya.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

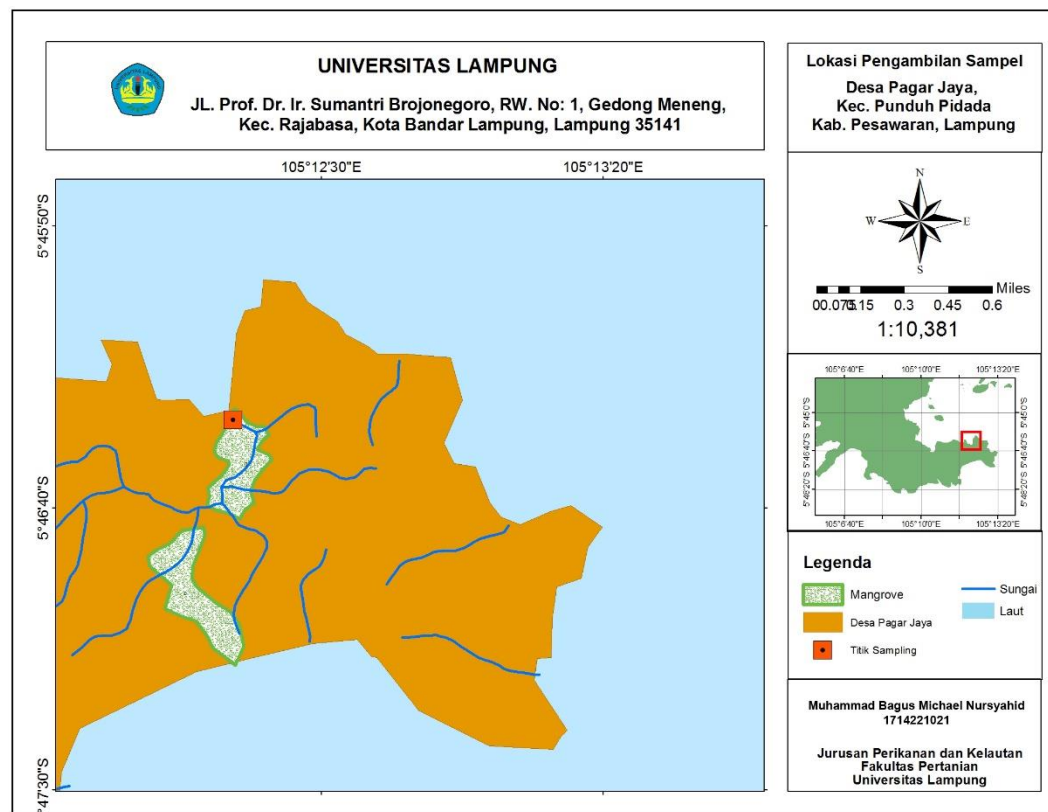
Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2020 sampai Maret 2021. Sampel diambil dari Pulau Pasaran, Kota Karang, Teluk Betung Timur, dan Pantai Pagar Jaya, Kecamatan Punduh Pidada, Kabupaten Pesawaran. Sampel diuji di Laboratorium Budidaya Perikanan, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.



Gambar 2. Peta perairan Way Belau

Di perairan Way Belau terdapat 3 titik pengambilan sampel. Sampel diambil secara berturut-turut bertempat di lokasi yang dekat pemukiman warga (1), di dekat muara (2), dan menjorok ke laut (3). Guna dari penentuan titik pengambilan sampel tersebut yaitu untuk mendapatkan jamur endofit yang lebih banyak dan

beragam. Pada lokasi pengambilan sampel yang mendekati pemukiman warga, banyak ditemukan faktor-faktor antropologi yang dapat mempengaruhi jamur endofit yang akan tumbuh di dalam mangrove, seperti sampah-sampah organik, non-organik, limbah B3, dan limbah logam berat serta limbah rumah tangga karena kondisi lingkungan yang tercemar ekstrim tersebut, diharapkan jamur endofit yang tumbuh merupakan jamur endofit yang memiliki tingkat bioaktivitas yang tinggi karena dapat beradaptasi dari pencemaran lingkungan.



Gambar 3. Peta perairan Pantai Pagar Jaya

Dibandingkan dengan perairan Way Belau, sampel mangrove dari Pagar Jaya diambil dari 3 titik yang sama karena jumlah mangrove cukup terbatas dan tidak tumbuh pada lingkungan yang memiliki perbedaan. Mangrove yang tersedia pada Pantai Pagar Jaya juga tidak banyak. Walaupun demikian, tingkat pencemaran yang terjadi di perairan ini sangat rendah, tidak seperti perairan Way Belau. Tidak terlihat adanya pencemaran limbah rumah tangga dan pencemaran lainnya pada perairan Pagar Jaya sehingga kondisi mangrove masih terlihat asri.

3.2 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain tertera pada Tabel 1;

Tabel 1. Alat-alat yang digunakan

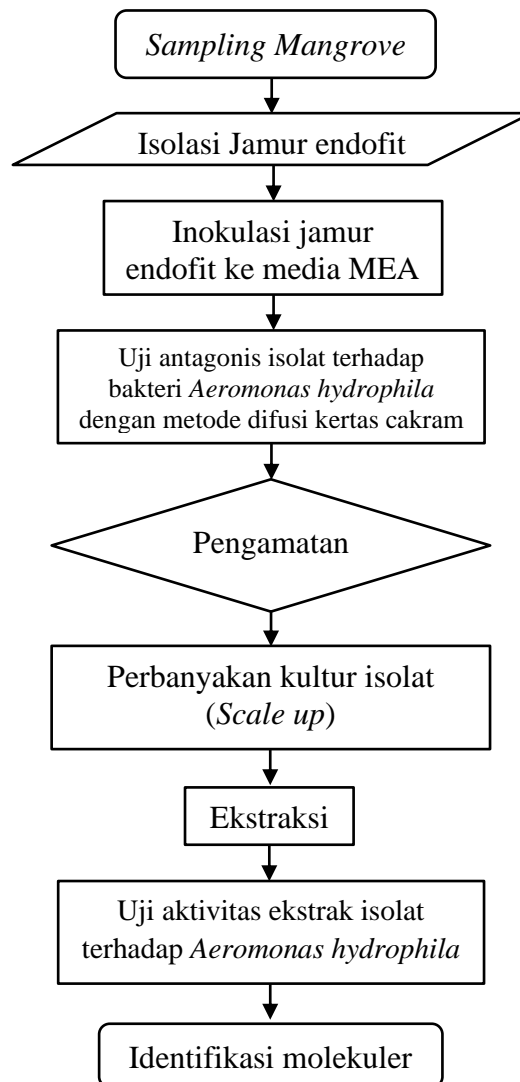
No.	Alat	Fungsi
1.	Jarum ose	Untuk inokulasi mikroba.
2.	Cawan petri	Sebagai wadah media padat.
3.	Tabung reaksi	Sebagai wadah media miring atau cair.
4.	Bunsen	Mensterilisasi jarum ose.
5.	<i>Spreader</i>	Menyebarkan mikroba kultur.
6.	Labu <i>Erlenmeyer</i>	Sebagai wadah untuk membuat media.
7.	Gelas ukur	Mengukur volume cairan.
8.	Pipet tetes	Untuk mengambil larutan.
9.	Mikropipet	Mengambil larutan dalam skala kecil.
10.	<i>Hotplate</i>	Untuk memanaskan media.
11.	<i>Magnetic stirrer</i>	Untuk mengaduk media.
12.	Timbangan digital	Untuk menimbang media atau sampel.
13.	Autoklaf	Sterilisasi media dan alat-alat kultur.
14.	Inkubator	Inkubasi mikroba dalam suhu terkontrol.
15.	Kulkas	Menyimpan media kosong.
16.	<i>Coolbox</i>	Untuk menyimpan sampel saat pertama kali diambil.
17.	<i>Coolpack</i>	Untuk mendinginkan sampel.
18.	Jas lab, masker, sarung tangan, penutup kepala	Alat pelindung dan menjaga tubuh tetap steril.
19.	<i>Laminar airflow</i>	Wadah untuk melakukan kegiatan penelitian, menghindari kontaminasi.
20.	Kamera ponsel	Untuk dokumentasi.
21.	Pisau	Untuk memotong sampel.
22.	Pinset	Untuk mengambil sampel.
23.	Spidol	Untuk menandai atau mencatat.
24.	Tip	Sebagai wadah ukur mikropipet.
25.	Spatula	Untuk mengaduk media dan bahan.
26.	Vortex	Untuk menghomogenkan bahan.
27.	<i>Sentrifuge</i>	Untuk memisahkan larutan.
28.	<i>Mortar dan Pestle</i>	Untuk menumbuk isolat.
29.	<i>Shaker</i>	Untuk mengocok isolat.
30.	PCR tube dan mesin PCR	Alat kerja PCR.
31.	Elektroforesis	Alat kerja elektroforesis.
32.	UV transluminator	Visualisasi hasil elektroforesis.

Tabel 2. Bahan yang digunakan

No	Bahan	Fungsi
1.	Media <i>malt extract agar</i>	Untuk menumbuhkan jamur.
2.	Media <i>zobell</i> komersil	Untuk menumbuhkan bakteri patogen uji.
3.	Media <i>malt extract broth</i>	Untuk menumbuhkan jamur di media cair.
4.	Air laut steril	Bahan pembuat media laut.
5.	Akuades	Bahan pembuat media tawar, untuk sterilisasi autoklaf.
6.	<i>Chloramphenicol</i> 1%	Sebagai zat anti kontaminasi bakteri pada media kultur jamur.
7.	<i>Nystatin</i> 100.000 IU	Sebagai zat anti kontaminasi jamur pada media kultur bakteri patogen.
8.	Alkohol	Untuk sterilisasi peralatan laboratorium.
9.	Kertas cakram	Untuk uji antagonisme isolat terhadap bakteri patogen.
10.	Plastik <i>wrap</i>	Untuk menutup rapat media cawan agar tidak terkontaminasi.
11.	Plastik tahan panas	Sebagai pembungkus alat dan bahan yang disterilisasi dengan autoklaf.
12.	Kain kasa	Untuk membuat penutup tabung reaksi, dan <i>erlenmeyer</i> .
13.	Aluminium foil	Untuk membungkus alat.
14.	Kertas tisu	Membersihkan alat.
15.	Karet gelang	Untuk merekatkan penutup dan mencegah udara masuk.
16.	Tris, NaCl, EDTA, SDS, akuades steril, <i>proteinase</i> K, fenol kloroform, isoamil alkohol, etanol PA, naAc, etanol 70% dan ddH ₂ O steril	Bahan ekstraksi DNA.
17.	ddH ₂ O steril, PCR master mix, primer ITS1 dan ITS4, dan template DNA	Bahan kerja PCR.
18.	Gel agarose, akuades steril, buffer TAE, EtBr, DNA loading dye, dan 1 kb DNA Ladder	Bahan <i>running</i> elektroforesis.

3.3 Metode Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Prosedur Penelitian



Gambar 2. Diagram alir metode penelitian

3.3.1 Pengambilan Sampel

Sampling dilakukan dengan memotong bagian akar mangrove dengan pisau. Sampel disimpan dalam plastik *zip* dan diberi nama. *Sampling* dilakukan sebanyak tiga (3 kali) pengulangan. Akar mangrove yang telah diambil kemudian dibersihkan bebas sedimennya dengan cara disemprotkan air laut steril.

3.3.2 Identifikasi Jenis Mangrove

Sampel mangrove yang digunakan diidentifikasi dengan melihat ciri-ciri kumpulan pohon mangrovenya, melihat sistem perakarannya, melihat bentuk buah dan daun kemudian dibandingkan dengan buku identifikasi mangrove menurut Noor *et. al.* (2006).

3.3.3 Sterilisasi

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan menggunakan *autoclave* dan alkohol 70%, bergantung pada benda yang akan disterilkan. Sterilisasi dengan menggunakan alkohol dilakukan untuk membersihkan alat-alat yang dipakai seperti jarum ose. Adapun sterilisasi menggunakan autoklaf dilakukan untuk membersihkan bahan-bahan yang dipakai seperti media. Media disterilisasi diautoklaf selama 15 sampai 20 menit dengan suhu 121°C (Suriawiria, 2005).

3.3.4 Pembuatan Media

Masing-masing media dibuat sesuai kebutuhan serta takaran dengan cara ditimbang, dimasukkan air, dipanaskan menggunakan *hotplate* dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirrer*. Komposisi yang diperlukan untuk membuat media *nutrient agar*, MEA dan MEB sebanyak 1.000 ml yaitu;

Tabel 3 Komposisi pembuatan media untuk 1.000 ml air laut atau air tawar.

Media	Bahan	Komposisi (g)
<i>Nutrient agar</i> (NA)	Nutrient Agar	28
<i>Malt extract agar</i> (MEA)	Malt	3
	Pepton	5
	Yeast	3
	Agar	15
<i>Malt extract broth</i> (MEB)	MEB	17

Sumber : Stamets (2007).

3.3.5 Isolasi Jamur

Jamur endofit mangrove diisolasi dari alam dengan cara membelah bagian mangrove menjadi dua bagian sehingga bagian dalam mangrove dapat dijangkau. Bagian dalam mangrove kemudian dipotong berbentuk persegi berukuran 3x3 mm² dan dimasukkan ke media MEA (Stamets, 2007). Media cawan ditutup rapat

dengan plastik wrap dan diinkubasi selama 3-4 hari. Setelah inkubasi selesai, jamur yang telah tumbuh diamati dan diberi kode isolat.

3.3.6 Pemurnian Jamur Endofit

Setelah isolat jamur diamati dan diberi kode isolat, masing-masing jamur dimurnikan ke dalam media tabung miring (media MEA) supaya tumbuh 1 koloni saja. Jamur yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi selama 3-7 hari. Pemilihan jamur yang dimurnikan didasarkan atas perbedaan morfologi yang tampak, yaitu warna hifa, bentuk, dan tekstur sehingga dari hasil pemurnian diharapkan tidak ada jamur dengan morfologi yang sama.

3.3.7 Uji Antagonis terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*

Uji antagonisme terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode uji antagonis jamur yang telah dimodifikasi oleh Naweia *et al.* (2017). Setelah isolat jamur yang telah dimurnikan tumbuh, tiap-tiap jamur yang berbeda kemudian dikultur lagi ke dalam media cawan (MEA) dan diinkubasi selama 3-7 hari. Proses ini berguna agar uji antagonisme tidak menggunakan stok pemurnian pertama sehingga menghindari isolat habis karena uji. Kemudian setelah isolat jamur di media MEA tumbuh, media cawan NA (*nutrient agar*) untuk pertumbuhan bakteri patogen dipersiapkan.

Media NA yang telah dibuat kemudian dikultur bakteri patogen uji *Aeromonas hydrophila* dengan cara disebar/*spread*. Setelah kultur bakteri patogen selesai, isolat jamur kemudian diletakkan di atasnya dengan cara memotong kultur jamur dengan ukuran beberapa milimeter. Dalam 1 cawan media uji antagonis dapat diletakkan setidaknya 5 isolat jamur dengan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menggunakan antibakteri kloramfenikol 1% dan kontrol negatif yaitu media MEA untuk membuktikan bahwa media tidak memiliki pengaruh antibiotik terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*. Inkubasi kemudian dilakukan selama 24 jam.

3.3.8 Uji Ekstrak Jamur Potensial

Untuk mengonfirmasi adanya metabolit sekunder dari jamur endofit yang menyebabkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri patogen *A. hydrophila*, isolat

jamur yang telah menunjukkan zona hambat pada uji antagonis kemudian diekstrak menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, memiliki toksisitas rendah, dan bersifat semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun nonpolar (Rowe *et al.*, 2009).

Proses ekstraksi diawali dengan mengkultur isolat jamur potensial pada media cair MEB sebanyak 50 ml, jamur kemudian diinkubasi selama 7 hari hingga botol sampel terisi penuh oleh isolat jamur. Setelah isolat jamur memenuhi botol sampel, isolat kemudian dipisahkan dari media cair dan ditimbang beratnya menggunakan timbangan analitik. Isolat jamur kemudian ditumbuk dengan mortar dan alu hingga benar-benar halus. Setelah isolat jamur telah tertumbuk hingga halus, isolat kemudian dimasukkan ke dalam botol sampel baru dan diisi pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:10 dari berat isolat, proses maserasi dilakukan hingga 2x24 jam .

Setelah proses maserasi selesai, supernatan dan natan kemudian dipisahkan. Supernatan kemudian dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 37° C dengan kecepatan 100 rpm selama 30 menit hingga tersisa ekstrak kental. Ekstrak kental kemudian dikeringkan hingga tersisa pasta. Ekstrak yang berbentuk pasta kemudian ditimbang dan diencerkan dengan pelarut etil asetat untuk membuat larutan ekstrak 1%.

Larutan ekstrak isolat jamur endofit mangrove 1% diuji antagonis terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* menggunakan metode difusi kertas cakram Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009). Proses ini diawali dengan menyebarkan/*spread* bakteri patogen *A. hydrophila* pada media cawan NA dan didiamkan selama 15 menit. Setelah 15 menit, *blank disk* berdiameter 8 mm diletakan pada media tersebut dan ekstrak isolat jamur dimikropipet sebanyak 25 µl kemudian diteteskan pada *blank disc*. Media uji kemudian diinkubasi selama 24 jam dan diamati zona hambat yang terbentuk. Zona hambat kemudian diukur dan dicatat.

3.3.9 Screening Aktivitas Antibakteri

Setelah inkubasi selesai, media uji yang berisi bakteri patogen dan isolat fungi diamati apakah terdapat isolat yang membentuk zona hambat terhadap bakteri patogen. Zona hambat dari isolat fungi kemudian diukur diameternya dan dicatat untuk menentukan isolat potensial penghasil antibakteri. Untuk menentukan besar diameter zona hambat menggunakan persamaan sebagai berikut (Harti, 2015);

$$Z = \frac{(Dv - Dc) + (Dh - Dc)}{2}$$

Keterangan :

Z = Zona hambat (mm)

Dv = Diameter vertikal (mm)

Dh = Diameter horizontal (mm)

Dc = Diameter kertas cakram (mm)

Kemudian hasil penghitungan zona hambat dikategorikan sesuai kategori kemampuan penghambatan bakteri dari isolat sesuai diameter zona hambat yang terbentuk seperti Tabel 4.

Tabel 4 Kategori penghambatan bakteri

No.	Kemampuan penghambat	Diameter zona hambat
1	Sangat kuat	≥ 20 mm
2	Kuat	10-20 mm
3	Sedang	5-10 mm
4	Lemah	< 5 mm

Sumber : Fitri (2010)

3.3.10 Identifikasi Molekuler

Identifikasi isolat jamur endofit dari akar mangrove *Avicennia* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* dideterminasi dengan mengamati daerah ITS dengan menggunakan primer ITS1 dan ITS4. Selanjutnya analisis cluster pada sekuens tersebut dilakukan dengan program BLAST (Basic Local Alignment Tool) dari NCBI (National Center for Biotechnology Information). Basa nukleotida dianalisis secara lengkap di PT. Genetika Science Indonesia. Adapun langkah-langkah kegiatan identifikasi molekuler dilakukan sebagai berikut;

3.3.10.1 Ekstraksi DNA Jamur

Jamur yang berumur 2-3 minggu dipanen dengan cara menambahkan 10 ml air steril pada cawan yang berisi biakan jamur. Suspensi konidia kemudian diambil dan dimasukkan ke dalam tabung sentrifus, lalu disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit, alkohol 70% kemudian ditambahkan sebanyak 500 μ l setelah proses sentrifus. Pelet tersebut disentrifus kembali dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit, setelah itu supernatan dibuang dan pelet ditambahkan 1.000 μ l larutan buffer ekstraksi DNA pertama.

Pelet yang ditambahkan buffer dihomogenkan dengan *rotamixer* hingga pelet tersuspensi merata dalam larutan, lalu dimasukkan ke dalam mortar yang sebelumnya telah didinginkan dan ditumbuk sebentar. Pelet yang telah ditumbuk kemudian dimasukkan ke dalam kulkas selama 1-2 hari untuk diinkubasi. Selanjutnya pelet dalam *mortar* diambil dan ditumbuk selama 15 menit, setelah itu dimasukkan ke dalam *tube* 1,5 ml sebanyak 0,5 ml dan ditambahkan CTAB 2% sebanyak 400 μ l dan dipanaskan pada *waterbath* dengan suhu 65° C selama 1 jam.

Setelah itu fenol, kloroform, isoamil alkohol ditambahkan sebanyak 500 μ l dihomogenkan dan disentrifus kembali pada kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit. Setelah disentrifus terbagi menjadi 2 larutan, larutan atas yang bening diambil sebanyak 600 μ l lalu dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifus 1,5 ml yang baru. Kloroform dan isoamil alkohol ditambahkan dengan perbandingan yang sama dengan volume hasil larutan sebelumnya (1:1), selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit.

Setelah sentrifus selesai, diambil larutan bagian atasnya sebanyak 400 μ l dan dipindahkan ke tabung mikrosentrifus 1,5 ml baru, ditambahkan isopropanol dingin dengan volume yang sama, dicampur atau dikocok agar tercampur. Larutan kemudian diinkubasi pada suhu -20° C selama 20 menit, disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 10 menit untuk mendapatkan peletnya, kemudian supernatan dibuang. Pelet ditambahkan alkohol 70% sebanyak 500 μ l, disentrifus dengan kecepatan 14.000 rpm selama 5 menit, kemudian supernatan dibuang dan pelet yang didapatkan dikering-anginkan selama 1-2 hari.

3.3.10.2 Amplifikasi PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Amplifikasi *polymerase chain reaction* (PCR) berdasar pada penelitian yang telah dilakukan oleh Huang (2009) menggunakan mesin PCR Biometra T-Gradient.

Amplifikasi daerah ITS rDNA sampel fungi endofit daerah ITS1 dan ITS4 dilakukan menggunakan pasangan primer ITS1 dan ITS4 sesuai dengan peta posisi yang dirancang oleh White *et al.* (1990). Amplifikasi dilakukan dalam campuran reaksi 50 µl yang masing-masing mengandung 25 µl, primer *forward* ITS1 10 µl, primer *reverse* ITS4 10 µl, ddH₂O 2 µl, DNA *template* jamur 3 ml dan ditambahkan PCR *master mix* 25 µl. Siklus termal adalah sebagai berikut: *hot start* 5 menit pada suhu 95 °C, diikuti oleh *denaturation* 1,5 menit pada suhu 94 °C, *annealing* 1 menit pada suhu 48 °C, *extension* awal 3 menit pada suhu 72 °C, dan 8 menit pada suhu 72 °C untuk *final extension*.

3.3.10.3 Elektroforesis

Elektroforesis berdasarkan yang telah dilakukan oleh Prihatini (2014). Produk hasil amplifikasi PCR di-*running* elektroforesis pada gel agarose 1% pada 100 V selama 45 menit dengan marker DNA *ladder* 1 kb. Gel agarose kemudian divisualisasi pada UV *transilluminator* dan gambar untuk melihat apakah DNA berhasil diekstraksi. Gambar kemudian diambil menggunakan kamera.

3.3.10.4 Purifikasi dan Sekuensing

Ekstrak DNA kemudian dipurifikasi mengikuti prosedur PT. Genetika Science Indonesia, Jakarta kemudian dilanjutkan ke tahap sekuensing menggunakan primer ITS1 (5' TTGCTTCGGCGGGTAGGGTC 3') dan ITS4 (3' ACGCAAAGG-AGGCTCCGGGA 5') yang mengapit gen 5,8S (Kamle *et al.*, 2013) yang mengikuti prosedur First BASE, Singapura. Sekuens DNA yang diperoleh dibandingkan dengan database GenBank di National Center for Biotechnology Information (NCBI) menggunakan program Basic Local Alignment Search Tool Algorithm (BLAST). Sekuens tersebut dicocokkan dengan sekuens yang paling dekat. Sekuens dianggap teridentifikasi tingkat spesies jika lebih dari 95% sesuai dengan sekuens database hingga membuat pohon filogeni sederhana menggunakan *software* MEGA 10.

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

1. Didapatkan 12 isolat jamur endofit mangrove *Avicennia alba* dengan morfologi yang berbeda.
2. Didapatkan 5 isolat jamur endofit mangrove yang memiliki aktivitas terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila*.
3. Ekstrak isolat jamur endofit yang memiliki aktivitas terhadap bakteri patogen *Aeromonas hydrophila* paling tinggi yaitu isolat WB-A05
4. Isolat jamur endofit mangrove dengan aktivitas tertinggi dalam uji antagonis dan uji ekstrak terhadap *A. hydrophila* telah diidentifikasi molekuler sebagai jamur *Tritirachium oryzae* yang merupakan jamur endofit dengan aktivitas antibiotik berspektrum luas.

5.2 Saran

Adapun saran untuk penelitian ini yaitu isolat jamur yang telah ditemukan memiliki potensi yang besar untuk dijadikan antibiotik terbaru. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menguji mekanisme penghambatan bakteri pada berbagai bakteri patogen Gram positif dan Gram negatif sehingga isolat jamur dapat diambil senyawa aktifnya lalu kemudian disintesis.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., Liviawaty, E., Jamaris, dan Hendi, Z. 2015. *Penyakit Ikan*. Penebar Swadaya. Jakarta. 220 hlm.
- Allan, B.J., dan Stevenson, R.M. 1981. Extracellular virulence factors of *Aeromonas hydrophila* in fish infections. *Canadian Journal of Microbiology*. 27(10):1114-1122.
- Azevedo, J. L. W., Maccheroni J. R., Pereira, J. O., dan Luiz, A.W. 2000. Endophytic microorganism: A review on insect control and recent advances on tropical plants. *Biotech*. 3(1):40-65.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews*. 2(2-3):51-66.
- Bachtiar, E. 2010. *Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Tumbuhan Mangrove di Kabupaten Ciamis sebagai Sumber Senyawa Antibakteri pada Ikan*. Lembaga Penelitian dan Pengabdian pada Masyarakat Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjajaran. Bandung. 18 hlm.
- Badrudin, A. 1993. *Sekilas Mengenai Hutan Bakau di Propinsi Riau*. Seminar sehari deforesasi hutan mangrove 7 Januari 1993. Fakultas Perikanan Universitas Riau. Pekanbaru. 11 hlm.
- Beguín, H., Pyck, N., dan Detandt, M. 2011. Tritirachium, a hyphomycetous genus belonging to the basidiomycota. *Nova Hedwig*. 94(1-2):139-152.
- Calabon, M. S., Sadaba, R. B., dan Campos, W. L. 2019. Fungal diversity of mangrove-associated sponges from New Washington, Aklan, Philippines. *Mycology*. 10(1):6-21.
- Chapman, V. J. 1977. *Wet Coastal Ecosystems*. Elsevier. Amsterdam. 428 hlm.
- Chen, H., Fujita, M., Feng, Q., Clardy, J., dan Fink, G. R. 2004. Tyrosol is a quorum-11 sensing molecule in *Candida albicans*. *Proceeding of the National Academy of Science USA*. 101(14):5048-5052.
- Chen, H., dan Fink, G. R. 2006. Feedback control of morphogenesis in fungi by 13 aromatic alcohols. *Genes & Development*. 20(9):1150-1161.

- Choi, Y. W., Hodgkiss, I. J., dan Hyde, K. D. 2005. Enzyme production by endophytes of *Brucea javanica*. *Journal of Agricultural Technology*. 1(2):55-65.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*. 69(1):10-16.
- Cronquist, A. dan Takhtadzhian, A. L. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York. 1262 hlm.
- Crous, P. W., Braun, U., Schubert, K., dan Groenewald, J. Z. 2007. Delimiting cladosporium from morphologically similar genera. *Studies in Mycology*. 58(1):33-56.
- De Figueiredo, J., dan Plumb, J. A. 1977. Virulence of different isolates of *Aeromonas hydrophila* in channel catfish. *Aquaculture*. 11(4):349-354.
- Farmer, J. J., Arduino, M. J., dan Hickman-Brenner, F. W. 2006. The genera aeromonas and plesiomonas. *Prokaryotes*. 6(1):564-596.
- Fitri, L. 2010. Kemampuan daya hambat beberapa macam sabun antiseptik terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi Edukasi*. 2(2):1-7.
- Gao, X. X., Zhou, H., Xu, D. Y., Yu, C. H., Chen, Y. Q., dan Qu, L. H. 2005. High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* kunth revealed by cultivation-independent approach. *FEMS Microbiology Letters*. 249(2):255-266.
- Guo, B., Dai, J., Ng, S., Huang Y., Leong, C., dan Ong, W. 2000. Cytonic acids a and b: novel tridepside inhibitors of HCMV protease from the endophytic fungus cytonaema species. *Journal Natural Products*. 63(5):602-604.
- Guo, L. D., Hyde, K. D., dan Liew, E.C.Y. 2000. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rdna sequences. *New Phytologist*. 147(3):617-630.
- Guo, L.D., Hyde, K.D., dan Liew, E.C.Y. 2001. Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *livistona chinensis* based on rdna sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 20(1):1-13.
- Harney, S. K., Edwards, F. S., dan Allen, M. F. 1997. Identification of arbuscular mycorrhizal fungi from *Artemisia californica* using the polymerase chain reaction. *Mycologia*. 89(4):547-550.
- Hornby J. M., Jensen E. C., Lisec A. D. 2001. *Quorum sensing* in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by *farnesol*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7):2982 – 2992.

- Hudzicki, J. 2009. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*. ASM Education. Washington. 23 hlm.
- Hyde, K. D., dan Soyong, K. 2007. Understanding microfungus diversity, a critique. *Cryptogamie Mycologie*. 28(4):281-289.
- Ilyas, M. 2007. Isolasi dan identifikasi mikoflora kapang pada sampel serasah daun tumbuhan di kawasan Gunung Lawu, Surakarta, Jawa Tengah. *Jurnal Biodiversitas*. 8(2):105-110.
- Kanai, K., dan Takagi, Y. 1986. Alpha-hemolytic toxin of *Aeromonas hydrophila* Produced *in vivo*. *Fish pathology*. 21(4):245-250.
- Ilyas, M. 2006. Isolasi dan identifikasi kapang pada relung rhizosphere tanaman di Kawasan Cagar Alam Gunung Mutis, Timor, NTT. *Bidang Zoologi*. 7(3):216-220
- Kint, A. 1934. De luchtfoto en de topografische terreingesteldheid in de mangrove. *De Tropische Natuur*. 23(10):173-189.
- Kamle, M., Pandey, B. K., Kumar, P., dan Kumar, M. 2013. A species-specific pcr based assay for rapid detection of mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* penz and sacc. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*. 4(6):184-189.
- Kusdawarti, G., Christy, G., dan Handijatno, D. 2019. Determination of aerolysin gene *Aeromonas hydrophila* by polymerase chain reaction (PCR) technique. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*.
- Kusmana, C., Ani, S., Yekti, H., dan Poppy, O. 2009. *Pemanfaatan Jenis Pohon Mangrove Api-Api (Avicennia spp.) sebagai Bahan Pangan dan Obat-Obatan*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 30 hlm.
- Kusmana, C., Wilarso, S., Hilwan, I., Pamoengkas, P., Wibowo, C., Tiryana, A., Triswanto, Yunasfi, dan Hamzah. 2003. *Teknik Rehabilitasi Mangrove*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 53 hlm.
- Lacap, D. C., Hyde, K. D., dan Liew, E. C. Y. 2003. An evaluation of the fungal morphotype concept based on ribosomal dna sequences. *Fungal Diversity*. 12(1):53-66.
- Lallier, R., dan Daigneault, P. 1984. Antigenic differentiation of pili from non-virulent and fish-pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases*, 7(6):509-512.
- Lodge, D. J., Fisher, P. J., dan Sutton B. C. 1996. Endophytic fungi of *Manilkara bidentata* leaves in Puerto Rico. *Mycologia*. 88(5):733-738.
- Lukistyowati, I. dan Kurniasih, K. 2011. Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus Carpio* L) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 16(2):144-160.

- Macnae, W. 1966. A general account of the fauna and flora of mangrove swamps and forests in the indowest-pacific region. *Advance in Marine Biology*. 6(1):73-270.
- Melliawati, R., Dian, N.W., Apridah, C.D., dan Harmastini, S. 2006. Pengkajian bakteri endofit penghasil senyawa bioaktif untuk proteksi tanaman. *Jurnal Biodiversitas*. 7(3):221-224.
- Manohar, C. S., Boekhout, T., Müller, W. H., dan Stoeck, T. 2014. *Tritirachium candoliense* sp. nov., a novel basidiomycetous fungus isolated from the anoxic zone of the arabian sea. *Fungal Biology*. 118(2):139-149.
- Miller, M. B, Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55(1):165 – 199.
- Morgan, D., Johnson, P. C., Dupont, H. L., Satterwhite, T. K., dan Wood, L. V. 1985. Lack of correlation between known virulence properties of *Aeromonas hydrophila* and enteropathogenicity for humans. *Infection and Immunity*, 50(1):62-65.
- Naiborhu, P. E. 2002. *Ekstraksi dan Manfaat Ekstrak Mangrove (Sonneratia alba dan Sonneratia caseolaris) sebagai Bahan Alami Antibakterial pada Patogen Udang Windu, Vibrio harveyi*. [Tesis]. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor. 63 hlm.
- Noga, J.E. 2000. *Fish Disease Diagnosis and Treatment*. Iowa State Press. Iowa. 366 hlm.
- Noor, R. Y., Khazali, M., dan Suryadiputra, I. N. N. 1999. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. PHKA/WI-IP. Bogor. 218 hlm.
- Noor, R. Y., Khazali, M., dan Suryadiputra, I. N. N. 2006. *Panduan Pengenalan Mangrove di Indonesia*. Ditjen PHKA. Bogor. 219 hlm.
- Noverita, D. F., dan Sinaga, E. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii*. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4):171-176.
- Peintner, U., Moser, M. M., Thomas, K. A., dan Manimohan, P. 2003. First records of ectomycorrhizal cortinari species (agaricales, basidiomycetes) from tropical India and their phylogenetic position based on rDNA ITS sequences. *Mycological Research*. 107(4):485-494.
- Prihanto, A. A. 2012. Perbandingan aktivitas antibakteri *Penicillium notatum* ATCC 28089 dengan *Penicillium* sp. R1M yang diisolasi dari mangrove *Sonneratia caseolaris*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 15(1):66-70.
- Prihatini, I. 2014. Identifikasi jamur endofit daun jarum *Pinus radiata* menggunakan metode ekstraksi DNA secara langsung. *Jurnal Pemuliaan Tana-man Hutan*. 8(1):31-42.

- Purnobasuki, H. 2004. Potensi *mangrove* sebagai tanaman obat. *Biota: Jurnal Ilmiah Ilmu-Ilmu Hayati*. 9(2):125-126.
- Purnamasari, M. I., Prihatna, C., Gunawan, A. W., dan Suwanto, A. 2012. Isolasi dan identifikasi secara molekuler *Ganoderma* spp. yang berasosiasi dengan penyakit busuk pangkal batang di kelapa sawit. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*. 8(1):9-15.
- Qadri, M., Rajput, R., Abdin, M. Z., Vishwakarma, R. A., dan Riyaz-Ul-Hassan, S. 2014. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial ecology*. 67(4):877-887.
- Ramadan, F., Bara, R., Losung, F., Mangindaan, R., Warouw, V., dan Pratasik, S. 2018. Substansi anti bakteri dari jamur endofit pada *mangrove Avicennia marina*. *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis*, 6(1):21-32.
- Richards, R. H., dan Roberts, R. J. 1978. The bacteriology of teleosts. *Fish pathology*. 4(1):183-204..
- Roberts, R. J. dan Bromage, N. R. 1993. *Bacterial Diseases of Fish*. Wiley Blackwell. New Jersey. 336 hlm.
- Santos, Y., Toranzo, A. E., Barja, J. L., Nieto, T. P., dan Villa, T. G. 1988. Virulence properties and enterotoxin production of aeromonas strains isolated from fish. *Infection and Immunity*. 56(12):3285-3293.
- Sarkar, M. J. A., dan Rashid, M. M. 2012. Pathogenicity of the bacterial isolate *Aeromonas hydrophila* to catfishes, carps and perch. *Journal of the Bangladesh Agricultural University*. 10(1):157-161.
- Sarano, A., Nitimulyo, K. H., Leluno, I. Y. B., Widodo, N., Thaib, E. B. S., Haryani, S., Haryanto, Triyanto, Ustadi, A. N., Kusumahati, Novianti, dan Setianingsih, S.W. 1993. *Hama dan Penyakit Ikan Karantina Golongan Bakteri*. Kerjasama Pusat Karantina Pertanian dan Fakultas Pertanian Jurusan Perikanan UGM. Yogyakarta. 48 hlm.
- Schell, W. A., Lee, A. G., dan Aime, M. C. 2011. A new lineage in pucciniomycotina: class tritirachiomycetes, order tritirachiales, family tritirachiaceae. *Mycologia*. 103(6):1331-1340.
- Sette, L.D., Passarini, M. R. Z., Delarmelina, C., Salati, F., dan Duarte, M. C. T. 2006. Molecular characterization and antimicrobial activity of endophytic fungi from coffee plants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 22(11):1185-1195.
- Siswandono dan Soekardjo, B. 1995. *Kimia Medisinal*. Airlangga. Surabaya 590 hlm.
- Stamets, P. 2007. *Culture Media for Fungi*. <http://www.shroomery.org/9468/Culture-Media-for-Fungi>. Diakses pada tanggal 31 Agustus 2020.

- Strobel, G., dan Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4):491-502.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., dan Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*. 67(2): 257-268.
- Suriawiria, U. 2005. *Mikrobiologi Dasar*. Papas Sinar Sinanti. Jakarta. 172 hlm.
- Susilawati, S., dan Hernawati, T. 1992. Penggunaan pengencer larutan buah untuk penyimpanan semen domba. *Media Kedokteran Hewan*. 3(1):40-57.
- Tan, R.X., dan Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 18(4):448-459.
- Taechowisan, T. Lu, C. Shen, Y., dan Lumayong, S. 2005. 4-Arylcoumarins from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. *Annals of Microbiology*. 55(1):63-66.
- Thune, R. L., Stanley, L. A., dan Cooper, R. K. 1993. Pathogenesis of Gram negative bacterial infections in warmwater fish. *Annual Review Of Fish Diseases*. 3(1):37 – 68.
- Wang, Y., Guo, L. D., dan Hyde, K. D. 2005. Taxonomic placement of sterile morphotypes of endophytic fungi from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in Northeast China based on rDNA sequences. *Fungal Diversity*. 20(1):235-260.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., dan Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *USA Academic Press*. 18(1):315-322.
- Xiang, L., Lu, C., Huang, Y., Zeng, Z., Su, W., dan Shen, Y. 2007. Endophytic fungi from a pharmaceutical plant, *camptotheca acuminata*: isolation, identification and bioactivity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(7):1037-1040.
- Yogananth, N., Bhakyaraj, R., Chanthuru, A., Anbalagan, T., dan Nila, M. 2009. Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolates from fish samples using PCR technique. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 4(1):51-53.
- Zhang, H. W., Song, Y. C. dan Tan, R. X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*. 23(5):753-771.
- Zhang, Y., Fournier, J., Pointing, S. B., dan Hyde, K. D. 2008. Are *Melanomma pulvis-pyrius* and *Trematosphaeria pertusa* congeneric?. *Fungal Diversity*. 33(1):47-60.
- Zinniel, D.K., Lambrecht, P., Haris, N.B., Feng, Z., Kuczarski, D., Higley, P., Himaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R.G., dan Vidader, A. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agro-

onomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*.
68(5):2198- 2208.