

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT  
YANG BERASOSIASI PADA TUMBUHAN SUNGKAI  
(*Peronema canescens*)**

**(Skripsi)**

**Oleh**

**AZIZAH MALIK  
1717011049**



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

## ABSTRAK

### ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT YANG BERASOSIASI PADA TUMBUHAN SUNGKAI (*Peronema canescens*)

Oleh

Azizah Malik

*Peronema canescens* atau sungkai merupakan tumbuhan obat yang digunakan oleh masyarakat sebagai sumber obat tradisional. Penelitian ini bertujuan mengisolasi fungi endofit yang berasosiasi pada daun sungkai; mengisolasi senyawa metabolit sekunder dari fungi endofit; melakukan uji bioaktivitas antibakteri dari ekstrak dan senyawa murni fungi endofit; serta karakterisasi senyawa. Penelitian ini telah berhasil mengisolasi delapan fungi endofit yang berasosiasi pada daun sungkai yang selanjutnya dikultur pada media PDB secara kultivasi dan ko-kultivasi. Hasil kolom ekstrak fungi ADF41 menunjukkan fraksi 8-12 positif terhadap reagen dragendorff, fraksi digabungkan dan diberi kode NV27. Karakterisasi fraksi NV27 dengan menggunakan LC-MS/MS menunjukkan ion puncak  $m/z$  353.1971 sebagai  $C_{20}H_{24}N_4O_2$ . Konfirmasi gugus dilakukan dengan FTIR yang menunjukkan serapan  $2922\text{ cm}^{-1}$  dan  $2847\text{ cm}^{-1}$  sebagai gugus C-C alifatik,  $1700\text{ cm}^{-1}$  dan  $1096\text{ cm}^{-1}$  sebagai gugus C=O dan C-O, serta serapan C=C aromatik, dan C-N pada  $1461\text{ cm}^{-1}$ ,  $1290\text{ cm}^{-1}$  dan  $1206\text{ cm}^{-1}$ . Fraksi NV27 diprediksi sebagai senyawa golongan alkaloid dengan jenis purin.

Kata kunci: Endofit, Sungkai, *Peronema canescens*, Alkaloid

## ABSTRAK

### ISOLATION AND IDENTIFICATION BIOACTIVE COMPOUNDS OF ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED IN SUNGKAI PLANT (*Peronema canescens*)

By

**Azizah Malik**

*Peronema canescens* or sungkai is a medicinal plant used by the community as a source of traditional medicine. This study aims to isolate endophytic fungi associated with sungkai leaves; isolating secondary metabolites from endophytic fungi; to test the antibacterial bioactivity of extracts and pure compounds of endophytic fungi; and characterization of compounds. This research has succeeded in isolating eight endophytic fungi associated with Sungkai leaves which were then cultured on PDB media by cultivation and co-cultivation. The results of the ADF41 fungus extract column showed positive fractions 8-12 to dragendorff reagent, the fractions were combined and coded NV27. Characterization of the NV27 fraction using LC-MS/MS showed the peak ion m/z 353.1971 as C<sub>20</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>. Group confirmation was carried out by FTIR which showed absorptions of 2922 cm<sup>-1</sup> and 2847 cm<sup>-1</sup> as aliphatic C-C groups, 1700 cm<sup>-1</sup> and 1096 cm<sup>-1</sup> as C=O and C-O groups, as well as aromatic C=C absorption, and C-N at 1461 cm<sup>-1</sup>, 1290 cm<sup>-1</sup> and 1206 cm<sup>-1</sup>. The NV27 fraction is predicted as an alkaloid compound with a purine type.

Keywords : Endophytic, Sungkai, *Peronema canescens*, Alkaloids

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT  
YANG BERASOSIASI PADA TUMBUHAN SUNGKAI  
(*Peronema canescens*)**

**Oleh**

**Azizah Malik**

**Skripsi**

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar  
SARJANA SAINS.**

**Pada**

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



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

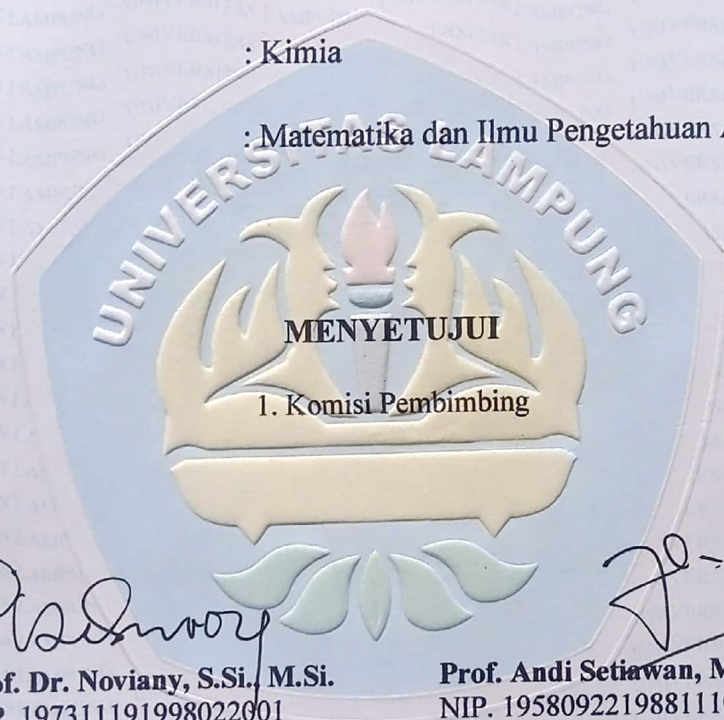
Judul : ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA  
BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT YANG  
BERASOSIASI PADA TUMBUHAN  
SUNGKAI (*Peronema canescens*)

Nama Mahasiswa : *Azizah Malik*

Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011049

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



*[Signature]*  
**Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.**  
NIP. 197311191998022001

*[Signature]*  
**Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D.**  
NIP. 195809221988111001

2. Ketua Jurusan Kimia  
FMIPA Universitas Lampung

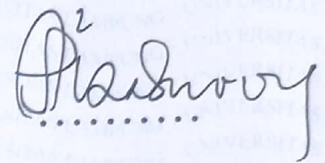
*[Signature]*  
**Mulyono, Ph.D.**  
NIP. 197406112000031002

**MENGESAHKAN**

1. Tim Penguji

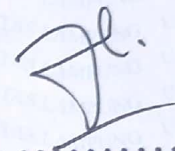
Ketua

: Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si.



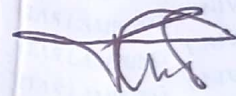
Sekretaris

: Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D. ....



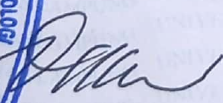
Penguji  
Bukan Pembimbing

: Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc.. ....



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 28 Desember 2022

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Azizah Malik  
Nomor Pokok Mahasiswa : 1717011049  
Jurusan : Kimia  
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi saya yang berjudul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif Fungi Endofit yang Berasosiasi pada Tumbuhan Sungkai (*Peronema canescens*)”** adalah benar karya dan penelitian saya sendiri, baik gagasan, hasil dan analisisnya. Selanjutnya saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sadar dan sebenarnya untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 13 Februari 2023

Yang menyatakan,



Azizah Malik  
NPM 1717011049

## **RIWAYAT HIDUP**

Penulis dilahirkan di Bandar Lampung, pada tahun 1999 dihari buruh Internasional dan diberi nama Azizah Malik. Penulis merupakan anak ke dua dari tiga bersaudara, dari pasangan Bapak Malik dan Ibu Hesti Mutmainah.

Penulis mengawali pendidikan formal di Madrasah Ibtid'iyah (MI) Padjajaran Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2011, melanjutkan di Madrasah Tsanawiyah (MTs) Negeri 1 Bandar Lampung yang diselesaikan pada tahun 2011-2014, dan menempuh pendidikan Madrasah Aliyah (MA) Negeri 2 Bandar Lampung yang selesai tahun 2017. Pada tahun 2017 penulis diterima sebagai mahasiswa Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur Seleksi Bersama Masuk Perguruan Tinggi (SBMPTN) dan sebagai penerima Beasiswa BIDIKMISI.

Selama menjadi mahasiswa, penulis memiliki pengalaman organisasi yaitu sebagai Dewan Alumni Paskibra Lampung tahun 2017, anggota Rohani Islam (Rois) periode 2017, kader muda Himaki periode 2017, Garuda Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) serta Staf dinas Advokasi dan Kesejahteraan Mahasiswa (Adkesma) BEM FMIPA periode 2018, anggota bidang sosial masyarakat (SOSMAS) Himaki periode 2018, sekretaris bidang SOSMAS Himaki periode 2019, bendahara dinas Isu dan Pergerakan BEM FMIPA periode 2020 selain itu penulis juga pernah menjadi asisten Praktikum Kimia Organik 1 untuk jurusan kimia dan biologi pada tahun 2022.



## **PERSEMBAHAN**

*Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala limpahan rahmat dan hidayah-Nya.  
Dengan penuh rasa syukur dan dengan segala kerendahan hati penulis  
mempersembahkan skripsi ini kepada:*

### **Orangtua dan Saudara Tercinta**

*Terimakasih atas segala cinta, kasih sayang, perhatian dan do'a yang tak pernah  
mengiringi setiap langkah perjalanan panjang ini.*

### **Dosen Jurusan Kimia**

*Atas segala ilmu dan pelajaran berharga yang diberikan selama menempuhi pendidikan  
di kampus.*

### **Sahabat-Sahabat Terbaik**

*Selalu menjadi pendengar terbaik dan pengingat agar selalu dalam kebaikan, do'a dan  
semangatnya untuk terus berjuang dalam kebaikan, dan fokus dengan tujuan yang  
akan dicapai.*

**Almamater Tercinta, Universitas Lampung**

## KATA INSPIRASI

*Dan sesungguhnya Dia-lah yang menjadikan orang tertawa dan menangis  
(Q.S. An-Najm (53):43)*

*"...apa yang melewatkanmu tidak akan pernah menjadi takdirku. Dan apa yang  
ditakdirkan untukku, takkan melewatkanmu."*

*(Umar bin Khattab)*

*The greatest lesson comes from the greatest pain*

*(Anonim)*

*".....Truly Allah love for his servant is far greater than a mother's love for her  
child"*

*(HR. Muslim)*

## SANWACANA

Segala puji dan syukur senantiasa penulis hanturkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan kasih sayang-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Identifikasi Senyawa Bioaktif Fungi Endofit yang Berasosiasi pada Tumbuhan Sungkai (*Peronema canescens*)”**

Penulis sangat menyadari bahwa dalam menyelesaikan skripsi ini tidak dapat terlepas dari bimbingan, kritik, saran, bantuan dan semangat dari berbagai pihak serta ridho Allah SWT. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Terkhusus kepada Bapak Malik dan Ibu Hesti Mutmainah, atas didikan terbaiknya, dukungan, do'a, motivasi dan memberikan semua yang terbaik kepada penulis hingga saat ini. Serta kepada kakakku Ahmad Sholihin dan Muhammad Sofyan yang selalu mendukung dan mendengarkan keluh kesah penulis.
2. Ibu Prof. Dr. Noviany, S.Si., M.Si., selaku pembimbing I yang telah membimbing, memotivasi dan memberikan semangat sehingga penelitian dan penulisan skripsi penulis dapat terselesaikan.
4. Bapak Prof. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., selaku pembimbing II yang selalu memberikan bimbingan, motivasi dan semangat kepada penulis.
5. Bapak Prof. Dr. Sutopo Hadi, S.Si., M.Sc., selaku pembahas yang banyak memberikan semangat serta saran positif dalam proses penyelesaian skripsi ini.
6. Bapak Dr. Hardoko Insan Qudus, M.S., selaku pembimbing akademik yang selalu memberikan saran serta motivasi selama kuliah di jurusan kimia..

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 yang selalu membimbing dan memberikan saran terbaiknya kepada penulis selama perkuliahan.
11. Seluruh staf Jurusan dan Laboran Jurusan Kimia FMIPA Unila, atas segala bantuan dan nasihat selama penulis menempuh pendidikan dan penelitian.
12. Sahabat Merriezka Ismaini, S.Si., Nia Kurniasih, S.Si., Ramy Zahra Mahdiyah, S.Si., Rosalinda Yuliani S.Si., Rana Aprilia Rinjani, S.Si., Agustina Ayu Pangestu (S.Si., soon), Aulia Gadis Prabawani (S.Si., soon), Mesy Cintia S.Si., Feranika S.Si., dan Ria Mela Rosi S.Si., atas segala motivasi, bantuan, serta do'a sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhirnya.
13. Sahabat OT7 Yoon, Hobi, Joon, Jin, Kukie, Encim dan Tae Tae yang telah memberi semangat dan motivasi kepada penulis untuk cepat menyelesaikan tugas akhirnya.
14. Member Noviany Research Grup (NRG), mba Elma, mba Habibah, mba Uus, kak Candra, kak Arif, kak Hanif, Ulle, Dhita, Feni, Rista, Ofri, Agustin, Reni dan Jihan atas semangat, canda tawa, dukungan serta memberikan saran yang membangun untuk penulis.
15. Rekan-rekan Labolatorium Biopol, mba Caca, mba Nafila, mba ocii, kak Pendi, mba Gita, kak Arik, mba Nurhuda, kak Zara, mba Gabriel, Saras, Ikrom, Riski, Umay Mer, Nay, Ririn, dan icun. Telah memberikan dukungan, canda tawa selama penelitian dan memotivasi penulis.
16. Rekan pimpinan Himaki 2019, Teh Upi, Rezal, Qonita, Putri, Mukhlis, Nia, Alfarizi, kabid Icen, Reni, Ikrom, Alya, Seng, Merr, dan Riski atas

kebersamaannya dan telah memberikan pelajaran yang berharga kepada penulis selama menjadi pengurus.

17. Rekan pimpinan BEM FMIPA Universitas Lampung periode 2020 atas segala canda tawa kebersamaan dan pengalaman yang diberikan selama menjadi bagian dari BEM FMIPA Unila.

18. Rekan seperjuangan terkhusus angkatan 2017 atas segala bantuan, dukungan dan motivasi kepada penulis. Semoga Allah membalas kebaikan kalian dan dipermudah segala urusannya.

Terimakasih atas bantuan dan dukungannya semoga Allah SWT membalas semua kebaikan *Aamiin*. Penulis menyadari dalam penulisan skripsi ini terdapat kesalahan dan kekurangan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan serta penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi orang banyak dan khususnya bagi yang membacanya.

Bandar Lampung, 13 Februari 2023

Penulis

Azizah Malik

## DAFTAR ISI

<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>v</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>vi</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang .....	1
1.2. Tujuan Penelitian .....	3
1.3. Manfaat Penelitian .....	3
<b>II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
2.1. Verbenaceae .....	4
2.2. Sungkai ( <i>P. canescens</i> ) .....	4
2.3. Fungi Endofit .....	5
2.4. <i>Mucor sp.</i> .....	6
2.5. Kandungan Senyawa Bioaktif <i>P. canescens</i> .....	6
2.6. Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	8
2.7. Kultivasi dan Ko-kultivasi .....	9
2.8. Ekstraksi.....	10
2.9. Bakteri Uji.....	12
2.10. Antibakteri.....	15
2.11. Uji Aktivitas Antibakteri.....	15
2.12. Kromatografi .....	16
2.13. Karakterisasi Senyawa .....	18
<b>III. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>20</b>
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian .....	20
3.2. Alat dan Bahan.....	20
3.3. Prosedur Penelitian.....	21
3.3.1. Biomaterial.....	21

3.3.2. Tahapan Mendapat Isolat dan Peremajaan.....	21
3.3.3. Kultivasi dan Ko-kultivasi Mikroba Endofit.....	22
3.3.4. Ekstraksi Cair-Cair.....	22
3.3.5. Uji Skrining Bioaktivitas.....	23
3.3.6. Ko-kultivasi Fungi Endofit ( <i>Scalling up</i> ).....	24
3.3.7. Analisis Morfologi Fungi secara Mikroskopis.....	24
3.3.8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	24
3.3.9. Pemurnian Menggunakan Kolom Kromatografi.....	25
3.3.10. Karakterisasi Senyawa .....	25
<b>IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>26</b>
4.1. Biomaterial.....	26
4.2. Isolasi Mikroba Endofit dari Sungkai .....	27
4.3. Kultivasi, Ko-kultivasi dan Ekstraksi .....	28
4.4. Skrining Bioaktivitas.....	29
4.5. Identifikasi Morfologi Fungi ADF41 .....	32
4.6. <i>Scalling up</i> Ko-Kultivasi Fungi ADF41 .....	33
4.7. Partisi Ekstrak ADF41 .....	35
4.8. Karakterisasi Fraksi NV27 .....	39
<b>V. SIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>44</b>
5.1. Simpulan .....	44
5.2. Saran.....	44
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>46</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>54</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Urutan kepolaran pelarut (Polita <i>et al.</i> , 2020).....	18
2. Interpretasi data LC-MS/MS Fraksi NV27 .....	40



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tumbuhan sungkai (a) pohon; (b) daun; (c) batang (Sinulingga <i>et al.</i> , 2021).....	5
2. kolumela <i>mucor</i> pada ujung spongiofor (Hurdeal <i>et al.</i> , 2021).....	6
3. Senyawa flavonoid glikosida .....	7
4. Struktur diterpen dari daun sungkai ( <i>P. canescens</i> ) (Kitagawa <i>et al.</i> , 1994).....	8
5. Struktur senyawa <i>cotteslosin</i> C (9); 22-epi-aflaquinolone B (10); dan antrakuinon (11 dan 12) (Abdel-Wahab <i>et al.</i> , 2019). .....	10
6. Daun pohon sungkai.....	26
7. Mikroba endofit (a) isolat campuran (b) isolat tunggal ADF41 .....	27
8. Pertumbuhan fungi pada media PDB tanpa bakteri .....	28
9. Ekstrak pekat ADF41 .....	29
10. Hasil skrining sampel kultivasi dengan bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	29
11. Reduksi resazurine (biru) menjadi resorufin (merah muda) .....	30
12. Hasil skrining sampel ko-kultivasi dengan bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	31
13. Hasil mikroskop fungi ADF41 .....	32
14. Hasil uji KLT berurutan ekstrak kultivasi dan ko-kultivasi ADF41, (a) pada sinar UV 254 nm; (b) pereaksi $Ce(SO_4)_2$ . .....	34
15. Partisi ekstrak ADF41 .....	35
16. Hasil uji KLT sampel partisi berurutan (a) ekstrak kasar; (b) ekstrak <i>n</i> -heksana; (c) ekstrak air .....	36
17. Kromatografi kolom fraksi <i>n</i> -heksana .....	36
18. Fraksi-fraksi hasil kolom ekstrak <i>n</i> -heksana ADF41 (a) pereaksi $Ce(SO_4)_2$ ; (b) dragendorff.....	37
19. Hasil uji skrining fraksi-fraksi kolom terhadap bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	38
20. Hasil KLT fraksi NV27, (a) sinar UV 254 nm; (b) pereaksi dragendorff.....	39

21. Kromatogram LC-MS/MS Fraksi NV27 .....	40
22. Spektrum MS/MS dengan waktu retensi 14.59 menit, $[M+H]^+ = 353.1971$ , formula molekul $C_{20}H_{24}N_4O_2$ .....	41
23. Prediksi fragmentasi.....	42
24. Hasil analisis FT-IR fraksi NV27 .....	43

## I. PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Di Indonesia penyakit akibat infeksi bakteri termasuk ke dalam sepuluh penyakit terbanyak yang sering terjadi. Pemakaian obat antibakteri yang cukup tinggi dan kurang bijak akan meningkatkan terjadinya resisten terhadap bakteri (Kemenkes RI., 2011). Pada penelitian terhadap bakteri *P. aeruginosa*, bakteri tersebut dilaporkan resisten terhadap beberapa jenis antibiotik sefalosporin seperti sefotaksim dan seftriakson, aminoglikosida, fluorokuinolon serta amikacin (Raakhee *et al.*, 2014; Rustini *et al.*, 2017). Resistensi terhadap antibiotik menjadi salah satu masalah yang serius di berbagai negara yang dapat menyebabkan kematian, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mencari sumber antibiotik baru.

Sumber daya alam merupakan aset yang perlu diteliti, dikembangkan dan dioptimalkan pemanfaatannya. Kandungan senyawa bioaktif sangat beragam sesuai kondisi alam tempat tumbuhan tersebut hidup. Sumber daya alam yang sering digunakan masyarakat sebagai obat tradisional yaitu daun sungkai. Sungkai biasa dimanfaatkan masyarakat sebagai obat penurun panas serta obat malaria (Latief dkk., 2021). Menurut penelitian Yani *et al.* (2014) melaporkan bahwa ekstrak daun sungkai dapat digunakan sebagai antipiretik, imunitas sebagai daya tahan terhadap penyakit terutama pada gejala infeksi, antiplasmodium dan teratogenitas pada mencit dengan dosis tertentu. Penelitian baru-baru ini oleh Fransiska dkk. (2020) menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sungkai dapat

menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi efektif 25% dan dengan diameter zona bening 3,75 mm. Sedangkan pada penelitian Muharni *et al.* (2021) menunjukkan bahwa ekstrak daun sungkai mengandung metabolit sekunder fenolik dan flavonoid, antioksidan, serta berpotensi sebagai antibakteri.

Daun sungkai memiliki berbagai kandungan senyawa metabolit sekunder seperti golongan fenolik, tanin, alkaloid, steroid, saponin dan flavonoid (Fadlilaturrahman dkk., 2021). Proses isolasi senyawa bahan alam tersebut, dibutuhkan biomassa yang besar pada proses ekstraksi dan pemurnian. Jika hal ini sering dilakukan secara berlebih populasi tumbuhan dialam akan semakin menurun (Abdiyani, 2008). Sehingga diperlukan alternatif lain untuk menghasilkan senyawa metabolit sekunder tersebut tanpa membahayakan tumbuhan inang.

Tumbuhan memiliki berbagai macam mikroorganisme yang terkandung di dalam maupun di luar jaringan, seperti fungi, bakteri, archaea dan protista. Mikroorganisme ini berpengaruh pada pertumbuhan dan produktivitas suatu tanaman (Hassani *et al.*, 2018). Endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh dalam jaringan tanaman dan dapat memberikan efek ketahanan terhadap ancaman biotik atau abiotik (Busby *et al.*, 2015). Mikroba endofit dapat menghasilkan senyawa yang mirip dengan tanaman inangnya. Berdasarkan penelitian Yan *et al.* (2019) interaksi fungi endofit dengan tanaman inang memberikan mekanisme pertahanan tambahan pada sistem kekebalan tanaman. Endofit dapat menginduksi produksi senyawa antimikroba berlebih pada tumbuhan seperti alkaloid menjadi fitohormon tidak langsung. Pada penelitian Ibrahim *et al.* (2019) melaporkan bahwa senyawa metabolit sekunder dari jamur endofit daun tumbuhan sungkai yaitu alkaloid, terpenoid, flavonoid dan polifenol.

Penelitian mengenai senyawa metabolit sekunder dari tumbuhan sungkai telah banyak dilakukan, akan tetapi penelitian terhadap fungi endofit yang berasosiasi pada tumbuhan sungkai masih sangat terbatas. Berdasarkan pemaparan diatas,

akan dilakukan penelitian mengenai fungi endofit yang berasosiasi dengan daun tumbuhan sungkai (*P. canescens*) dan aktivitasnya sebagai antibakteri. Pengujian antibakteri terhadap ekstrak fungi endofit yang dihasilkan dilakukan terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Ekstrak unggul tersebut kemudian diisolasi, dimurnikan dan dikarakterisasi untuk mengetahui kandungan senyawa.

## **1.2. Tujuan Penelitian**

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengisolasi fungi endofit yang berasosiasi pada daun tumbuhan sungkai (*P. canescens*).
2. Mengisolasi metabolit sekunder dari fungi endofit yang berasosiasi pada daun tumbuhan sungkai.
3. Uji bioaktivitas antibakteri dari ekstrak dan senyawa murni fungi endofit hasil isolasi.
4. Karakterisasi senyawa bioaktif dari fungi endofit daun tumbuhan sungkai.

## **1.3. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal terkait kajian potensi fungi endofit yang berasosiasi pada daun tumbuhan sungkai (*P. canescens*) serta aktivitasnya sebagai sumber antibakteri.

## II. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1. Verbenaceae

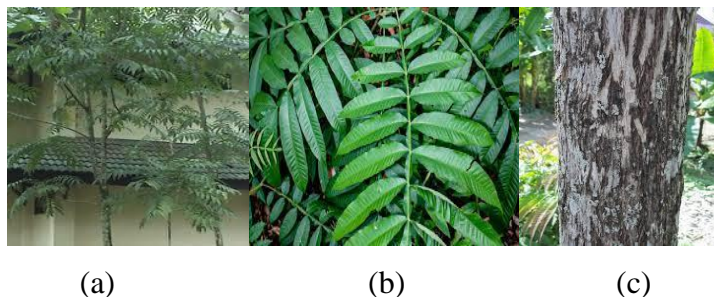
Verbenaceae merupakan salah satu famili dari ordo Lamiales, yang merupakan tumbuhan berkayu atau semak, dengan daun dan buah yang sedikit simetri *corolla bilateral*, memiliki buah dengan dua atau empat biji (Marx *et al.*, 2010). Verbenaceae memiliki 2600 spesies yang dikelompokkan menjadi 100 genus, jumlah spesies paling signifikan ditemukan di Amerika Latin yang hidup diberagam ekosistem (Zamora *et al.*, 2018). Famili ini terkenal sebagai verbena atau vervain dan glandularia. Salah satu spesies dari famili verbenaceae adalah *Peronema canescens*.

### 2.2. Sungkai (*P. canescens*)

*P. canescens* merupakan tumbuhan yang termasuk dalam famili verbenaceae. *P. canescens* dikenal juga dengan sebutan sungkai, sekai, sungkih, longkai, sungke dan jati sabrang, namun di Indonesia lebih dikenal dengan nama sungkai. Tumbuhan ini dapat tumbuh di dalam hutan hujan tropis dengan tipe iklim A-C, tanah kering atau sedikit basah dengan ketinggian sampai 0-600 meter dari permukaan laut. Tinggi pohon sungkai mencapai 20-25 meter, panjang batang cabang mencapai 15 meter, batang lurus dan sedikit berlekuk dangkal, tidak berbanir, ranting penuh dengan bulu halus kulit luar berwarna kelabu (Sinulingga *et al.*, 2021). Tumbuhan sungkai dapat dilihat pada **Gambar 1**.

Sungkai merupakan salah satu tanaman asli Kalimantan, masyarakat suku Dayak Kalimantan Timur menggunakan jamu sebagai obat kesehatan, termasuk daun

sungkai. Sungkai digunakan oleh masyarakat sebagai obat demam, sakit perut, influenza, antiseptik dimulut dan perawatan kulit. Daerah Sumatera Selatan dan Provinsi Lampung, daun muda sungkai digunakan sebagai anti plasmodium dan demam (Yani *et al.*, 2014).



**Gambar 1.** Tumbuhan sungkai (a) pohon; (b) daun; (c) batang (Sinulingga *et al.*, 2021)

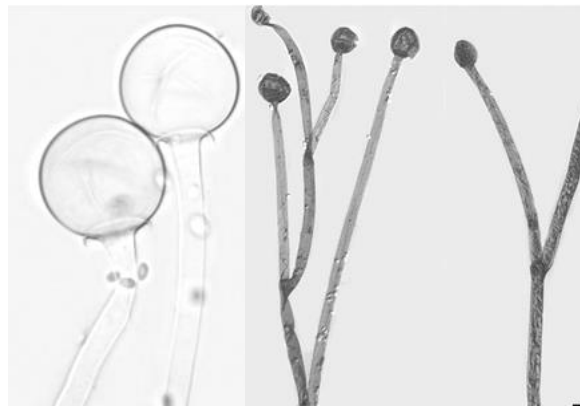
### 2.3. Fungi Endofit

Endofit merupakan mikroorganisme yang kaya akan keanekaragaman hayati yang biasanya ditemukan dalam jaringan tanaman atau ruang antar sel tumbuhan. Endofit dapat mendorong pertumbuhan tanaman inang dengan memproduksi metabolit sekunder secara langsung, yang dapat meningkatkan ketahanan tanaman terhadap gangguan biotik dan abiotik (Wen *et al.*, 2022). Mikroba endofit dapat berupa bakteri (*actinomycetes* atau *mycoplasma*) dan jamur, mikroba ini tumbuh dalam jaringan tanaman seperti daun, akar serta batang (Gouda *et al.*, 2016). Setiap tanaman tingkat tinggi dapat menghasilkan beberapa mikroba endofit yang menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang mirip dengan inangnya. Hal ini dapat diduga dari transfer genetik dari tanaman inang ke mikroba endofit (Tan *et al.*, 2001). Endofit dilaporkan menghasilkan sejumlah senyawa metabolit bioaktif yang berfungsi sebagai sumber obat yang baik untuk pengobatan terhadap berbagai penyakit serta aplikasinya dalam industri, pertanian, obat-obatan, makanan dan kosmetik. Jamur endofit dilaporkan menghasilkan beberapa obat antibakteri dan antikanker, seperti *penicilllenols* yang diekstrak dari jamur

*Penicillium sp.*, Taxol diisolasi dari *Taxomyces andreanae* merupakan obat antikanker yang paling efektif (Jalgaonwala *et al.*, 2011).

#### 2.4. *Mucor sp.*

Spesies *mucor* merupakan jamur saprofit yang terdapat di tanah, kotoran, dapat sebagai endofit serta parasit tanaman. *Mucor* adalah genus besar dalam *mucorales* yang dikenal sebagai agen infeksi pada manusia dan hewan (*mucormycosis*), dapat digunakan dalam produksi fermentasi pangan, bioteknologi sebagai biotransforman atau penghasil enzim dan keberagaman metabolisme (Wagner *et al.*, 2020). Kolumela dari fungi *mucor sp.* dapat dilihat pada **Gambar 2**.



**Gambar 2.** kolumela *mucor* pada ujung spongiofor (Hurdeal *et al.*, 2021)

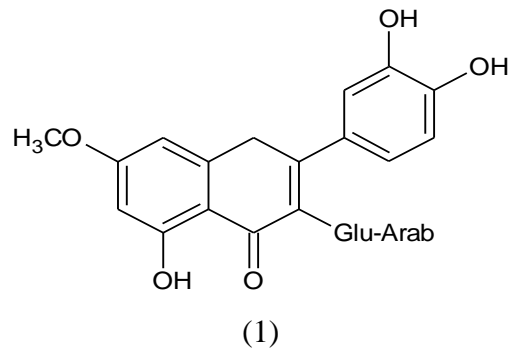
#### 2.5. Kandungan Senyawa Bioaktif *P. canescens*

Sungkai merupakan salah satu tumbuhan tradisional yang memiliki potensi sebagai obat infeksi. Senyawa-senyawa tersebut diduga kuat memiliki peran penting dalam penyembuhan luka atau infeksi dan berfungsi pula sebagai agen antimikroba. Menurut Ahmad dkk. (2015) telah diketahui bahwa ekstrak daun sungkai memiliki aktivitas sitotoksik. Pengujian bioaktivitas ekstrak metanol dan *n*-heksana daun sungkai diuji terhadap larva udang (*Artemia salina*) diperoleh nilai  $LC_{50}$  387,257  $\mu\text{g/mL}$  dan 107,399  $\mu\text{g/mL}$  berturut-turut. Berdasarkan metode BSLT suatu ekstrak dikatakan aktif jika nilai  $LC_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$  semakin kecil dari  $<1000 \mu\text{g/mL}$  ekstrak semakin bersifat sitotoksik (Meyer *et al.*, 1982).



### 2.5.1. Flavonoid

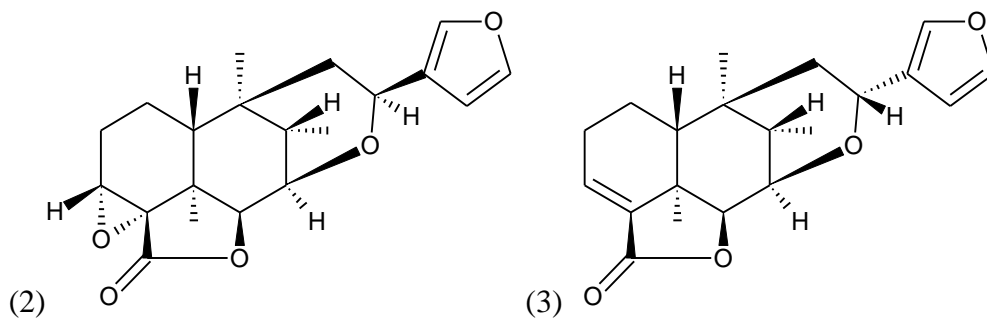
Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang tersebar di alam, salah satu senyawa flavonoid yang berhasil diisolasi yaitu glikosida (1). Flavonoid glikosida (**Gambar 3**) berhasil diisolasi dari ekstrak metanol daun tanaman sungkai (Simajuntak, 1996).

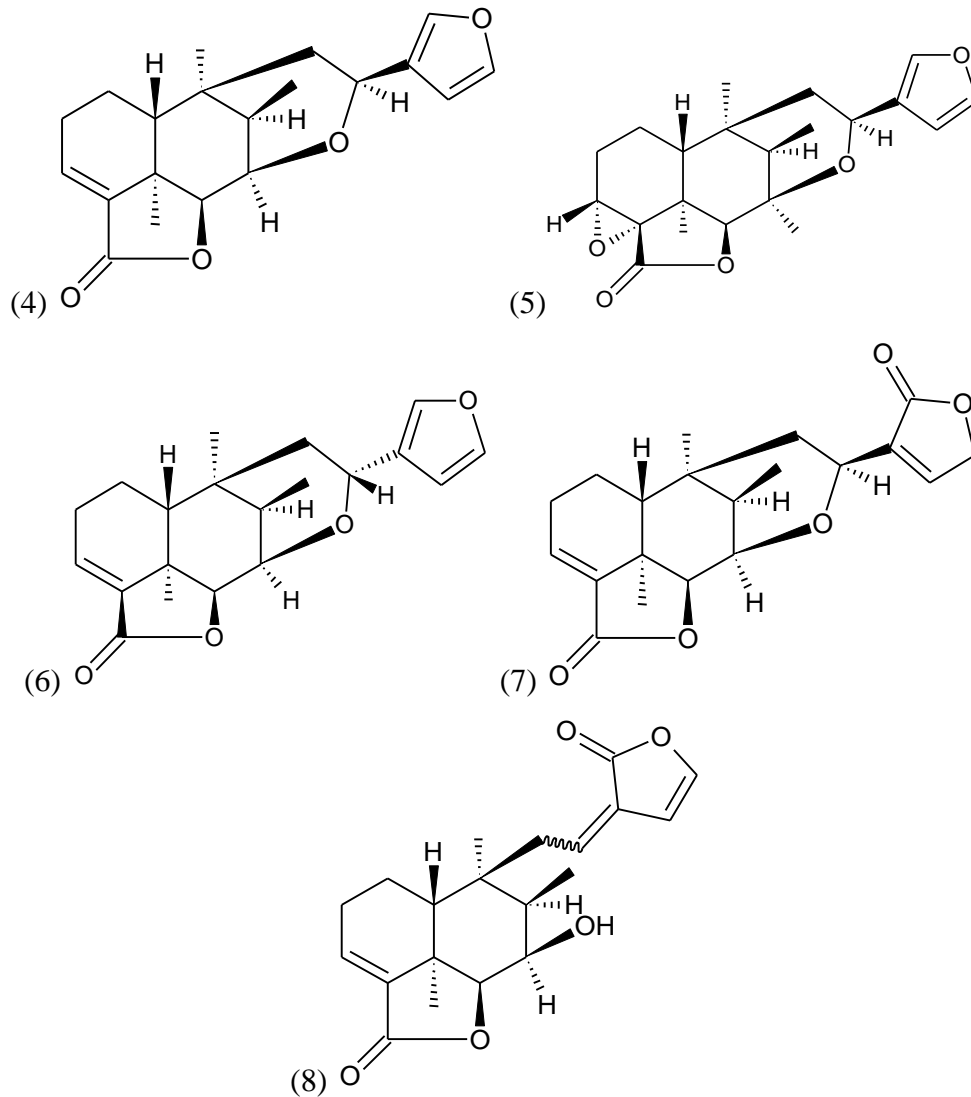


**Gambar 3.** Senyawa flavonoid glikosida

### 2.5.2. Terpenoid

Senyawa diterpenoid telah berhasil diisolasi dari daun tumbuhan sungkai dan diberi nama peronemia A2 (2), A3 (3), B1 (4), B2 (5), B3 (6), C1 (7) dan D3 (8), struktur dari senyawa dapat dilihat pada **Gambar 4** (Kitagawa *et al.*, 1994).





**Gambar 4.** Struktur diterpen dari daun sungkai (*P. canescens*) (Kitagawa *et al.*, 1994).

## 2.6. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media merupakan substrat makanan yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba, selain faktor lingkungan seperti suhu dan pH, media menjadi salah satu faktor yang paling berpengaruh pada pertumbuhan mikroba. Mikroba membutuhkan nutrisi yang cukup untuk tumbuh diluar habitatnya. Media yang umum digunakan dalam laboratorium untuk pertumbuhan jamur adalah media PDA. Berdasarkan komposisinya, media PDA termasuk dalam media semi

sintetik karena mengandung bahan alami (kentang) dan bahan sintetik (*dextrose* dan agar) (Fletcher *et al.*, 2019; Griffith *et al.*, 2007).

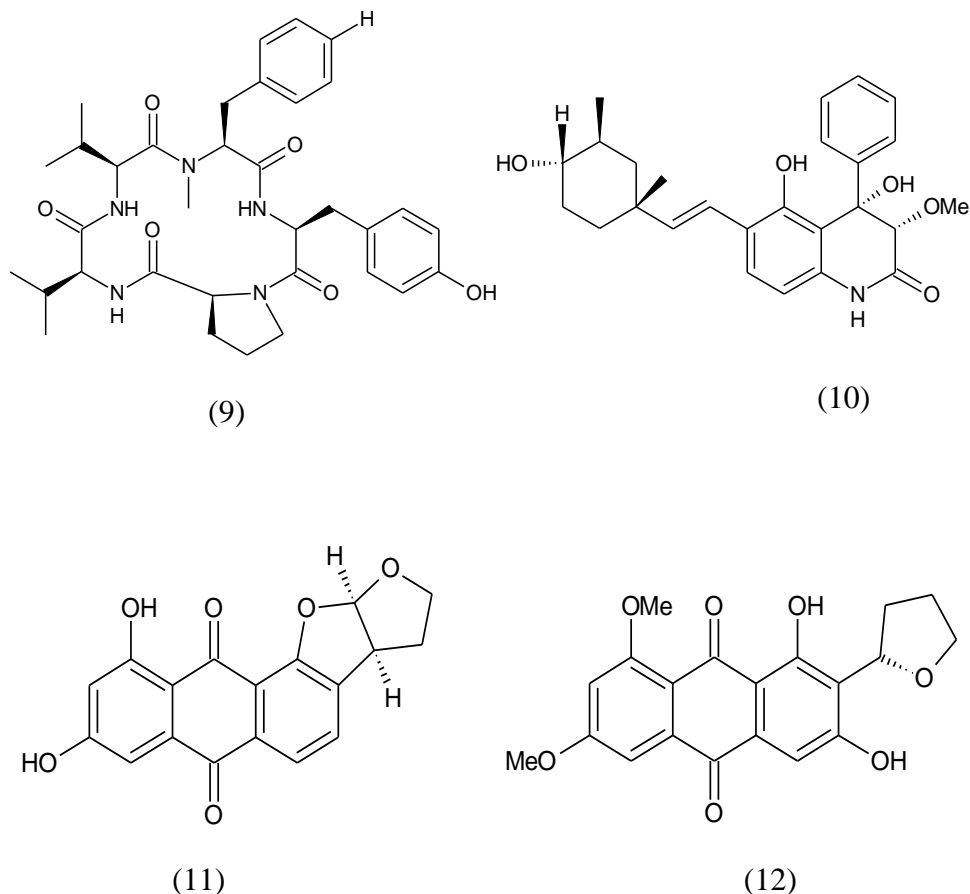
Media PDA dapat dibuat secara alami menggunakan ekstrak kentang dengan campuran *dextrose* dan agar-agar, selain itu PDA juga tersedia secara komersial. PDA secara komersial dapat mengandung sedikit perbedaan dalam segi nutrisi yang mempengaruhi ekspresi metabolit yang dihasilkan. Dalam penelitian ini menggunakan media PDA yang dibuat secara alami (Westphal *et al.*, 2019).

## 2.7. Kultivasi dan Ko-kultivasi

Kultivasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk menumbuhkan isolat dalam media buatan di luar habitat aslinya. Kultivasi berfungsi untuk memperbanyak jumlah mikroba dengan cara membiarkan mikroba tersebut memperbanyak diri dalam media biakan *in vitro* di laboratorium. Handayani dkk. (2019) melaporkan bahwa hasil kultivasi jamur endofit *Trichoderma koningiopsis* memiliki aktivitas antagonis terhadap bakteri *E. coli* dan diduga termasuk golongan terpenoid. Sedangkan pada penelitian lainnya melaporkan bahwa hasil kultivasi fungi endofit berpotensi memiliki senyawa metabolit alkaloid, flavonoid dan tanin (Bakhtra dkk., 2020).

Ko-kultivasi merupakan metode untuk memperbanyak mikroba dengan cara mengkultur secara bersamaan antara mikroba endofit dan inokulum bakteri dalam satu media kultur tertentu. Ko-kultivasi dilakukan diruang gelap disesuaikan dengan kondisi fungi endofit yang akan ditransformasi (Handayani, 2013). Teknik ko-kultivasi terhadap bakteri dapat mendorong fungi endofit mengeluarkan suatu zat yang mampu melindungi diri dari serangan bakteri maupun terjadinya kombinasi antara senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dengan bakteri tersebut. Hal ini ditandai dengan terjadinya peningkatan maupun penurunan kandungan dari senyawa metabolit sekunder. Senyawa yang berhasil diisolasi dari hasil ko-kultivasi seperti *cotteslosin C* (**9**), 22-epi-aflaquinolone B

(10) dan dua antrakuinon baru (11 dan 12) (Abdel-Wahab *et al.*, 2019). Berikut struktur senyawa dapat dilihat pada **Gambar 5**.



**Gambar 5.** Struktur senyawa *cotteslosin C* (9); 22-*epi*-aflaquinolone B (10); dan antrakuinon (11 dan 12) (Abdel-Wahab *et al.*, 2019).

## 2.8. Ekstraksi

Secara umum, ekstraksi merupakan proses pemisahan dimana distribusi analit antara dua fasa yang tidak bercampur dibuat untuk mencapai koefisien distribusi yang sesuai. Prosedur ekstraksi dilakukan secara berurutan dan sistematis menggunakan pelarut organik untuk mengekstrak senyawa. Salah satu metode ekstraksi secara tradisional disebut dengan ekstraksi cair-cair, metode ini membutuhkan banyak pelarut, sedangkan teknik ekstraksi secara modern seperti ekstraksi cairan superkritis, ekstraksi cairan bertekanan, ekstraksi dengan bantuan

gelombang mikro dan lainnya merupakan teknik ekstraksi modern yang digunakan sebagai alternatif untuk mengurangi penggunaan pelarut dan mempercepat proses ekstraksi (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Langkah pertama yang harus dilakukan untuk mendapatkan senyawa target yaitu pemilihan teknik ekstraksi. Ekstraksi yang tepat harus mempertimbangkan beberapa hal, seperti sifat kimia zat, ukuran partikel sampel, adanya zat pengganggu, waktu ekstraksi, suhu, serta pemilihan pelarut ekstraksi adalah parameter penting yang mempengaruhi ekstraksi. Kelarutan suatu zat dapat dipengaruhi oleh waktu ekstraksi dan suhu. Temperatur yang lebih tinggi secara bersamaan meningkatkan kelarutan dan kecepatan perpindahan massa serta menurunkan viskositas dan tegangan permukaan pelarut yang berkontribusi pada laju ekstraksi yang lebih tinggi (Mojzer *et al.*, 2016).

### **2.8.1. Ekstraksi Konvensional**

Meskipun memiliki beberapa kelemahan, ekstraksi cair-cair dan padat cair merupakan prosedur ekstraksi yang paling umum digunakan. Ekstraksi secara konvensional memiliki kelebihan seperti kemudahan dalam penggunaannya, efisiensi dan penerapan yang luas. Proses ekstraksi melibatkan pelarut konvensional seperti metanol, etanol, aseton, dietil eter, etil asetat dan pelarut lainnya, serta sering dicampur dengan proporsi air yang berbeda. Metode ini membutuhkan pelarut organik yang mahal dan kemungkinan berbahaya bagi kesehatan, dapat menimbulkan degradasi. Faktor degradasi dapat disebabkan oleh faktor eksternal dan internal. Cahaya, udara dan suhu merupakan faktor penting yang menimbulkan reaksi degradasi. Secara umum, ekstraksi konvensional dilakukan pada suhu 20° C hingga 50° C (Garcia-Salas *et al.*, 2010; Mojzer *et al.*, 2016).

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena mudah diuapkan, tidak higroskopis, memiliki

toksistas yang rendah dan bersifat semi polar sehingga dapat melarutkan senyawa-senyawa yang relatif kurang polar. Pada penelitian Da-Silva *et al.*, (2020) melaporkan bahwa ekstrak etil asetat fungi endofit berpotensi memiliki senyawa flavonoid, fenolik, saponin serta aktivitas antioksidan yang tinggi. Hasil analisis kromatografi fraksi etil asetat menghasilkan senyawa *orcinol*, *sorbicilin*, ergosterol dan 4-metoksimetilfenol.

## 2.9. Bakteri Uji

### 2.9.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* merupakan bakteri oportunistik gram negatif yang memiliki kemampuan adaptasi yang baik, infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini sulit diobati karena mikroorganisme ini menunjukkan resistensi yang tinggi (alami) terhadap banyak antibiotik seperti aminopenisilin, sefalosporin generasi pertama dan kedua serta kemampuan untuk mengembangkan resisten terhadap hampir semua obat antibakteri. *P. aeruginosa* tersebar luas di berbagai habitat seperti tanah, sungai, lingkungan rumah sakit dan tubuh manusia (Paprocka *et al.*, 2022; Behzadi *et al.*, 2021). *P. aeruginosa* merupakan spesies bakteri patogen yang menyebabkan infeksi dan penyakit pada tumbuhan dan hewan, termasuk beberapa penyakit terhadap manusia terutama pada pasien dan banyak infeksi yang didapat di rumah sakit (Azam *et al.*, 2019).

*P. aeruginosa* sering menyebabkan infeksi pada pasien onkologi terutama yang mengalami neutropenia. Bakteri ini mampu bertahan dalam lingkungan ekstrem, serta dapat bertahan hidup di lingkungan rumah sakit, menyebabkan infeksi dan wabah sporadis. *P. aeruginosa* juga dapat menyebabkan faktor virulensi yang merusak sel inang serta menghindari respon imun inang (Paprocka *et al.*, 2022). Menurut Juan *et al.* (2017) melaporkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* merupakan salah satu penyebab infeksi *nosocomial*, memperparah pasien dengan penyakit kritis, menyerang sistem kekebalan tubuh sehingga dapat menimbulkan kematian, menginfeksi sistem pernapasan, aliran darah, saluran kemih dan infeksi kulit.

Bakteri *P. aeruginosa* sensitif terhadap beberapa antibiotik seperti siprofloksasin (100%), kolistin (100%), sefepim (100%), dan piperasilin-tazobaktam (87%) (Dharmayanti dkk., 2019). Golongan senyawa yang diduga mempunyai aktivitas penghambat terhadap bakteri *P. aeruginosa* yaitu polifenol dan tanin (Setyowati dkk., 2019).

### **2.9.2. *Staphylococcus aureus***

Genus *Staphylococcus* termasuk dalam famili Staphylococcaceae yang mencakup 45 spesies dan 24 subspecies, sebagian besar bersifat aerob atau anaerob fakultatif. *S. aureus* merupakan bakteri gram positif yang memiliki mekanisme patogen yang membuatnya efektif dalam menyebabkan penyakit serta merupakan spesies utama dan paling virulen. *S. aureus* dapat memproduksi pigmen karotenoid yang mengubah koloninya menjadi warna kuning pada media padat, ini juga ditandai dengan katalase positif, oksidase negatif dan toleran terhadap garam. Bakteri ini sering ditemukan pada kulit dan mukosa hidung, di mana *S. aureus* hidup dalam hubungan komensalisme atau mutualisme. Kondisi merugikan ketika terjadi gangguan keseimbangan, yang menyebabkan penyakit menular pada inang menjadi patogen kuat dengan kemampuan menyerang aliran darah atau jaringan internal. *S. aureus* juga dapat menyebabkan infeksi kulit, jaringan lunak hingga infeksi yang lebih serius, seperti pneumonia nekrotikans, endokarditis, dan osteomielitis (Silva *et al.*, 2020). *S. aureus* mampu beradaptasi dengan baik terhadap beberapa antibiotik yang mengakibatkan terjadinya resisten. Beberapa antibakteri yang resisten terhadap *S. aureus* seperti semua jenis antibiotik penisilin, sefalosporin dan karbapenem, serta yang membuat  $\beta$ -lactam armamentarium tidak efektif secara klinis (Gajdacs, 2019).

### **2.9.3. *Escherechia coli***

*E. coli* termasuk dalam famili Enterobacteriaceae yang merupakan penghuni paling umum dari saluran pencernaan manusia dan hewan berdarah panas. Dalam tubuh manusia sebagian besar bakteri *E. coli* yang hidup di usus mencegah

kolonisasi oleh bakteri patogen dan mendukung inang dalam memproduksi vitamin K dan B12, yang penting dalam proses pembekuan darah dan pembentukan sel darah merah. Namun, beberapa bakteri *E. coli* juga dapat menyebabkan infeksi usus atau ekstraintestinal seperti infeksi saluran kemih, meningitis serta sepsis neonatorum. Strain patogen ini memiliki beberapa faktor virulensi yang memungkinkan mereka berkoloni, menyerang dan menyebabkan kerusakan pada inang. Pada bakteri *E. coli* perolehan resistensi terhadap agen antimikroba tertentu dapat dikaitkan dengan penurunan tingkat mikroorganisme, seperti yang ditemukan pada galur uropatogenik *E. coli*. Strain ini memiliki faktor virulensi tertentu yang memungkinkan bakteri menjajah saluran kemih dan menghasilkan sistitis, pielonefritis dan prostatitis, bahkan dapat mencapai aliran darah (Allocati *et al.*, 2013; Cepas *et al.*, 2020).

#### **2.9.4. *Bacillus sp.***

*Bacillus sp.* merupakan bakteri gram positif yang tersebar di berbagai kondisi lingkungan, di air, tanah serta berbagai produk makanan. Bakteri ini berbentuk batang, mampu menghasilkan spora dan bersifat aerobik atau anaerobik fakultatif. Sebagian besar spesies *Bacillus* tidak dianggap beresiko bagi manusia, sehingga digunakan untuk fermentasi beberapa makanan. Spesies *Bacillus* juga dapat sebagai patogen yang menyebabkan kontaminasi makanan atau sebagai agen infeksi. *Bacillus* merupakan patogen oportunistik yang menyebabkan infeksi lokal atau sistemik yang parah seperti endoftalmitis dan seftikemia. Beberapa jenis spesies *Bacillus* seperti *B. anthracis* dapat menginduksi penyakit mematikan anthrax pada manusia dan hewan, *B. cereus* dan *B. weihenstephanensis* dapat memproduksi racun *cereulide* yang merupakan penyebab utama keracunan makanan melalui penghambatan sintesis RNA, ini menyebabkan perluasan mitokondria dan pembentukan vakuola dalam protoplasma sel target sehingga membawa *apoptosis* sel dan gagal hati fulminan (Hu *et al.*, 2021; Romo-Barrera *et al.*, 2021).



## 2.10. Antibakteri

Antibiotik merupakan zat antimikroba yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh mikroorganisme. Zat ini banyak digunakan untuk menghambat infeksi bakteri pada manusia dan hewan. Penggunaan berlebih pada obat antibakteri dapat mengakibatkan terjadinya resisten obat pada strain bakteri, ini merupakan masalah global dan ancaman yang cukup berbahaya bagi kesehatan manusia (Serwecinska, 2020). Antibiotik yang sering digunakan yaitu  $\beta$ -laktam seperti penisilin dan sefalosporin, yang memiliki mekanisme kerja dengan penghancuran dinding sel bakteri. Pada patogen *monoderm* (membran tunggal dan pewarnaan gram positif) seperti *S. aureus*, mekanisme resisten yang dominan terjadi yaitu respon dari enzim  $\beta$ -laktam transpeptidase tidak reaktif, ini yang berfungsi dalam konstruksi dinding sel. Patogen diderma (membran ganda dan pewarnaan gram negatif) seperti *P. aeruginosa*, dengan mekanisme resisten yang dominan adalah ekspresi enzim hidrolitik yang menghancurkan cincin  $\beta$ -laktam yang menyebabkan krisis antibiotik (Fisher *et al.*, 2020).

## 2.11. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri merupakan teknik yang digunakan dalam menentukan potensi suatu zat dalam menghambat pertumbuhan suatu bakteri. Berbagai metode laboratorium dapat digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba *in vitro* dari ekstrak atau senyawa murni. Metode yang paling mendasar yaitu metode difusi cakram dan metode pengenceran kaldu (metode mikrodilusi). Pada metode difusi efektifitas suatu senyawa antibakteri ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk disekeliling *disk* setelah diinkubasi. Semakin besar zona hambatnya semakin besar kemungkinan senyawa tersebut sebagai agen antibakteri. Keuntungan dari metode difusi cakram yaitu metode yang sederhana, biaya yang rendah, kemampuan untuk menguji sejumlah besar mikroorganisme dan kemudahan untuk interpretasi data yang diperoleh.

Metode dilusi digunakan untuk mengukur aktivitas antibakteri *in vitro* secara kuantitatif. Metode ini biasanya untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dengan menggunakan *mikrotiter plate 96 wells*. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) yang diperoleh didefinisikan sebagai konsentrasi terendah zat antimikroba yang diuji dan dinyatakan dalam mg/L. Kelemahan utama dari metode mikrodilusi yaitu pekerjaan manual, resiko kesalahan dalam persiapan larutan antimikroba untuk setiap pengujian, serta jumlah reagen dan ruang yang dibutuhkan relatif besar (Balouiri *et al.*, 2016).

## **2.12. Kromatografi**

Kromatografi merupakan metode pemisahan yang melibatkan tiga komponen utama yaitu fase diam, fase gerak dan molekul atau zat yang terpisah (sampel). Fase diam selalu terdiri dari fase padat atau lapisan cairan yang teradsorpsi pada permukaan penyangga padat, fase gerak terdiri dari cairan (disebut sebagai kromatografi cair) sedangkan molekul yang dipisahkan adalah zat atau senyawa yang dipisahkan oleh interaksi antara fase gerak dan fase diam. Kromatografi cair biasa digunakan untuk sampel yang tidak stabil termal dan tidak mudah menguap, sedangkan gas kromatografi digunakan untuk sampel yang mudah menguap. Aplikasi metode kromatografi telah dikembangkan secara luas seperti diantaranya kromatografi kolom, kromatografi lapis tipis (KLT), kromatografi kertas, kromatografi gas, kromatografi penukar ion dan lain sebagainya (Ebere *et al.*, 2019).

### **2.12.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi adsorpsi padat-cair, dimana fase diam adalah zat adsorben padat yang dilapisi oleh pelat kaca sedangkan fase gerak berupa pelarut yang bergerak ke atas melalui fase diam. Sampel yang ditotolkan pada *bottom spot* akan terdorong ke atas dengan laju aliran yang berbeda, sehingga pemisahan analit tercapai. Laju pemisahan ke atas berdasarkan pada polaritas bahan, fasa padat dan pelarut yang sesuai. Dalam kasus di mana molekul sampel tidak berwarna, floresensi, radioaktivitas atau zat kimia tertentu, dapat

divisualisasi dengan menggunakan produk rekatif berwarna yang terlihat sehingga dapat mengidentifikasi posisinya pada kromatogram, misalnya visualisasi dengan ninhidrin, dragendorff dan dapat divisualisasi di bawah cahaya ruang atau sinar UV. Posisi setiap molekul dalam campuran dapat diukur dengan menghitung rasio antara jarak yang ditempuh oleh molekul dan pelarut. Nilai pengukuran ini disebut mobilitas relatif dan dinyatakan dengan simbol Rf (*retention factor*). Rumus dalam menghitung nilai Rf sebagai berikut:

$$R_f = \frac{\text{Jarak yang ditempuh solut (cm)}}{\text{Jarak yang ditempuh fase gerak (cm)}}$$

Sensitivitas KLT cukup tinggi sehingga dapat digunakan untuk memeriksa kemurnian sampel. Selain itu, KLT adalah teknik yang sederhana, hemat biaya dan mudah dioperasikan dalam kimia analitik dengan berbagai aplikasi yang digunakan dalam pengembangan obat baru atau berbagai jenis formulasi dari tanaman obat (Coskun, 2016; Ebere *et al.*, 2019).

### 2.12.2. Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan metode pemisahan senyawa berdasarkan polaritasnya. Kromatografi kolom memanfaatkan perbedaan kepolaran sampel dan dapat dengan mudah memisahkan senyawa dengan laju di mana senyawa melintasi fase diam kolom. Dalam kromatografi kolom, fase diam yang digunakan adalah padatan dan fase gerak berupa cairan atau campuran beberapa pelarut. Urutan kepolaran pelarut dapat dilihat pada **Tabel 1**.

Persiapan dalam kromatografi kolom yaitu dengan mencampur fase diam dan fase gerak yang sesuai dan dituangkan ke dalam kolom kaca. Secara umum, metode yang digunakan pada kromatografi kolom dapat secara metode basah yaitu bubuk silika dan pelarut disiapkan dan kemudian dituangkan secara bersama ke dalam kolom menggunakan corong sampai silika mengendap, sedangkan pada metode kering kolom diisi dengan silika bubuk kering, selanjutnya fasa gerak (pelarut)

yang sesuai dimasukkan ke dalam kolom sampai silika basah dan mengendap. Kemudian sampel dimasukkan ke dalam kolom kaca dan dialiri fase gerak. Campuran senyawa bergerak bersama dengan fase gerak melalui fase diam dan memisahkan sampel berdasarkan kepolarannya. Senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang lebih tinggi akan tertinggal pada fasa diam sedangkan senyawa dengan tingkat kepolaran rendah akan turun lebih dahulu (Ebere *et al.*, 2019).

**Tabel 1.** Urutan kepolaran pelarut (Polita *et al.*, 2020).

	Non-polar
Sikloheksana	↓
Toluena	
Klorobenzena	
Kloroform	
Dietil eter	
THF	
EDC	
Sikloheksanon	
DMF	
Isopropanol	
DMSO	
Aseton	
Etanol	
Asetonitril	
Metanol	

## 2.13. Karakterisasi Senyawa

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

LC-MS merupakan teknik kimia yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik kromatografi cair dengan kemampuan analisis massa. Spektrometer massa bekerja dengan mengionisasi molekul kemudian menyortir dan mengidentifikasi ion berdasarkan rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ). MS dapat dibagi menjadi tiga bagian mendasar, yaitu sumber ionisasi, penganalisis dan detektor. Sampel dimasukkan ke dalam sumber ionisasi instrumen, selanjutnya molekul sampel terionisasi dan diekstraksi ke dalam daerah penganalisis spektrometer massa dimana sampel dipisahkan menurut rasio massa terhadap muatan ( $m/z$ ). Ion-ion

yang terpisah dideteksi dan sinyal akan terkirim ke sistem data dimana rasio  $m/z$  disimpan bersama dengan kelimpahan relatif yang kemudian disajikan dalam bentuk spectrum  $m/z$ . Sistem LC-MS dapat memecah ion induk menjadi pola fragmentasi yang khas dan dapat memisahkan ion anak untuk identifikasi dan kuantisasi. Pola fragmentasi karakteristik dari setiap ion induk dapat diidentifikasi dengan membandingkan pola fragmentasi yang dihasilkan dengan database standar (McMaster, 2005; Tilvi *et al.*, 2014).

### **2.13.2. *Fourier Transform Infrared (FT-IR)***

Spektroskopi inframerah merupakan metode untuk mengidentifikasi suatu gugus fungsi dan tipe ikatan tertentu pada suatu molekul. Metode ini didasarkan pada penyerapan atau adsorpsi energi radiasi inframerah yang menyebabkan terjadinya vibrasi atau getaran. Vibrasi yang terjadi bergantung pada kekuatan ikatan atau momen dipol. Suatu molekul yang memiliki momen dipol yang berbeda akan bervibrasi dan menghasilkan frekuensi yang berbeda (Fessenden, 1986).

Daerah pada bilangan gelombang  $400-4500\text{ cm}^{-1}$  merupakan daerah optimum untuk penyerapan sinar IR bagi ikatan-ikatan dalam senyawa organik. Suatu ikatan kimia dapat bervibrasi sesuai dengan level energinya sehingga memberikan level yang spesifik. Daerah inframerah terbagi menjadi sub daerah, yaitu inframerah dekat ( $14000-4000\text{ cm}^{-1}$ ), inframerah sedang ( $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ) dan inframerah jauh ( $400-10\text{ cm}^{-1}$ ) (Stuart, 2004).

### III. METODE PENELITIAN

#### 3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan September 2021 - September 2022 yang bertempat di Laboratorium Biopolimer Universitas Lampung. Identifikasi morfologi fungi secara mikroskopi menggunakan mikroskop *axio Zeiss Al*, uji antibakteri serta analisis spektrometri *Fourier Transform Infrared* (FT-IR) dilakukan di Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung. Analisis *liquid chromatography-mass spectrometry* (LC-MS/MS) dilakukan di Badan Reserse Kriminal Polri (Bareskrim) Pusat Labolatorium Forensik Sentul, Bogor.

#### 3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu pipet tetes, gelas kimia, Erlenmeyer, tabung reaksi, gelas ukur, cawan petri, kaca objek, corong pisah, *cutter*, kapas, kasa, karet gelang, tissue, pinset, jarum ose, botol vial, mikroskop *axio Zeiss Al*, *autoclave* Tomy SX-700, *rotary evaporator* Buchi/R 210, *hospitex diagnostics*, lampu UV Kohler/SN402006, *incubator* Memmert-Germany/INC-02, neraca analitik *Wigen Houser*, *laminar air flow cabinet*, satu set perlengkapan kromatografi lapis tipis (KLT), satu set perlengkapan kromatografi kolom, *hot plate*, mikropipet, *microplate 96 wells*, *drying oven* Jisico, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) LC sistem: ACQUITY UPLC®*H-Class system*; LC kolom C18 (1,8  $\mu\text{m}$ ; 2,1x100 mm) dan spektrometer massa Xevo G2-S QTof (*waters*, USA) dan *Fourier Transform Infrared* (FT-IR).

Bahan-bahan yang digunakan yaitu kentang, agar-agar, *dextrose*, *Tryptic Soy Broth* (TSB), resazurin, aquades, alkohol 70%, plastik wrap, *aluminium foil*, pereaksi serium sulfat ( $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ ), pereaksi dragendorff, *n*-heksana destilasi, etil asetat (EtOAc) destilasi, metanol (MeOH) destilasi, aseton destilasi, MeOH (PA), antibiotik (*ciprofloxacin* dan *chloramfenicol*), *metilen blue*, plat KLT silika gel 60 F<sub>254</sub>, silika gel *Merck* 60 (35-70 Mesh), bakteri *E. coli* dan *Bacillus sp.* diperoleh dari deposit yang ada di Laboratorium Biokimia Universitas Lampung, dan bakteri *P. aeruginosa* serta *S. aureus* diperoleh dari deposit yang ada di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.

### **3.3. Prosedur Penelitian**

#### **3.3.1. Biomaterial**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini yaitu tumbuhan sungkai (*P. canescens*). Sampel tumbuhan sungkai diperoleh dari lingkungan Universitas Lampung, Bandar Lampung dengan titik koordinat 5°21'54,0 LS, 105°14'25,2 BT. Sampel yang digunakan merupakan kandidat isolat dari hasil kerja sebelumnya.

#### **3.3.2. Tahapan Mendapat Isolat dan Peremajaan**

Mikroba endofit diisolasi dari daun tumbuhan sungkai. Bagian daun masing-masing dipotong dengan menggunakan pisau steril menjadi empat bagian kecil ( $\pm 1$  cm). Selanjutnya, dicelupkan ke dalam larutan alkohol 70% untuk sterilisasi dan dibilas dengan akuades steril selama  $\pm 1$  menit untuk menghentikan sterilisasi. Selanjutnya, diletakkan ke dalam cawan petri yang berisi media PDA dengan menggunakan pinset steril, ditutup dan di simpan pada suhu ruang. Pengamatan secara makroskopik dilakukan setiap hari hingga mikroba endofit tumbuh. Mikroba yang menunjukkan sifat morfologi yang berbeda dipindahkan dengan menggunakan teknik gores pada media PDA baru (Chen *et al.*, 2015).

Pembuatan media PDA merujuk pada (Griffith GW *et al.*, 2007) dengan beberapa modifikasi. PDA dibuat dari 100 gram kentang yang direbus dalam 500 mL akuades, filtrat yang diperoleh diambil 100 ml ditambah 2% *dextrose* dan 2% agar-agar sambil dipanaskan. Setelah tercampur, disterilisasi dengan *autoclave* pada 1 atm, 121° C selama 15 menit. Penambahan antibiotik *ciprofloxacin* 50 µg/mL dilakukan dalam keadaan steril di dalam *laminar air flow cabinet*.

### 3.3.3. Kultivasi dan Ko-kultivasi Mikroba Endofit

Kultivasi dilakukan berdasarkan metode Trisuwan *et al.* (2008) dengan beberapa modifikasi. Mikroba endofit dikultivasi pada media cair *potato dextrose broth* (PDB) sebanyak 25 mL ekstrak kentang dan 2% *dextrose*. Media disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121° C selama 15 menit, kemudian media diinokulasi dengan isolat fungi sebanyak 1-2 ose dan diinkubasi selama 7-14 hari pada temperatur ruang dalam keadaan statis.

Ko-kultivasi dilakukan berdasarkan metode Ola *et al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Ko-kultivasi menggunakan media cair PDB sebanyak 25 mL (ekstrak kentang dan 2% *dextrose* dalam keadaan steril). 12,5 mL merupakan isolat fungi dan 12,5 mL isolat bakteri *P. aeruginosa* (yang ditumbuhkan pada media PDB dan diinkubasi selama 48 jam), kemudian kaldu fungi serta kaldu bakteri dicampurkan dan diinkubasi selama 14 hari dalam suhu ruang.

### 3.3.4. Ekstraksi Cair-Cair

Hasil kultivasi dan ko-kultivasi dari isolat fungi diekstraksi cair-cair dengan pelarut EtOAc, kemudian dipartisi menggunakan corong pisah. Larutan diguncangkan beberapa kali dan didiamkan hingga membentuk 2 fasa lalu dipisahkan sehingga diperoleh 2 fraksi yakni fraksi EtOAc dan fraksi H<sub>2</sub>O. Hasil dari partisi ditampung, diambil fraksi EtOAc untuk dipekatkan menggunakan *evaporator* hingga diperoleh ekstrak kasar, yang kemudian hasilnya digunakan untuk skrining bioaktivitas (Trisuwan *et al.*, 2008).



### 3.3.5. Uji Skrining Bioaktivitas

Ekstrak hasil kultur selanjutnya diuji skrining untuk mengetahui aktifitasnya. Uji skrining bioaktivitas dilakukan dengan metode dilusi menggunakan sumuran *microtiter plate 96 wells* (Balouiri *et al.*, 2016) dengan beberapa modifikasi. Bakteri uji yang digunakan adalah *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E.coli*, dan *Bacillus sp.*

#### 3.3.5.1. Persiapan Bakteri

Bakteri *P. aeruginosa* dan *S. aureus* yang dipakai dalam uji merupakan isolat dari laboratorium UPT-LTSIT, sedangkan *E.coli* dan *Bacillus sp.* merupakan isolat dari laboratorium Biokimia Universitas Lampung. Bakteri diremajakan dalam media *Trypthic Soy Agar* (TSA) dan diinkubasi selama 18 jam.

#### 3.3.5.2. Persiapan Ekstrak Fungi Endofit

Ekstrak fungi dan antibiotik disiapkan dalam konsentrasi 2000 ppm. Pada uji ini antibiotik yang digunakan adalah *ciprofloxacin* yang dilarutkan dalam metanol PA 12,5%.

#### 3.3.5.3. Skrining dengan Bakteri *P. aeruginosa*

Uji skrining menggunakan *microplate 96 wells* dengan 3 kali pengulangan. Pada sumuran blanko ditambahkan 195  $\mu$ L media TSB dan 25  $\mu$ L inokulum bakteri. Kontrol negatif ditambahkan 145  $\mu$ L media TSB, 50  $\mu$ L pelarut metanol (MeOH PA 12,5%) dan 25  $\mu$ L inokulum bakteri. Kontrol positif ditambahkan 145  $\mu$ L media TSB, 50  $\mu$ L antibiotik (*ciprofloxacin*) dan 25  $\mu$ L inokulum bakteri. Sumuran sampel ditambahkan 145  $\mu$ L media TSB, 50  $\mu$ L sampel dengan konsentrasi 2000 ppm dan 25  $\mu$ L inokulum bakteri. Kontrol media berisi 220  $\mu$ L media TSB. Diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37° C dan ditambahkan larutan resazurin 30  $\mu$ L pada semua kontrol dan sampel, kemudian diinkubasi

kembali selama 4 jam serta diukur nilai OD<sub>600</sub> nm dengan menggunakan *hospitex diagnostic* (Elshikh *et al.*, 2016).

### **3.3.6. Ko-kultivasi Fungi Endofit (*Scaling up*)**

Ko-kultivasi dilakukan dengan mencampurkan strain fungi endofit dengan inokulum bakteri *P. aeruginosa*. Ko-kultivasi dilakukan dalam botol gelap 2,5 L yang berisi 250 mL strain fungi endofit yang ditumbuhkan dalam ekstrak kentang dan 2% *dextrose* dalam keadaan statis. Inokulum bakteri ditumbuhkan dalam botol gelap 2,5 L yang berisi 250 mL ekstrak kentang dan 2% *dextrose* dan diinkubasi selama 48 jam. Kaldu fungi 250 mL selanjutnya dicampurkan dengan kaldu bakteri *P. aeruginosa* dan diinkubasi selama 14-21 hari dalam kondisi statis. Ko-kultivasi dilakukan dengan 3 kali pengulangan, kemudian hasil ko-kultur diekstraksi dengan pelarut etil asetat dan dipekatkan dengan *ratory evaporator* (Ola *et al.*, 2013).

### **3.3.7. Analisis Morfologi Fungi secara Mikroskopis**

Identifikasi fungi dilakukan dengan metode *slide culture*. Metode ini dilakukan dengan cara menempelkan *coverslip* pada media agar dengan sudut 45°, kemudian isolat yang terpilih diinokulasi berdekatan dengan *coverslip*. Setelah 2-3 hari, *coverslip* diambil dari media dan ditambahkan *methylene blue*. *Coverslip* diletakkan pada kaca preparat dan diamati di bawah mikroskop (Mcclenny, 2015).

### **3.3.8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)**

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan untuk mengetahui pola pemisahan senyawa yang terdapat pada sampel. Ekstrak kasar yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji KLT, menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub> sebagai fasa diam dan sebagai fasa gerak menggunakan campuran beberapa pelarut. Eluen yang digunakan merupakan campuran dari beberapa pelarut dengan perbandingan tertentu. Selanjutnya dilakukan elusi terhadap plat KLT, bercak atau noda dilihat dibawah

sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm. Hasil kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi serium sulfat untuk mengetahui kandungan senyawa organik ditandai dengan adanya noda berwarna coklat kehitaman dan pereaksi dragendorff untuk mengetahui kandungan alkaloid (gugus N tersier) yang ditandai dengan adanya noda berwarna merah jingga (*orange*) pada kromatogram KLT (Fathoni *et al.*, 2021).

### **3.3.9. Pemurnian Menggunakan Kolom Kromatografi**

Ekstrak yang telah diketahui sifat bioaktivitasnya kemudian difraksinasi lebih lanjut menggunakan kolom kromatografi (KK). Fraksinasi dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel dan fase gerak dengan beberapa sistem gradien pelarut (polar dan non-polar). Silika gel dimasukkan perlahan ke dalam kolom kaca kemudian dielus dengan pelarut sebagai fase gerak. Setelah kolom siap, sampel dimasukkan ke dalam kolom dan fase gerak di alirkan melalui kolom. Pita senyawa linarut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah dan dikumpulkan berupa fraksi (Gritter *et al.*, 1991).

### **3.3.10. Karakterisasi Senyawa**

Fraksi unggul selanjutnya dikarakterisasi dengan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) untuk mengetahui kandungan senyawa dan konfirmasi gugus fungsi dilakukan dengan *Fourier Transform-Infrared* (FT-IR).

## V. SIMPULAN DAN SARAN

### 5.1. Simpulan

Adapun simpulan yang dapat diperoleh dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Telah berhasil diisolasi 8 fungi endofit yang berasosiasi dengan daun tumbuhan sungkai.
2. Hasil skrining bioaktivitas menggunakan bakteri *P. aeruginosa* terhadap masing-masing ekstrak kultivasi dan ko-kultivasi tidak menunjukkan adanya aktivitas sebagai antibakteri.
3. Hasil visualisasi fraksi-fraksi kolom dengan pereaksi dragendorff menunjukkan hasil positif pada fraksi 8 sampai 12.
4. Hasil karakterisasi fraksi NV27 menggunakan LC-MS/MS pada waktu retensi 14.59 menit dengan ion molekul  $[M+H]^+$  pada  $m/z$  353.1971 memiliki formula molekul  $C_{20}H_{24}N_4O_2$  dengan prediksi senyawa golongan alkaloid sebagai turunan purin.

### 5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil uji antibakteri terhadap sampel fungi endofit dari daun tumbuhan sungkai tidak menunjukkan adanya aktivitas sebagai antibakteri. Analisis lebih lanjut pada fraksi NV27 (positif pereaksi dragendorff) dengan menggunakan LC-MS/MS, hasil analisis diprediksi sebagai golongan senyawa alkaloid dengan turunan purin. Menurut penelitian, turunan purin dapat berpotensi sebagai antiplasmodium dan antioksidan.

Berdasarkan pemaparan diatas, untuk lebih lanjut peneliti menyarankan:

1. perlu dilakukan pengujian lebih lanjut terhadap fraksi NV27 seperti uji aktivitas antiplasmodium dan antioksidan.
2. Perlu dilakukan analisis lebih lanjut dengan menggunakan *nuclear magnetic resonance* (NMR).
3. perlu dilakukan identifikasi morfologi terhadap semua isolat fungi yang telah diisolasi.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdel-Wahab, N.M., Scharf, S., Ozkaya, F.C., Kurtan, T., Mandi, A., Fouad, M.A., Kamel, M.S., Muller, W.E.G., Kaischeuer, R., Lin, W., Daletos, G., Ebrahim, W., Liu, Z., and Proksch, P. 2019. Induction of Secondary Metabolites from the Marine-Derived Fungus *Aspergillus versicolor* through Co-Cultivation with *Bacillus subtilis*. *Planta Medica*. 85(6): 503-512.
- Abdiyani, S. 2008. Keanekaragaman Jenis Tumbuhan Obat di Dataran Tinggi Dieng. *Jurnal Penelitian Hutan dan Pelestarian Alam*. 5(1): 79-92.
- Ahmad, I., dan Ibrahim, A. 2015. Bioaktivitas Ekstrak Metanol dan Fraksi N-Heksana Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(3): 114-119.
- Aldughaylibi, F.S., Raza, M.A., Naeem, S., Rafi, H., Alam, M.W., Souayeh, B., Farhan, M., Aamir, M., Zaidi, N., and Mir, T.A. 2022. Extraction of Bioactive Compounds for Antioxidant, Antimicrobial, and Antidiabetic Application. *Molecules*. 27(18): 5935.
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., and Di Ilio, C. 2013. *Escherichia coli* in Europa: an Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 10(12): 6235-6254.
- Azam, M.W., and Khan, A.U. 2019. Updates on the Pathogenicity Status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*. 24(1): 350-359.
- Bakhtra, D.W.A., Eriadi, A., dan Putri, S.R. 2020. Skrining Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav.). *Jurnal Farmasi Higea*. 12(1): 99-108.
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity : A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2): 71-79.
- Behzadi, P., Barath, Z., and Gajdacs, M. 2021. It's Not Easy Being Green: A Narrative Review on the Microbiology, Virulence and Therapeutic Prospects of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 10(1): 42.

- Busby, E.P., Ridout, M., and Newcombe, G. 2015. Fungal Endophytes : Modifiers of Plant Disease. *Journal Plant Molecular Biology*. 90(6): 645-655.
- Cepas, V., and Soto, S.M. 2020. Relationship Between Virulence and Resistance Among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics*. 9(10): 719.
- Chen, H., Daletos, G., Abdel-Azis, M.S., Thormy, D., Dai, H., Brotz-Oesterhelt, H., Lin, W., and Prosch, P. 2015. Inducing Secondary Metabolites Production by the Soil-dwelling Fungus *Aspergillus terreus* Through Bacterial Co-Culture. *Phytochemistry Letters*. 12: 35-41.
- Coskun, O. 2016. Separation Techniques: Chromatography. *Journal Review Biochemistry*. 3(2): 156-160.
- Da-Silva, M.H.R., Cueva-Yesquen, L.G., Junior, S.B., Garcia, V.L. Sartoratto, A., De Angelis, D.D.F., and De Angelis, D.A. 2020. Endophytic Fungi from *Passiflora incarnata*: an Antioxidant Compound Source. *Archives of Microbiology*. 202(10): 2779-2789.
- Dharmayanti, I.G.A.M.P., dan Sukrama, D.M. 2019. Karakteristik Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan Pola Kepekaannya terhadap Antibiotik di Intensive Care Unit (ICU) RSUP Sanglah pada Bulan November 2014 - Januari 2015. *E-Jurnal Medika*. 8(4): 2303-1395.
- Ebere, E.C., Obinna, I.B., and Wirnkor, V.A. 2019. Applications of Column, Paper, Thin Layer and Ion Exchange Chromatography in Purifying Samples: Mini Review. *SF Journal of Pharmaceutical and Analytical Chemistry*. 2(2): 1018.
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., and Banat, I.M. 2016. Resazurin-Based 96-Well Plate Microdilution Method for the Determination of Minimum Inhibitory Concentration of Biosurfactants. *Biotechnology Letters*. 38(6): 1015-1019.
- Fadlilaturrahmah, F., Putra, A.M.P., Rizki, M.I. dan Nor, T. 2021. Uji Aktivitas Antioksidan dan Antitirozinase Fraksi *n*-Butanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) secara Kualitatif Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Pharmascience*. 8(2): 90-101.
- Fathoni, A., Hudiyono, S., Budianto, E., Cahyana, A.H., dan Agusta, A. 2021. Metabolite Detection and Antibacterial Activity of Fungal Endophytic Extracts Isolated from Brotowali (*Tinospora crispa*) Plants Using TLC-Bioautography Assay. *Journal Materials Science and Engineering*. 1011(1): 012041.
- Fessenden, R.J., dan Fessenden., J.S. 1986. *Kimia Organik Dasar Edisi Ketiga Jilid 2*. Terjemahan A.H. Pudjaatmaka. Erlangga. Jakarta.

- Fisher, J.F and Mobashery, S. 2020. Constructing and Deconstructing the Bacterial Cell Wall. *Journal Protein Science*. 29(3): 629-646.
- Fransiska, D., Kahanjak, D.N., dan Frethernety, A. 2020. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Cakram Kirby-Bauer. *Jurnal Pengelolaan Lingkungan Berkelanjutan*. 4(1): 460-470.
- Fletcher, I., Freer, A., Ahmed, A., and Fitzgerald, P. 2019. Effect of Temperature and Growth Media on Mycelium Growth of *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* Strains. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*. 2(5): 1-5.
- Gajdacs, M. 2019. The Continuing Threat of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*. 8(2): 52.
- Garcia-Salas, P., Morales-Soto, A., Segura-Carretero, A., and Fernandez-Gutierrez, A. 2010. Phenolic: Compound Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*. 15(12): 8813-8826.
- Gouda, S., Das, G., Sen, S.K., Shin, H.S., dan Patra, J.K. 2016. Endophytes: a Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal Importance. *Journal Frontiers in Microbiology*. 7: 1538.
- Griffith, G.W., Easton, G. L., Detheridge, A., Roderick, K., and Parkins, W. T. 2007. Copper Deficiency in Potato Dextrose Agar Causes Reduced Pigmentation in Cultures of Various Fungi. *Journal Federation of European Microbiological Societies*. 273(2): 165-171.
- Gritter, R.J., Bobbit, J.M., and Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi*. Terjemahan Kosasih Padmawinata. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Hameed, A., Hussain, S.A., Yang, J., Ijaz, M. U., Liu, Q., Suleria, H. A. R., and Song, Y. 2017. Antioxidants Potential of the Filamentous Fungi (*Mucor circinelloides*). *Nutrients*. 9(10): 1101.
- Handayani, D., Pratiwi, E.M.I., dan Fajrina, A. 2019. Senyawa Antimikroba dari Jamur Endofit *Trichoderma koningiopsis* SaKB1 yang Diisolasi dari Tanaman Mangrove *Sonneratia alba* Sm. *Jurnal Farmasi dan Klinis*. 6(2): 78-84.
- Handayani, T. 2013. Penggunaan *Agrobacterium Tumefaciens* Sebagai Perantara Dalam Transformasi Genetik Pada Rumput Laut. *Jurnal Oseana*. 38(4): 17-25.
- Hassani, M.A., Duran, P., and Hacquard, S. 2018. Microbiol Interactions Within the Plant Holobiont. *Journal Microbiome*. 6(1): 1-17.



- Hu, Q., Fang, Y., Zhu, J., Xu, W., and Zhu, K. 2021. Characterization of *Bacillus Species* from Market Foods in Beijing, China. *Journal Processes*. 9(5): 866.
- Hurdeal, V.G., Gentekaki, E., Hyde, K.D., Nguyen, T.T., and Lee, H.B. 2021. Novel *Mucor* Species (*Mucormycetes*, *Mucoraceae*) from Northern Thailand. *Journal of Mycokeys*. 84: 57-78.
- Ibrahim, A., Arifuddin, A.P., Cahyo, W., Widayat, W., and Bone, M. 2019. Isolation and Characterization Endophytic Fungal Isolate from *Peronema canescens* Jack Leaf and *Coptosapelta tomentosa* Val. K. Heyne Root. *Journal of Tropica Pharmacy and Chemistry*. 4(5): 215-225.
- Izzatinnisa, Utami, U., dan Mujahidin, A. 2020. Uji Antagonis beberapa Fungi Endofit pada Tumbuhan Kentang terhadap *Fusarium oxysporum* secara In Vitro. *Jurnal Riset Biologi dan Aplikasinya*. 2(1): 18-21.
- Jalgaonwala, R.E., Mohite, B.V., dan Mahajan, R.T. 2011. A Review: Natural Products from Plant Associated Endophytic Fungi. *Journal Microbiol Biotechnol Res*. 1(2): 21-32.
- Juan, C., Pena, C., and Oliver, A. 2017. Host and Pathogen Biomarkers for Severe *Pseudomonas aeruginosa* Infaction. *The Journal of Infectious Diseases*. 215(1): 44-51.
- Kementerian Kesehatan RI. 2011. *Pedoman Umum Penggunaan Antibiotik*. Kemenkes. RI. Jakarta.
- Kitagawa, I., Simanjuntak, P., Hori, K., Nagami, N., Mahmud, T., Shibuya, H., and Kobayashi, M. 1994. Indonesian Medicinal Plants VII Seven New Clerodane Type Diterpenoids, Peronemins A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C<sub>1</sub>, and D<sub>1</sub>, from the Leaves of *Peronema canescens* (*Verbenaceae*). *Journal Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 42(5): 1050-1055.
- Latief, M., Tarigan, I.L., Sari, P.M., dan Aurora, F.E. 2021. Aktivitas Antihiperurisemia Ekstrak Etanol Daun Sungkai (*Peronema canescens* Jack) pada Mencit Putih Jantan. *Pharmacon: Jurnal Farmasi Indonesia*. 18(1): 23-27.
- Lopera-Valle, A., and Elias, A. 2019. Amine Responsive Poly(Lactic Acid) (PLA) and Succinic Anhydride (SAh) Graft-Polimer: Synthesis and Characterization. *Polymers*. 11(9); 1466.
- Maadon, S.N. Wakid, S.A. Zainudin, I. Rusli, L.S. 2022. Isolation and Identification of Endophytic Fungi from UiTM Reserve Forest, Negeri Sembilan. *Sains Malaysiana*. 47(12): 325-3030.

- Marmann, A., Aly, A. H., Lin, W., Wang, B., and Proksch, P. 2014. Co-Cultivation-A Powerful Emerging Tool for Enhancing the Chemical Diversity of Microorganisms. *Marine Drugs*. 12(2): 1043-1065.
- Marx, H.E., O'Leary, N., Yuan, Y.W., Lu-Irving, P., Tank, D.C., Mulgura, M.E., and Olmstead, R.G. 2010. A Molecular Phylogeny and Classification of *Verbenaceae*. *American Journal of Botany*. 97(10): 1647-1663.
- McClenny, N. 2005. Laboratory Detection and Identification of *Aspergillus species* by Microscopi Observation and Cultur : the Traditional Approach. *Journal Medical Mycology*. 43(1): 125-128.
- McMaster, M.C. 2005. *LC-MS : A Practical User's Guid*. John Wiley and Sons, ICN., Publication.
- Meyer, B.H., Ferrigni, N.R. Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E.J., and McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp : A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica*. 45(5): 31-34.
- Mohamed, H., Awad, M.F., Shah, A.M., Sadaqat, B., Nazir, Y., Naz, T., Yang, W., and Song, Y. 2022. Coculturing of *Mucor plumbeus* and *Bacillus subtilis* Bacterium as an Efficient Fermentation Strategy to Enhance Fungal Lipid and Gamma-Linolenic Acid (GLA) Production. *Scientific Reports*. 12(1) : 1-14.
- Mojzer, E.B., Hrcic, M.K., Skerget, M., Knez, Z., and Bren, U. 2016. Polyphenols: Extraction Methods Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenis Effects. *Molecules*. 21(7): 901.
- Muharni, M., Ferlinahayati, F., and Yohandini, H. 2021. Antibacterial, Total Phenolic and Flavonoid Contents of Sungkai Leaves (*Peronema canescens*). *Journal of Natural Product Reasearch Group*. 5(3): 528-533.
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., and Pognan, F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (Resazurin) Fluorescent Dye for the Assessment of Mammalian Cell Cytotoxicity. *Journal of Biochemistry*. 267(17): 5421-5426.
- Paprocka, P., Durnas, B., Mankowska, A., Krol,G., Wollny, T., and Bucki, R. 2022. *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cancer Patients. *Journal of Pathogens*. 11(6): 679.
- Polita, A., Toliautas, S., Zvirblis, R., and Vysniauskas, A. 2020. The Effect of Solvent Polarity and Molecular Rotor Bodipy-C 10. *Journal of Physical Chemistry Chemical Physics*. 22(6): 8296-8303.

- Purwantisari, S., dan Hastuti, R.B. 2009. Isolasi dan Identifikasi Jamur Indigenous Rhizosfer Tanaman Kentang dari Lahan Pertanian Kentang Organik di Desa Pakis, Magelang. *Jurnal Bioma*. 11(2): 45-53.
- Raakhee, T., and Rao, U.S. 2014. Prevalence and Resistance Pattern of *Pseudomonas* Strains Isolated from ICU Patients. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(3): 527-534.
- Romo-Barrera, C.M., Castrillon-Revera, L.E., Palma-Ramos, A., Castaneda-Sanchez, J.I., and Luna-Herrera, J. 2021. *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, Probiotics that Induce the Formation of Macrophage Extracellular Traps. *Microorganisms*. 9(10): 2027.
- Rosemeyer, H. 2004. The Chemodiversity of Purine as a Constituent of Natural Products. *Journal Chemistry and Biodiversity*. 1: 361-401.
- Rustini, R., Jamsari, J., Marlina, M., Zubir, N., and Yuliandra, Y. 2017. Antibacterial Resistance Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Clinical Sampel at a General Hospital in Padang, West Sumatra, Indonesia. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(8): 158-160.
- Safaei-Ghomi, J., and Masoomi, R. 2015. An Efficient Comparison of Methods Involving Conventional, Grinding and Ultrasound Conditions for the Synthesis of Fulleroisoxazolines. *Ultrasonics Sonochemistry*. 23; 212-218.
- Serwecinska, L. 2020. Antimicrobials and Antibiotic-Resistant Bacteria: a Risk to the Environment and to Public Health. *Journal of Water*. 12(12): 3313.
- Setyowati, E., Retnowati, E., Rosita, V., dan Rosiana, L.H. 2019. Skrining Aktivitas Antibakteri Tanaman Famili *Myrtaceae* terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Farmasi*. 4(1): 6-11.
- Shatokhin, S.S., Tuskaev, V.A., Gagieva, S.C., Markova, A.A., Pozdnyakov, D.I., Denisov, G.L., Melnikova, E.K., Bulychev, B.M., and Oganessian, E.T. 2022. Synthesis, Cytotoxicity and Antioxidant Activity of New 1,3-Dimethyl-8-(Chromon-3-yl)-Xanthine Derivatives Containing 2,6-di-Tert-Butylphenol Fragments. *Journal Chemistry*. 46 (2): 621-631.
- Silva, V., Capelo, J.L., Igrejas, G., and Poeta, P. 2020. Molecular Epidemiology of *Staphylococcus aureus* Lineages in Wild Animals in Europa: A Review. *Antibiotics*. 9(3). 122.
- Simanjuntak, P. 1996. Studi Kimia Senyawa Glikosida Tumbuhan Sungkei, *Peronema canescens* (*Verbenaceae*). *Jurnal Kimia Terapan Indonesia*. 6: 1-2.

- Sinulingga, S., Fatmawati, F., Subandrate, S., Irfannudin, I., Susilawati, S., dan Yana, R. 2021. Sungkai Leaf Potential as Herbal Medicine. *In Conferences of Medical Sciences Dies Natalis*. 3(1): 72-76.
- Strobel, G., and Daisy, B., 2003. Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Journal Microbiology and Molecular Biology Review*. 67(4): 491-502.
- Stuart, B. 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. Chichester: John Wiley & Sons. Halaman 46-48.
- Tan, R.X., and Zou, W.X. 2001. Endophytes : a Rich Source of Functional Metabolite. *Journal Natural Product Reports*. 18(4): 448-459.
- Tilvi, S., Majik, M.S., and Singh, K.S. 2014. *Analysis of Marine Samples in Search of Bioactive Compounds : Chapter 8 Mass Spectrometri for Determination of Bioactive Compounds*. National institute of Oceanography. India.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., Rungjindamai, N., and Sakayaroj, J. 2008. Epoxydons and a Pyrone from the Marine-Derived Fungus *Nigrospora sp.* PSU-F5. *Journal of Natural Products*. 71(8). 1323-1326.
- Wagner, L., Stielow, J.B., De-Hoog, G.S., Bensch, K., Schwartz, V.U., Voigt, K., Alastruey-Izquierdo, A., Kurzai, O., and Walther, G. 2020. A New Species Concept for the Clinically Relevant *Mucor circinelloides* Complex. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 44(1): 67-97.
- Wakefield, J., Hassan, H.M., Jaspars, M., Ebel, R., and Rateb, M.E. 2017. Dual Induction of New Microbial Secondary Metabolites by Fungal Bacterial Co-Cultivation. *Frontiers in Microbiology*. 8 : 1284.
- Wen, J., Okyere, S.K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., dan Hu, Y. 2022. Endophytic Fungi: an Effective Alternative Source of Plant Derived Bioactive Compounds for Pharmacological Studies. *Fungi*. 8(2): 205.
- Westphal, K.R., Heidelbach, S., Zeuner, E.J., Riisgaard-Jensen, M., Nielsen, M.E., Vestergaard, S.Z., Bekker, N.S., Skovmark, J., Olesen, C.K., Thomsen, K.H., Niebling, S.K., Sorensen, J.L., and Sondergaard, T.E. 2019. The Effects of Different Potato Dextrose Agar Media on Secondary Metabolite Production in *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology*. 347: 109171.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C., and Shao, D. 2019. Beneficial Effects of Endophytic Fungi Colonization on Plants. *Journal Applied Microbiology and Biotechnology*. 103(8): 3327-3340.

- Yani, A.P., and Putranto, A.M.H. 2014. Examination of the Sungkai's Young Leaf Extract (*Peronema canescens*) as an Antipiretic , Immunity, Antiplasmodium and Teratogenity in Mice (*Mus.muculus*). *International Journal of Science and Engineering*. 7(1): 30-34.
- Zamora, C.M.P., Torres, C.A., and Nunez, M.B. 2018. Review : Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from *Verbenaceae* Species Growing in South America. *Molecules*. 23(3): 544.
- Ziaee, A., Zia, M., Bayat, M., and Hashemi, J. 2016. Molecular Identification of *Mucor* and *Lichtheimia* Species in Pure Cultures of *Zygomycetes*. *Journal of Microbiology*. 9(4): 35237.
- Zygmunt, M., Slusarczyk, M., Jankowska, A., Swierczek, A., Bryla, A., Mogilski, S., Kazek, G., Sapa, J., Wyska, E., and Chlon-Rzepa, G. 2022. Evaluation of Analgesic and Anti-Inflammatory Activity of Purine-2,6-dione-based TRPA1 Antagonists with PDE4/7 Inhibitory Activity. *Pharmacological Reports*. 74(5): 982-997.