

**INVESTIGASI SENYAWA BIOAKTIF YANG DIHASILKAN OLEH
AKTINOMISETES ENDOFIT MANGROVE SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP BAKTERI PATOGEN RESISTEN**

(SKRIPSI)

Oleh

**FATUR ROHIM
1917011070**



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

ABSTRAK

INVESTIGASI SENYAWA BIOAKTIF YANG DIHASILKAN OLEH AKTINOMISETES ENDOFIT MANGROVE SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN RESISTEN

Oleh

Fatur Rohim

Aktinomisetes endofit mangrove (AEM) diketahui memiliki potensi dalam memproduksi senyawa bioaktif antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh AEM. Aktinomisetes diperoleh dari tumbuhan Mangrove di Hutan Mangrove Petengoran, Pesawaran, Lampung. Sampling tumbuhan mangrove dilakukan dengan metode acak dan pengayaan aktinomisetes dilakukan dengan metode sterilisasi permukaan dan cawan sebar pada media agar koloid kitin 1% dalam air laut. Isolasi aktinomisetes dilakukan menggunakan metode cawan gores. Isolat aktinomisetes diidentifikasi secara makroskopik dan mikroskopik. Kultivasi aktinomisetes dilakukan pada media padat kulit udang selama 14 hari. Biomass aktinomisetes diekstrak menggunakan etil asetat dan dikarakterisasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Skrining aktivitas antibakteri dari ekstrak aktinomisetes yang dilakukan menggunakan metode *microdilution plate* terhadap isolat klinis *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aureginosa*. Pemurnian senyawa dilakukan dengan kromatografi kolom dan karakterisasi dilakukan menggunakan instrumen *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry* (LC-MS/MS). Berhasil diisolasi 19 isolat mikroba endofit mangrove. Identifikasi secara makroskopis dan mikroskopis menunjukkan hanya 6 isolat yang merupakan aktinomisetes. Isolat 22-PLP4-A1 menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *S. aureus* dan keenam isolat tersebut tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *P. aureginosa*. Terpenoid merupakan komponen dominan dalam ekstrak berdasarkan hasil KLT dengan pereaksi vanilin-asam sulfat. Kristal FE-1d sebanyak 10 mg berhasil didapatkan setelah proses pemurnian dan karakterisasi menunjukkan 2 senyawa utama yang terdapat pada kristal tersebut muncul pada waktu retensi 12,40 dan 13,67 menit merupakan senyawa turunan benzilamin. Berdasarkan informasi tersebut, maka penelitian ini telah memberikan informasi mengenai senyawa yang dihasilkan oleh AEM dan informasi ini dapat digunakan untuk keperluan lebih lanjut terkait hubungan struktur senyawa dengan aktivitas biologisnya.

Kata Kunci : aktinomisetes endofit mangrove, antibakteri, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, benzilamin

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS PRODUCED BY MANGROVE ENDOPHYTIC ACTINOMYCETES AS ANTIBACTERIAL AGAINST RESISTANT PATHOGENIC BACTERIA

By

Fatur Rohim

Mangrove endophytic actinomycetes (MEA) are known to have the potential to produce bioactive compounds that have antibacterial activity. This study aims to identify bioactive compound produced by MEA. Actinomycetes were obtained from mangrove plants in the Petengoran Mangrove Forest, Pesawaran, Lampung. Sampling was carried out by random method and actinomycetes enrichment was carried out by surface sterilization and spread plate methods on 1% chitin colloidal agar in seawater. Actinomycetes isolation was carried out using the streak plate method. Actinomycetes isolates were identified macroscopically and microscopically. Actinomycetes cultivation was carried out using shrimp shell medium for 14 days. The cultivation results were extracted using ethyl acetate and characterized using thin-layer chromatography (TLC). Antibacterial screening of extracts were using microdilution plate against clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aureginosa*. Compound purification by column chromatography and characterization used Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) instrument. Total of 19 isolates of mangrove endophytic microbes were successfully isolated. Macroscopic and microscopic identification showed that 6 isolates were actinomycetes. Isolate 22-PLP4-A1 showed significant antibacterial activity against *S. aureus* and the six isolates showed no antibacterial activity against *P. aureginosa*. Terpenoids are the dominant component in the extract based on the results of TLC with vanillin-sulfuric acid reagent. After the purification and characterization process, 10 mg of FE-1d crystals was obtained, showing that the 2 main compounds present in the crystals appeared at retention time of 12.40 and 13.67 minutes, which were benzylamine derivatives. Based on this information, this research has provided information about the compounds produced by AEM and this information can be used for further purposes related to the relationship between compound structure and its biological activity.

Keywords: mangrove endophytic actinomycetes, antibacterial, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, benzylamine

**INVESTIGASI SENYAWA BIOAKTIF YANG DIHASILKAN OLEH
AKTINOMISETES ENDOFIT MANGROVE SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP BAKTERI PATOGEN RESISTEN**

Oleh

FATUR ROHIM

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar
SARJANA SAINS

Pada

Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



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

**Judul Skripsi : INVESTIGASI SENYAWA BIOAKTIF
YANG DIHASILKAN OLEH
AKTINOMISETES ENDOFIT MANGROVE
SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP
BAKTERI PATOGEN RESISTEN**

Nama Mahasiswa : Fatur Rohim

Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011070

Program Studi : S1 Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Prof. Andi Setiawan, Ph.D.
NIP 19580922 198811 1 001

Novriyandi Hanif, D.Sc.
NIP 19771109 201409 1 002

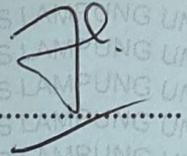
2. Ketua Jurusan Kimia

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

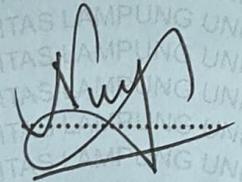
MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

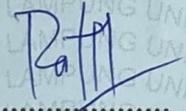
Ketua : Prof. Andi Setiawan, Ph.D.



Sekretaris : Novriyandi Hanif, D.Sc.



Anggota : Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.

NIP 19711001 200501 1 002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 25 Mei 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Fatur Rohim

Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011070

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan alam

Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi saya yang berjudul **“Investigasi Senyawa Bioaktif yang dihasilkan oleh Aktinomisetes Endofit Mangrove sebagai Antibakteri terhadap Bakteri Patogen Resisten”** adalah terbukti hasil karya saya, meliputi topik penelitian, perolehan hasil penelitian, maupun pengolahan datanya.

Pernyataan ini saya buat dengan penuh kesadaran untuk selanjutnya dipergunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 07 Juni 2023

Yang Menyatakan



Fatur Rohim
NPM1917011070

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama lengkap Fatur Rohim, lahir di Bandar Lampung, 03 Februari 2002. Penulis adalah putra kedua dari empat bersaudara dari pasangan Bapak Supriyanto dan Ibu Utari Rudihartati. Perjalanan pendidikan penulis dimulai pada tingkat Sekolah Dasar di SD Negeri 1 Campang Raya (2007-2013). Penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Pertama di SMP Negeri 31 Bandar Lampung (2013-2016). Selanjutnya, penulis melanjutkan pendidikan ke jenjang Sekolah Menengah Kejuruan di SMK SMTI Bandar Lampung dengan mengambil jurusan Kimia Analisis (2016-2019). Setelah menyelesaikan pendidikan formal, penulis mendapatkan kesempatan untuk melanjutkan pendidikan ke jenjang Sarjana pada tahun 2019 di Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Selama menjalankan perkuliahan penulis aktif dalam berbagai kegiatan baik akademik maupun non-akademik. Penulis mengikuti berbagai organisasi selama di perguruan tinggi, seperti Rois FMIPA Universitas Lampung (2019-2020) sebagai anggota Bidang Akademik dan Riset, UKM-Penelitian Universitas Lampung (2019-2022) sebagai staf Departemen Riset dan Penalaran, dan Himpunan Mahasiswa Kimia (HIMAKI) FMIPA Universitas Lampung (2021) sebagai pengurus Bidang Sains dan Penalaran Ilmu Kimia (SPIK). Penulis merupakan penerima beasiswa XL Future Leaders Batch 10 (2021-2023), penulis pernah menjadi ketua tim penerima hibah dana penelitian dalam Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) bidang Riset Eksakta (2021), penulis pernah menjadi finalis dalam Lomba Karya Tulis Ilmiah Mahasiswa (LKTIM) yang diadakan oleh Himasakta Pendidikan Fisika, Universitas Pendidikan Ganesha, Bali (2021), penulis merupakan peraih juara 2 dalam Lomba Karya Tulis Ilmiah Nasional (LKTIN) yang diadakan oleh HM-PS Kimia, UIN Sunan Kalijaga, Yogyakarta (2021), dan penulis pernah mengikuti program Pertukaran Mahasiswa Merdeka (PMM) angkatan 1 dalam program Merdeka

Belajar Kampus Merdeka (MBKM) yang ditempatkan di Institut Teknologi Bandung (ITB) selama satu semester.

Selain kegiatan perlombaan tingkat nasional, penulis juga pernah menjuarai kegiatan perlombaan tingkat internasional. Penulis pernah mendapatkan *Gold Medal* dan *Silver Medal* dalam ajang *Youth International Science Fair (YISF)* yang diadakan oleh *Indonesia Young Scientist Association (IYSA)* pada tahun 2022. Pada tahun yang sama penulis juga merupakan peraih juara 1 dalam pemilihan mahasiswa berprestasi (Pilmapres) tingkat Universitas Lampung dan tingkat wilayah II (LLDIKTI II) Indonesia.

Tahun 2022 penulis melaksanakan kegiatan Kuliah Kerja Nyata (KKN) di Desa Kuripan, Kecamatan Teluk Betung Barat, Kota Bandar Lampung. Penulis telah menyelesaikan Praktik Kerja Lapangan di UPT-LTSIT Universitas Lampung dengan topik penelitian "Potensi Aktinomisetes Endofit Mangrove sebagai Antibakteri terhadap Bakteri Patogen Resisten" dan dilanjutkan hingga ke penyusunan tugas akhir atau skripsi. Penulis diberikan kesempatan untuk melakukan penelitian selama satu semester di Institut Pertanian Bogor (IPB) tahun 2022 melalui Program Kompetisi Kampus Merdeka (PKKM) Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Lampung.

MOTTO

“My only motto in life is don’t lose”
(Onika)

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillahirabbil'alamin serta rasa bangga,
kudedikasikan karya kecilku ini untuk:

Orang tuaku tercinta
Ibu dan Bapak yang selalu mencintai, mendoakan,
mendukung, menyemangati, dan percaya kepada putranya.

Kakak dan adik-adiku tersayang yang selalu menyayangi dan mendukungku.

Hormat setinggi-tingginya kepada
Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., Bapak Novriyandi Hanif, D.Sc.,
Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si., serta seluruh Dosen Pengajar yang
selalu membimbing dan mendidik saya hingga mencapai gelar Sarjana.

Seluruh sahabatku yang telah kebersamai, mendukung, mengingatkan, dan
memberikan semangat.

Almamater Universitas Lampung

Diriku yang selalu semangat berjuang

SANWACANA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, Tuhan semesta alam yang selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan skripsi berjudul **“Investigasi Senyawa Bioaktif yang Dihasilkan oleh Aktinomisetes Endofit Mangrove sebagai Antibakteri terhadap Bakteri Patogen Resisten”** sebagai salah satu syarat dalam meraih gelar Sarjana Sains pada program studi Kimia FMIPA Universitas Lampung. Shalawat teriringsalam selalu tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan para sahabat, semoga seluruh umatnya mendapatkan syafa'at di yaumul akhir kelak. *Aamiin yarabbal'alamin*. Teriring doa yang tulus, penulis mengucapkan terima kasih kepada :

1. Kedua orang tuaku, Ibu dan Bapak yang selalu memberikan dukungan, kasih sayang, dan jutaan doa. Semoga Allah selalu memberikan keberkahan dan semoga bisa tetap untuk menemani penulis berjuang hingga akhir bahagia nanti. *Aamiin yarabbal'alamin*.
2. Kakak dan adik-adikku (aa Dede, Bintang, dan Hafidz) yang penulis sayangi.
3. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D. Pembimbing utama penulis yang selalu memberikan banyak ilmu, pemahaman, motivasi, saran, kritik, dan waktu selama penulis menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga Allah senantiasa melimpahkan kebaikan dan keberkahan bagi Bapak. *Aamiin ya rabbal'alamin*.
4. Bapak Novriyandi Hanif, D.Sc. Pembimbing II penulis yang selalu memberikan banyak ilmu, saran, motivasi, dan membimbing penulis selama melaksanakan penelitian di IPB, Bogor dan selama menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga Allah senantiasa melimpahkan kebaikan dan keberkahan bagi Bapak. *Aamiin ya rabbal'alamin*.
5. Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si. Dosen pembahas penulis yang selalu menyempatkan waktunya untuk memberikan saran dan perbaikan

kepada penulis selama menyelesaikan tugas akhir ini. Semoga Allah senantiasa melimpahkan kebaikan dan keberkahan bagi Ibu. *Aamiin ya rabbal'alam.*

6. Bapak Syaiful Bahri M.Si. Pembimbing akademik penulis yang selalu membimbing dan memberikan banyak saran kepada penulis dalam menyelesaikan studi. Semoga Allah senantiasa melimpahkan kebaikan dan keberkahan bagi Bapak. *Aamiin ya rabbal'alam.*
7. Bapak Mulyono, Ph.D. selaku Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
8. Ibu Dr. Mita Rilyanti, M.Si. selaku sekretaris Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung.
9. Seluruh Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung atas seluruh ilmu, pengalaman, bimbingan, dan nasihat kepada penulis selama menjalani perkuliahan.
10. *My Research Partner* (ADS'19) Kipang dan Reza yang selalu menjadi tempat *sharing* dan keluh kesah selama melaksanakan penelitian ini.
11. Kakak-kakak yang penulis sayangi (Kak Rosyi, Kak Fendi, Kak Lanang, Kak Indra, Kak Chasya, Kak Ridho, Mba Caca, Mba Mega, Mba Wulan, Mba Ais, Mba Ika, dan Mba Nafilla) yang selalu membantu penulis dalam memahami dan melaksanakan penelitian yang dikerjakan untuk menyelesaikan skripsi ini.
12. Rekan-rekan penelitianku di Lab Biomassa UPT LTSIT Universitas Lampung (Adhell, Cici, Datun, Dira, Ibnu, Ify, Leha, Opi, dan Sinur). Semoga selalu dipermudah segala urusannya.
13. Rekan-rekan diskusi ilmiah Lab Kimia Organik (Bang Hadi, Kania, Mba Kartika, dan Neng) atas informasinya yang bermanfaat, semoga selalu dalam lindungan Allah.
14. Rekan-rekan NYH *Research Group* (Kak Fabians, Kak Henny, Vira, dan Jonathan) yang sudah selalu membantu dan menyertai penulis selama melaksanakan penelitian di Bogor.
15. Sahabat "Biiiiiit" (Annur, Andra, Dwi, dan Rohman) yang selalu menyertai penulis hingga menyelesaikan studi. *Thank you for staying.*

16. Teman-teman “Mari Penelitian” (Kak Acha, Afif, Fathia, Ify, dan Nabila) yang selalu menyertai dan mendukung penulis.
17. Teman-teman kelas B Kimia 2019 yang selalu menyertai penulis selama melaksanakan perkuliahan. Semoga dipermudah selalu segala urusannya.
18. Teman-teman MBKM Riset IPB *University* (Devi, Havier, dan Riza) yang sudah selalu menyertai penulis dalam melaksanakan penelitian di Bogor. Semoga selalu dipermudah segala urusannya.
19. *BLACKPINK* (Jisoo, Jennie, Rosé, dan Lisa) terimakasih untuk setiap konten yang kalian berikan sehingga dapat selalu menemani penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini.
20. Keluarga besar Jurusan Kimia angkatan 2019 terimakasih sudah menyertai dan mengisi kehidupan penulis selama perkuliahan ini. Semoga bahagia dan selalu dipermudah segala urusannya.
21. Keluarga besar UKM-Penelitian Universitas Lampung.
22. Almamater tercinta Universitas Lampung.
23. Seluruh pihak yang terlibat dalam penyusunan skripsi ini dan tidak bisa tersebutkan satu persatu. Terimakasih atas seluruh doa, dukungan serta bantuannya.

Bandar Lampung, 07 Juni 2023

Penulis

Fatur Rohim

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR.....	xviii

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah	1
1.2 Tujuan.....	3
1.3 Manfaat.....	4

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Patogen Resisten.....	5
2.2 Ekosistem Mangrove	6
2.3 Aktinomisetes Endofit Mangrove	7
2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Aktinomisetes Endofit Mangrove	9
2.6 Skrining Aktivitas Antibakteri	11
2.6.1 Metode Difusi	12
2.6.2 Metode Dilusi	12
2.7 Kromatografi	13
2.7.1 Kromatografi Cair.....	13
2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT).....	14
2.7.3 Kromatografi Kolom	15
2.8 Spektroskopi Massa.....	15

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu	16
3.2 Alat dan Bahan	16

3.3 Metode.....	17
3.3.1 Pengambilan Sampel dan Pengayaan	17
3.3.2 Isolasi Aktinomisetes Endofit.....	17
3.3.3 Identifikasi Morfologi.....	18
3.3.4 Kultivasi dan Ekstraksi	18
3.3.5 Skrining Aktivitas Antibakteri.....	19
3.3.6 Karakterisasi Isolat Unggul	19
3.3.7 Kultivasi Skala Besar (<i>Scale Up</i>) dan Fraksinasi	19
3.3.8 Purifikasi dan Karakterisasi Senyawa	20

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengambilan Sampel dan Pengayaan	21
4.2 Isolasi.....	23
4.3 Identifikasi Morfologi	25
4.4 Kultivasi dan Ekstraksi.....	27
4.5 Skrining Aktivitas Antibakteri	29
4.6 Karakterisasi Isolat Unggul	30
4.7 Kultivasi Skala Besar (<i>Scale Up</i>) dan Fraksinasi	31
4.8 Karakterisasi Senyawa.....	33

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan.....	39
5.2 Saran	40

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

1. Diagram Penelitian.....	48
2. Pembuatan Pereaksi	49
3. Pengambilan Sampel Biomaterial Mangrove.....	50
4. Data Hasil Skrining Antibakteri.....	51
5. Fraksinasi Ekstrak Kasar 22-PLP4-A1	52
6. LC-MS/MS.....	53

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Aktinomisetes Endofit Mangrove	9
2. Senyawa Bioaktif Aktinomisetes Endofit Tanaman Mangrove.....	10
3. Aktinomisetes Endofit Hasil Isolasi.....	26
4. Data Hasil Skrining Antibakteri <i>S. aureus</i>	51
5. Data Hasil Skrining Antibakteri <i>P. aureginosa</i>	51
6. Data Hasil Skrining Antibakteri <i>S. aureus</i> Setiap Fraksi.....	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Lokasi Pengambilan Sampel (sumber: Google Earth).....	21
2. Sampel yang didapat (1) akar; (2) ranting; (3) daun.....	22
3. Hasil Pengayaan.....	22
4. Hasil Isolasi Mikroba Endofit Mangrove.....	23
5. Persebaran Endofit Hasil Isolasi (a) berdasarkan jenis pohon; (b) berdasarkan jenis bagian tumbuhan yang diambil.....	24
6. Persebaran Endofit Berdasarkan Titik Pertumbuhan Mangrove.....	25
7. Morfologi Mikroskopis Isolat Aktinomisetes.....	26
8. Kultivasi (a) Inokulum; (b) SSF.....	27
9. Ekstrak Kasar Hasil Ekstraksi.....	28
10. Hasil KLT (a) UV ₂₅₄ ; (b) serum sulfat; (c) vanilin-H ₂ SO ₄	29
11. Aktivitas Antibakteri Terhadap <i>S. aureus</i> dan <i>P. aereginosa</i>	30
12. Morfologi Makroskopis dan Mikroskopis (a) media agar koloid kitin 1%; (b) media agar standar ISP-2; (c) mikroskop cahaya 400X; (d) SEM 15KX).....	31
13. Hasil Fraksinasi Kedua (a) UV _{254nm} ; (b) serum sulfat.....	32
14. Kristal FE-1d (a) sebelum rekristalisasi; (b) setelah rekristalisasi.....	33
15. Hasil KLT Kristal FE-1d (a) UV _{254nm} ; (b) serum sulfat).....	33
16. <i>Total Ion Chromatogram</i> (TIC) Kristal FE-1d.....	34
17. Spektrum Massa Puncak 13,67 menit.....	34
18. Perkiraan Fragmentasi Senyawa pada Puncak 13,67 Menit.....	35
19. Spektrum Massa Puncak 12,40 menit.....	36
20. Perkiraan Fragmentasi Senyawa pada Puncak 12,40 Menit.....	36
21. Senyawa Turunan Benzilamin: a. Butanafin (hasil sintesis); b. 2-asetil benzilamin (hasil isolasi).....	38
22. Diagram Penelitian.....	48

23. Lokasi Titik Pengambilan Sampel	50
24. Fraksinasi Ekstrak Kasar	52
25. Instrumen LC-MS/MS Yang Digunakan	53
26. Kromatogram Blanko Pelarut Sampel (Metanol)	53

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang dan Masalah

Morbiditas dan mortalitas terkait dengan resistensi antimikroba pada bakteri patogen telah menjadi perhatian utama di seluruh dunia (WHO, 2021). Infeksi yang sulit diobati atau bahkan tidak dapat diobati dengan antimikroba konvensional merupakan akibat dari pola multiresistensi obat (*multi-drug resistance pattern*) pada bakteri patogen Gram-positif dan Gram-negatif (Akova, 2016). Berdasarkan ulasan terkait dengan resistensi antimikroba yang dilakukan oleh Pemerintah Inggris menyatakan bahwa pada tahun 2050 infeksi terkait dengan resistensi antimikroba dapat membunuh 10 juta orang setiap tahunnya (Neill, 2014).

Bakteri apapun dapat mengembangkan resistensi antimikroba, namun masih mempertahankan kerentanannya terhadap antimikroba lainnya sehingga memungkinkan pengobatan yang berhasil dalam penanganan klinis. Namun, terdapat kelompok bakteri yang menjadi perhatian utama di seluruh dunia, yaitu bakteri penyebab sebagian besar infeksi nosokomial atau dikenal dengan akronim ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacter spp.*) yang menunjukkan multiresistensi obat dan virulensi (Mulani *et al.*, 2019).

Patogen ESKAPE telah mengembangkan mekanisme resistensi melalui mutasi genetik dan akuisisi elemen genetik seluler terhadap beberapa agen antimikroba seperti lipopeptida, oksazolidinon, makrolida, fluorokuinolon, tetrasiklin, β -laktam, kombinasi inhibitor laktamase β -laktam- β -laktam, dan antibiotik garis pertahanan terakhir termasuk karbapenem, glikopeptida, dan polimiksin yang tidak menguntungkan secara klinis karena menyebabkan peningkatan lama tinggal di

rumah sakit serta biaya perawatan kesehatan yang lebih tinggi (De Oliveira *et al.*, 2020). *World Health Organization* (WHO) memasukkan ESKAPE ke dalam daftar patogen yang menjadi prioritas untuk pengembangan antibiotik baru (WHO, 2017).

Beberapa tahun terakhir, peneliti telah melakukan penelitian terkait senyawa metabolit yang diturunkan oleh mikroorganisme. Sebagian besar mikroorganisme potensial sudah diisolasi dari lingkungan alam yang beragam di seluruh dunia, sedangkan endofit yang berkolonisasi di jaringan internal tanaman inang masih kurang dieksploitasi dan dianggap sebagai sumber metabolit baru yang menjanjikan. Mikroba endofit yang kompatibel dengan tanaman inangnya mampu berkoloni di jaringan internal tanaman tanpa dikenali sebagai patogen karena dilengkapi dengan berbagai metabolit bioaktif. Mikroba endofit dapat berupa jamur dan bakteri termasuk aktinomisetes (Masand *et al.*, 2015). Aktinomisetes tergolong ke dalam komunitas *actinobacteria*. Aktinomisetes diketahui menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah sangat besar (Jose *et al.*, 2021). Aktinomisetes merupakan bakteri Gram-positif dan dikenal juga sebagai produsen banyak enzim ekstraseluler dengan sifat pendegradasi polimer, seperti kitinase sehingga dapat mendegradasi kitin menjadi produk turunannya (Gomes *et al.*, 2000). Aktinomisetes endofit diketahui dapat berperan sebagai antimikroba, antijamur, antitumor, antidepresan, dan antineoplastik (Singh and Dubey, 2015).

Hingga saat ini, sekitar 70% antibiotik telah dihasilkan dari aktinomisetes khususnya *Streptomyces*. Namun, akibat keberlanjutan penelitian mengenai *Streptomyces*, maka hal tersebut menjadi tantangan dalam memperoleh senyawa bioaktif baru dari *Streptomyces*. Pentingnya dilakukan kajian lebih lanjut mengenai jenis aktinomisetes lainnya yang menjanjikan, salah satunya yang berasal dari ekosistem mangrove. Ekosistem mangrove memiliki nutrisi yang serba guna seperti ekosistem terestrial baik fototrofi hingga kemolitotrofi dan kemohetrotrofi yang mempengaruhi keragaman aktinomisetes mangrove dalam hal genetik dan metabolisme serta senyawa metabolit baru. Tanah mangrove, sedimen, lumpur dasar, dan tanaman merupakan sumber yang kaya akan spesies baru *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, dan berbagai *strain* aktinomisetes lainnya (Amrita *et al.*, 2012).

Hasil studi (Ding *et al.*, 2011) menunjukkan bahwa *Streptomyces* sp. HKI0595, endofit tumbuhan mangrove *Kandelia candel* memiliki kemampuan untuk menghasilkan agen antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri termasuk bakteri multiresisten (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *vancomycin-resistant Enterococcus faecalis* (VRE)). Enam isolat aktinomisetes endofit mangrove yang berhasil diisolasi dari tumbuhan *Rhizophora apiculata* dan *Avicennia marina* diketahui dapat menghasilkan senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan 7 bakteri patogen dan 1 isolat yang memiliki aktivitas terbaik diidentifikasi sebagai *Streptomyces coelicolor* (Gayathri and Muralikrishnan, 2013). *Streptomyces* sp. 2BBP-J2 berhasil diisolasi dari tumbuhan mangrove *Avicennia marina* dan hasil fermentasi dalam media cair YIM-38 dilaporkan menghasilkan agen antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan bakteri patogen multiresisten (MRSA dan VRE) (Jiang *et al.*, 2021). Aktinomisetes endofit mangrove adalah tambang emasnya bagi peneliti yang masih belum dieksplorasi secara maksimal potensi senyawa bioaktifnya, sehingga saya tertarik untuk melakukan penelitian dengan judul ini. Selain itu, media koloid kitin akan digunakan sebagai media isolasi aktinomisetes endofit mangrove dan fermentasi akan dilakukan dengan teknik *solid state fermentation* (SSF) menggunakan limbah kulit udang sebagai media fermentasi yang akan menjadi sumber karbon utama untuk pertumbuhan aktinomisetes.

1.2 Tujuan

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan dari penelitian ini sebagai berikut:

1. Mengisolasi aktinomisetes endofit dari biomaterial akar, ranting, dan daun tanaman mangrove.
2. Mengevaluasi bioaktivitas dari ekstrak hasil kultur aktinomisetes endofit mangrove sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen resisten.
3. Mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh aktinomisetes endofit mangrove sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen resisten

menggunakan metode kromatografi *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy/Mass Spectroscopy* (LC-MS/MS).

1.3 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1. Menambah informasi baru tentang isolat aktinomisetes yang berasal dari jaringan internal (endofit) tanaman mangrove serta senyawa bioaktif yang dihasilkannya.
2. Memberikan informasi baru terkait potensi isolat aktinomisetes endofit tanaman mangrove di Kawasan Hutan Mangrove Petengoran, Pesawaran sebagai sumber senyawa antibakteri.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri Patogen Resisten

Bakteri merupakan mikroorganisme prokariota yang memiliki ukuran sel berkisar 1µm. Secara umum, bakteri tidak memiliki klorofil dan proses reproduksinya terjadi secara aseksual melalui pembelahan sel. Bakteri diklasifikasikan menjadi dua, yaitu bakteri Gram-positif dan Gram-negatif yang didasarkan pada responsnya terhadap prosedur pewarnaan gram. Bakteri Gram-positif akan mempertahankan warna kristal violet pada pewarnaan gram dan bakteri gram-negatif warna kristal violet akan menghilang setelah dibilas dengan alcohol dan aseton. Bakteri Gram-positif dan Gram-negatif dibedakan berdasarkan dinding selnya. Dinding sel bakteri Gram-positif tersusun atas peptidoglikan dan asam teikoat, sedangkan pada bakteri Gram-negatif dinding sel tersusun atas peptidoglikan dan membran luar (Jawetz *et al.*, 2004).

Berdasarkan kemampuannya untuk menimbulkan suatu penyakit, bakteri dikelompokkan menjadi patogen dan apatogen. Bakteri patogen adalah kelompok bakteri yang dapat menimbulkan penyakit. Sedangkan bakteri apatogen adalah bakteri yang tidak dapat menimbulkan penyakit (Ferdiaz, 2002). Terdapat kelompok bakteri patogen yang menjadi perhatian utama di seluruh dunia, yaitu bakteri penyebab sebagian besar infeksi nosokomial atau dikenal dengan akronim ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Enterobacter* spp.) yang menunjukkan multiresistensi obat dan virulensi (Mulani *et al.*, 2019).

Resistensi merupakan keadaan dimana suatu bakteri menunjukkan ketahanan terhadap suatu antibiotik. Bakteri multiresisten muncul akibat dari penggunaan antibiotik secara-terus, pengobatan mandiri, dan paparan infeksi di rumah sakit.

Bakteri multiresisten diketahui bertanggung jawab atas 15,5% infeksi yang terjadi di rumah sakit di seluruh dunia (Mulani *et al.*, 2019). Banyak spesies bakteri mengembangkan kemampuan untuk mentolerir antibiotik jauh sebelum manusia mulai memproduksi antibiotik secara masal untuk mencegah dan mengobati penyakit menular. Pengenalan antibiotik yang relatif baru sebagai agen klinis secara radikal telah mengubah prasyarat untuk terjadinya evolusi dan penyebaran resistensi dengan memberikan tekanan seleksi yang belum pernah terjadi sebelumnya, terutama pada anggota mikroba dari manusia dan hewan peliharaan. Tekanan seleksi ini telah mendorong mobilisasi dan transfer horizontal dari sejumlah besar gen resistensi antibiotik dari banyak spesies bakteri, terutama bakteri patogen (Larsson and Flach, 2022).

2.2 Ekosistem Mangrove

Ekosistem mangrove tersebar secara global di Asia (42%), Afrika (20%), Amerika Utara dan Tengah (15%), Oceania (12%), dan Amerika Selatan (11%) yang mencakup sekitar 60-75% dari garis pantai baik pada daerah tropis maupun subtropis. Ekosistem mangrove memiliki kelembapan tinggi, salinitas tinggi, dan toleran hipoksia yang membiakkan berbagai jenis mikroorganisme dan tanaman baru yang telah menjadi sumber yang kaya akan produk alami bioaktif (Xu *et al.*, 2014). Indonesia merupakan negara dengan ekosistem mangrove terbesar di dunia dan Teluk Lampung merupakan salah satu lokasi sebaran hutan mangrove di Pulau Sumatera. Kawasan tersebut mencakup Kabupaten Lampung Selatan, Kabupaten Pesawaran, dan Kota Bandar Lampung sebagai ibu kota Provinsi (Damai dkk., 2011).

Hutan mangrove merupakan ekosistem yang sangat produktif. Mangrove membentuk lingkungan asin yang unik di bawah pengaruh arus pasang surut, sehingga tanah aluvial menjadi berlumpur akibat banjir yang berselang-seling. Ekosistem mangrove mengandung nutrisi serbaguna karena mereka sangat kaya akan bahan organik, kandungan nitrogen, dan belerang yang dapat digunakan sebagai sumber nutrisi oleh mikroorganisme yang dengan demikian, diyakini

bahwa ekosistem mangrove berpotensi menjadi sumber baru bagi aktinomisetes yang sangat beragam (Das *et al.*, 2016).

2.3 Aktinomisetes Endofit Mangrove

Endofit merupakan mikroorganisme yang tumbuh di dalam jaringan internal tumbuhan inang tanpa menimbulkan kerugian bagi tumbuhan inang. Tumbuhan mengalami kolonisasi oleh komunitas mikroba yang kompleks dan memainkan peran berbeda terkait dengan perkembangan dan kesehatan tumbuhan. Beberapa anggota mikroba dapat merugikan dan menyebabkan penyakit, sedangkan yang lainnya dapat mempromosikan perkembangan tumbuhan serta meningkatkan perolehan nutrisi dan toleransi terhadap tekanan biotik dan abiotik melalui banyak mekanisme. Mikroba yang terkait dengan tumbuhan dapat ditemukan di bagian luar tumbuhan, seperti rhizosfer atau filosfer, atau di bagian dalam tanaman, seperti bagian endosfer (Brader *et al.*, 2017). Mikroba endofit yang kompatibel dengan tumbuhan inangnya mampu berkoloni di jaringan internal tumbuhan tanpa dikenali sebagai patogen karena dilengkapi dengan berbagai metabolit bioaktif. Mikroba endofit dapat berupa jamur dan bakteri termasuk aktinomisetes (Masand *et al.*, 2015).

Mangrove merupakan komunitas tumbuhan berkayu yang unik dan terdapat di daerah intertidal baik di pesisir daerah tropis maupun subtropis. Tumbuhan mangrove telah diakui sebagai tumbuhan obat oleh masyarakat luas. Sekitar 70 spesies tumbuhan mangrove dari 27 genus telah dilaporkan dan dilakukan ekstraksi dari tumbuhan ini menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap patogen manusia, hewan, dan tumbuhan serta aktivitas antiinflamasi dan antipiretik yang luas. Selain itu, tumbuhan mangrove menjadi sumber produk bahan alami kimia dan penelitian bioaktivitas dari tumbuhan semi-mangrove dan mangrove mengungkapkan nilai penelitian besar bagi tumbuhan mangrove (Xu *et al.*, 2014).

Aktinomisetes merupakan kelompok mikroorganisme yang secara morfologis menyerupai jamur dan secara fisiologis menyerupai bakteri. Aktinomisetes

tergolong ke dalam jenis *Actinobacteria* yang tumbuh lambat dan tersebar secara luas di alam, dapat ditemukan di substrat alami; air, udara, tanah, bahan makanan, pupuk kandang, dan kompos. Termasuk ke dalam bakteri gram positif yang dalam DNA-nya terkandung guanin-sitosin (G-C) >50%. Aktinomisetes merupakan prokariota yang secara ekonomis dan bioteknologi sangat penting karena menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang dapat berguna sebagai antibakteri, antitumor, agen immunosupresif, dan inhibitor enzim (Valli *et al.*, 2012). Aktinomisetes dikenal juga sebagai produsen banyak enzim ekstraseluler dengan sifat pendegradasi polimer, seperti kitinase sehingga dapat mendegradasi kitin menjadi produk turunannya (Gomes *et al.*, 2000).

Tumbuhan mangrove diketahui sebagai salah satu sumber yang kaya akan spesies baru *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, dan berbagai *strain* aktinomisetes lainnya (Amrita *et al.*, 2012). Hong *et al.*, (2009) telah berhasil mengisolasi >2000 isolat aktinomisetes dari ekosistem mangrove di Cina dan 434 isolat aktinomisetes yang berhasil diisolasi merupakan endofit tanaman mangrove dari 99 sampel yang diambil dari tanaman mangrove di Cina. Setelah proses identifikasi, isolat-isolat aktinomisetes yang berhasil diisolasi dikelompokkan ke dalam 13 genus, yaitu *Actinomadura*, *Microbispora*, *Nonomuraea*, *Actinoplanes*, *Micromonospora*, *Verrucosipora*, *Arthrobacter*, *Isoptericola*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, dan *Streptomycetes*.

Hasil penelitian-penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa perbedaan jenis tumbuhan inang dengan media isolasi yang digunakan dapat mempengaruhi spesies aktinomisetes yang berhasil diisolasi. Hal tersebut karena keanekaragaman komunitas endofit bervariasi dengan perbedaan spesies tumbuhan inang, genotipe, lokasi tahap perkembangan tumbuhan inang, dan lingkungan setempat. Selain itu, selama isolasi *strain* endofit, sterilisasi permukaan jaringan inang merupakan hal pertama atau fenomena penting yang mempengaruhi keanekaragaman dan komposisi komunitas endofit di alam, konsentrasi dan waktu sterilisasi oleh agen sterilisasi juga mempengaruhi keragaman dan populasi komunitas mikroorganisme endofit (Kumar *et al.*, 2020).

Tabel 1. Aktinomisetes Endofit Mangrove

Spesies	Tanaman Mangrove	Media Isolasi	Referensi
<i>Jishengella endophytica</i> 202201 ^T	<i>Acanthus illicifolius</i>		
<i>Jishengella endophytica</i> 161111	<i>Xylocarpus granatum</i>	Agar rafinosa-histidin	(Xie <i>et al.</i> , 2011)
<i>Jishengella endophytica</i> 161612	<i>Sonneratia paracaseolaris</i>		
<i>Streptomyces</i> sp. GT-20026114	<i>Aegiceras comiculatum</i>	ISP-2	(Lin <i>et al.</i> , 2006)
<i>Nocardioopsis</i> sp. A00203	<i>Aegiceras corniculatum</i>	ISP-2	(Lin <i>et al.</i> , 2010)
<i>Streptomyces</i> sp. 2BBP-J2	<i>Avicennia marina</i>	ISP-2	(Jiang <i>et al.</i> , 2021)
<i>Phycococcus avicenniae</i> sp. nov.,	<i>Avicennia marina</i>	<i>tryptic soy agar</i>	(Chen <i>et al.</i> , 2021)

2.4 Potensi Senyawa Bioaktif Aktinomisetes Endofit Mangrove

Aktinomisetes diketahui aktif dan merupakan komponen yang banyak terdapat dalam komunitas mikroba laut di berbagai ekosistem laut termasuk mangrove. Mikroba yang berharga ini menghasilkan berbagai jenis produk alami yang menarik dan kompleks secara struktural dengan berbagai aktivitas biologis. Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa metabolit sekunder aktinomisetes memiliki potensi sebagai antibiotik baru, agen antitumor, agen immunosupresif, dan inhibitor enzim. Sampai saat ini, sekitar 23.000 senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh mikroorganisme telah dilaporkan dan lebih dari 10.000 senyawa tersebut diisolasi dari actinomycetes (Xu *et al.*, 2014).

Hasil studi (Wang *et al.*, 2014) menunjukkan bahwa spesies *Jishengella endophytica* 161111 yang diisolasi dari akar tanaman mangrove *Xylocarpus granatum*. Isolat difermentasi dalam media cair yang tersusun atas glukosa 2%,

yeast extract 0.5%, pepton 0.5%, KNO₃ 1.5%, CaCO₃ 0.4%, dan NaCl 0.4% (pH 7,2), menghasilkan 12 senyawa alkaloid dan satu senyawa merupakan senyawa baru 2-(furan-2-il)-6-(2S,3S,4-trihidroksibutil)pirazin. Beberapa senyawa tersebut menunjukkan aktivitas sebagai antivirus terhadap virus H1N1.

Tabel 2. Senyawa Bioaktif Aktinomisetes Endofit Tanaman Mangrove

Senyawa	Sumber	Aktivitas	Referensi
Divergolides A-D	<i>Streptomyces</i> sp. HKI0576	Antibakteri terhadap <i>Mycobacterium vaccae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , dan <i>Staphylococcus aureus</i>	(Ding, <i>et al.</i> , 2010)
Xiamycin A	<i>Streptomyces</i> sp. HKI0595	Antibakteri terhadap <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Mycobacterium vaccae</i> , MRSA, dan VRE.	(Ding, <i>et al.</i> , 2011)
Beilunmycin	<i>Streptomyces</i> sp. 2BBP-J2	Antibakteri terhadap bakteri gram-positif	(Jiang <i>et al.</i> , 2021)

2.5 Solid State Fermentation (SSF)

Solid State Fermentation (SSF) atau fermentasi keadaan padat merupakan proses fermentasi yang melibatkan padatan sebagai substratnya dengan keadaan tanpa (atau hampir tidak ada) zat bebas air, namun substrat harus memiliki kelembaban yang cukup untuk mendukung pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme. SSF menawarkan banyak peluang dalam pemrosesan limbah agroindustri. Hal tersebut karena SSF menawarkan banyak keuntungan, seperti kebutuhan energi yang

diperlukan lebih rendah (hemat energi), menghasilkan sedikit limbah cair, dan ramah lingkungan setelah menyelesaikan pembuangan limbah padat. Kultur bakteri dapat dikelola dengan baik dan dimanipulasi untuk proses SSF. Pemilihan substrat yang tepat adalah salah satu aspek penting dalam SSF. Bahan padat tidak larut dapat bertindak baik sebagai penunjang fisik dan sumber nutrisi. Bahan padat dapat berupa substrat padat yang terbentuk secara alami, seperti tanaman pertanian, residu agroindustri atau pendukung inert (Pandey, 2003).

Salah satu substrat padat yang dapat digunakan untuk proses fermentasi aktinomisetes adalah limbah kulit udang karena limbah kulit udang mengandung kitin yang akan menjadi sumber karbon dalam proses pertumbuhan dan metabolismenya. Aktinomisetes diketahui sebagai produsen banyak enzim ekstraseluler dengan sifat pendegradasi polimer, seperti kitinase sehingga dapat mendegradasi kitin menjadi produk turunannya (Gomes *et al.*, 2000). Selain itu, potensi kulit udang juga cukup besar di Indonesia karena udang merupakan salah satu komoditas unggulan nasional berdasarkan data Kementerian Kelautan dan Perikanan (KKP), produksi udang budidaya di Indonesia pada tahun 2019-2020 mencapai 856.753 ton dan ditargetkan untuk mencapai 2 juta ton produksi udang nasional pada tahun 2024 (KKP, 2020).

Hasil penelitian (Setiawan *et al.*, 2021) menunjukkan bahwa bahwa limbah kulit udang dapat dimanfaatkan untuk proses SSF dalam menghasilkan senyawa metabolit bioaktif antibakteri oleh aktinomisetes laut (*Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1). Penelitian menunjukkan bahwa dihasilkan senyawa analog Branimycin B yang memiliki aktivitas antibakteri (250 µg/mL) terhadap *multidrug resistance Staphylococcus aureus*.

2.6 Skrining Aktivitas Antibakteri

Skrining merupakan tahap penapisan awal untuk mengetahui aktivitas dari suatu sampel. Skrining melibatkan pemindaian dan evaluasi. Pemindaian selalu melibatkan tes atau sekelompok tes yang diyakini akan memungkinkan deteksi

aktivitas dari suatu sampel uji. Kecuali jika pengujiannya sangat ketat, pemindaian harus diikuti dengan evaluasi, melalui pengujian lain, sehingga ketidakpastian dalam pemindaian dapat dihilangkan (Turner, 1965). Skrining aktivitas antibakteri dimaksudkan untuk mengetahui apakah suatu sampel dapat menghambat pertumbuhan suatu bakteri sehingga dapat digunakan sebagai agen antibakteri. Skrining aktivitas antibakteri dapat digunakan untuk penemuan obat, epidemiologi, dan prediksi hasil terapi. Ada beberapa metode yang dapat digunakan untuk skrining aktivitas antibakteri seperti metode difusi dan dilusi.

2.6.1 Metode Difusi

Metode difusi dilakukan dengan cara menyebarkan inokulum standar bakteri pada permukaan agar cawan. Kemudian kertas cakram (diameter 6 mm) yang telah berisi larutan sampel dengan konsentrasi tertentu ditempatkan di atas permukaan agar. Cawan petri diinkubasi pada keadaan tertentu dalam keadaan yang sesuai. Umumnya, agen antibakteri akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan bakteri uji, kemudian zona penghambatan diukur. Metode ini juga dapat dilakukan dengan cara melubangi agar yang sudah disebar dengan inokulum bakteri uji menggunakan *cork borer* (diameter 6-8 mm) dan kemudian alikuat sampel (20-100 μ L) dimasukkan ke lubang tersebut. Setelah proses inkubasi, maka dapat diamati zona penghambatan yang terbentuk. Semuanya dilakukan atas standar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

2.6.2 Metode Dilusi

Metode pengenceran adalah metode yang tepat untuk penentuan nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC), karena memungkinkan untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (pengenceran agar) atau media kaldu (pengenceran makro atau mikro). Metode pengenceran kaldu atau agar dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba *in vitro* terhadap bakteri dan jamur. Ada banyak pedoman yang disetujui untuk pengujian kerentanan agen antimikroba secara pengenceran, salah satunya adalah pedoman yang disediakan oleh CLSI (Balouiri *et al.*, 2016).

2.7 Kromatografi

Kromatografi adalah sebuah metode analitik yang digunakan untuk pemurnian dan pemisahan zat-zat organik dan anorganik. Kromatografi sangat berguna untuk pemisahan campuran yang kompleks, isolasi zat yang tidak stabil, dan pemisahan senyawa-senyawa yang memiliki hubungan dekat (isomer, homolog, dan lain-lain) (Lederer and Lederer, 1957). Pemisahan dicapai dengan mendistribusikan zat yang akan dipisahkan ke dalam dua fase, yaitu fase diam dan fase gerak. Zat terlarut yang terdistribusi dalam fase gerak akan bergerak lebih cepat melalui sistem daripada yang terdistribusi dalam fase diam (Cazes and Scott, 2002). Kromatografi merupakan suatu metode pemisahan yang belakangan ini banyak digunakan jika dibandingkan dengan metode lain seperti destilasi, kristalisasi, ekstraksi, pengendapan, dan lain sebagainya. Kromatografi mempunyai keuntungan dalam hal pelaksanaan yang lebih sederhana terutama waktu yang singkat, mempunyai kepekaan yang tinggi, serta mempunyai kemampuan memisahkan yang tinggi (Miller, 2003).

2.7.1 Kromatografi Cair

Kromatografi cair adalah teknik yang digunakan untuk memisahkan sampel menjadi komponen-komponennya. Pemisahan ini terjadi berdasarkan interaksi sampel dengan fase gerak dan fase diam. Kromatografi cair merupakan teknik yang paling penting dan banyak digunakan untuk pemulihan dan isolasi protein, peptide, dan biomolekul lainnya. Kromatografi cair telah terbukti tidak hanya sangat selektif, tetapi juga sangat fleksibel, dan sangat lembut. Kombinasi unik ini memungkinkan hasil yang baik dari massa dan aktivitas biologis bersama dengan kemurnian yang sangat tinggi (Afeyan *et al.*, 1992). Kromatografi cair modern yang banyak digunakan untuk proses pemisahan adalah kromatografi cair kinerja tinggi (KCKT). Kromatografi cair modern juga dapat dipadukan dengan detektor-detektor khusus seperti spektroskopi massa sehingga dapat digunakan untuk mengidentifikasi komponen yang terdapat di dalam sampel.

2.7.2 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Teknik KLT merupakan teknik kromatografi sederhana yang sering digunakan dalam tahapan identifikasi awal untuk melihat komponen-komponen yang terdapat dalam suatu sampel berdasarkan noda-noda yang muncul pada kromatogram. Fase diam yang digunakan biasanya berupa alumina atau silika gel. KLT termasuk teknik yang paling efektif dengan biaya murah untuk analisis sampel tanpa perlu melakukan pembersihan sampel dari pengotor. Karena semua sampel terletak di kromatogram, maka teknik ini merupakan teknik paling sesuai untuk pengamatan karakteristik sampel (Poole, 2003). Penelitian dalam bidang kimia organik khususnya dalam isolasi bahan alam banyak memanfaatkan analisis menggunakan KLT karena merupakan teknik yang sederhana dan cepat untuk mengetahui komponen-komponen dalam suatu campuran ekstrak ataupun fraksi (Bele and Khale, 2011).

Jika silika gel digunakan sebagai fase diam, maka fase diam bersifat polar sehingga saat diberikan dua senyawa yang memiliki kepolaran berbeda, senyawa yang lebih polar akan memiliki interaksi yang lebih kuat dengan silika dan karenanya lebih mampu untuk menghilangkan fase gerak dari tempat-tempat yang mengikat. Akibatnya, senyawa yang kurang polar bergerak lebih tinggi ke atas pelat (menghasilkan nilai faktor retensi (RF) yang lebih besar). Jika fase gerak diubah menjadi lebih pelarut polar atau campuran pelarut, maka pelarut lebih mampu menghilangkan zat terlarut dari tempat ikatan silika dan semua senyawa pada pelat KLT akan bergerak lebih tinggi ke atas pelat. Pendeteksian hasil KLT dapat dilakukann dengan visualisasi menggunakan lampu UV_{254nm} yang berguna untuk mendeteksi adanya senyawa-senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi, kemudian lampuUV_{366nm} berguna untuk mendeteksi senyawa-senyawa yang dapat berflorosensi, seperti golongan flavonoid. Reagen-reagen spesifik juga dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan suatu komponen tertentu (Bele and Khale, 2011).

2.7.3 Kromatografi Kolom

Kromatografi kolom merupakan teknik kromatografi yang digunakan untuk proses pemurnian suatu sampel dengan menggunakan kolom yang berisi absorben tertentu seperti silika gel. Pada suatu kolom (fase diam) terlebih dahulu dimasukkan kemudian sampel dan eluen (fase gerak) dimasukkan hingga terjadi proses pemisahan. Kromatografi kolom merupakan teknik konvensional yang sederhana sehingga dapat digunakan dengan mudah dalam proses pemisahan senyawa (Coskun, 2016).

2.8 Spektroskopi Massa

Spektrometri massa adalah teknik spektroskopi yang digunakan untuk mengidentifikasi suatu senyawa dalam sampel. Spektroskopi massa menentukan fragmen karakteristik atau ion yang timbul dari pemecahan molekul organik. Prinsip dasarnya adalah suatu molekul organik dibombardir dengan elektron berenergi tinggi, maka akan menghasilkan ion molekul. Selanjutnya, ion molekul akan terfragmentasi dengan memanfaatkan energi elektron untuk memutuskan ikatan dan menghasilkan spesi bermuatan positif atau ion fragmen. Ion positif atau ion fragmen yang terbentuk dipercepat dan dibelokkan melingkar dalam jalur medan magnet dan kemudian difokuskan pada detektor atau pelat fotografi sesuai dengan massa dan muatannya. Setiap ion mewakili garis yang terpisah di pelat dan dicatat dalam bentuk intensitas puncak. Ion defleksi didasarkan pada muatan, massa, dan kecepatan ion, pemisahan didasarkan pada rasio massa terhadap muatan (m/z) dan deteksi sebanding dengan kelimpahan ion. Sampel dapat disuntikkan ke dalam instrumen baik dengan infus langsung atau melalui pemisahan kromatografi multidimensi, seperti kromatografi cair atau kromatografi gas. Penggabungan teknik kromatografi dengan spektroskopi massa dapat menghasilkan suatu teknik instrumentasi yang menguntungkan karena sensitivitasnya yang tinggi sehingga akurasi data yang didapatkan lebih akurat (Rajawat and Jhingan, 2019).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Biomassa, UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (LTSIT), Universitas Lampung, Laboratorium Kimia Organik, Departemen Kimia, Institut Pertanian Bogor (IPB), dan Pusat Studi Biofarmaka IPB. Analisis LC-MS/MS dilakukan di Pusat Laboratorium Forensik (Puslabfor), Sentul, Bogor. Penelitian ini dilakukan dari bulan September-Maret.

3.2 Alat dan Bahan

Adapun alat-alat digunakan pada penelitian ini adalah *hot plate stirrer* (Sojiky HS-12), oven (Precision Vacuum Oven), *autoclave* (Tomy SX-700 High Pressure Steam Sterilizer), *laminar air flow* (Esco), bunsen, jarum ose, korek api, neraca analitik (Wigen Hauser JD-300-3), *plate reader* (Hospitex Diagnostic), mikropipet 10-100 μL dan 200-1000 μL (DragonLab), tip mikropipet (OneMed), *microplate* 96-well (IWAKI), *plate* 24-well (IWAKI), alat-alat gelas, inkubator (Memmert CO₂ Incubator), kolom kromatografi, kaca preparat (OneMed), cawan petri, mikroskop cahaya (Zeiss Axio A1), *rotary evaporator* (Buchi Rotavapor R-210 dan Buchi Rotavapor R-220 SE), dan *liquid chromatography-mass spectroscopy* (LC-MS) Acquity UPLC® H-Class System (Waters), acquity UPLC® HSS C18 column (1,8 μm 2,1 \times 100 Mm) (Waters), dan Xevo G2-S Qtof mass spectro (Waters).

Adapun bahan-bahan digunakan pada penelitian ini adalah kulit udang, NaOH teknis, HCl pekat p.a. (Merck), ekstrak malt (Merck), ekstrak ragi (Merck), glukosa (Merck), agar, media nutrient agar (Merck), alkohol 70%, akuades, NaCl teknis,

etil asetat teknis, *n*-heksana teknis, pereaksi serium sulfat, pereaksi dragendrof, pereaksi ninhidrin, pereaksi vanillin-asam sulfat, koloid kitin, *tryptic soy broth* (TSB) (Merck), indikator Resazurin (Sigma-Aldrich), metanol p.a. (Merck), kloramfenikol, aluminium foil, kertas saring, tisu, air laut buatan, plat silika (Merck), silika gel 60 (0,040-0,060 mm) (Merck), *n*-heksan p.a. (Merck), dan etil asetat p.a. (Merck).

3.3 Metode

3.3.1 Pengambilan Sampel dan Pengayaan

Pengambilan sampel dilakukan secara random di empat titik berbeda dikawasan hutan mangrove. Pengayaan endofit dilakukan langsung di tempat setelah selesai melakukan pengambilan sampel. Media yang digunakan untuk pengayaan endofit adalah agar koloid kitin (AKK) 1% dalam air laut buatan yang disterilisasi menggunakan *autoclave* suhu 121 °C, tekanan 1,2 atm selama 20 menit, dan ditambahkan kloramfenikol 0,02% untuk mencegah pertumbuhan bakteri. Pengayaan dilakukan berdasarkan pada (Kjer *et al.*, 2010) dengan beberapa modifikasi, untuk bagian ranting dan akar menggunakan metode sterilisasi permukaan dan daun menggunakan metode cawan sebar. Sampel akar dan ranting dipotong $\pm 1 \times 1$ cm lalu dibersihkan dan disterilkan permukannya dengan alkohol 70%, NaOCl, akuades steril, dan air laut buatan steril. Potongan akar dan ranting diletakkan di atas permukaan media AKK 1% dan diinkubasi selama 7-14 hari pada suhu ruang. Untuk sampel daun dihaluskan terlebih dahulu dan kemudian diencerkan dengan air laut buatan steril. Aliquot sebanyak 100 μ L diambil dan disebar diatas permukaan cawan agar koloid kitin 1% dan diinkubasi.

3.3.2 Isolasi Aktinomisetes Endofit

Setelah hari ke-10 koloni-koloni endofit yang diperkirakan sebagai aktinomisetes dipisahkan ke media AKK 1% yang baru menggunakan metode cawan gores yang didasarkan pada (Ruangpan and Tendencia, 2004). Satu ose penuh koloni endofit

diambil dan digoreskan pada media agar koloid kitin 1%, kemudian diinkubasi pada suhu ruang. Langkah ini dapat diulang beberapa kali sampai diperoleh koloni tunggal yang dianggap murni setelah pengamatan morfologi secara makroskopis. Isolat murni harus tumbuh selama ~1–2 minggu sebelum pemeriksaan lebih lanjut.

3.3.3 Identifikasi Morfologi

Struktur miselium dan spora aktinomisetes diamati secara mikroskopis pada perbesaran 50x, 100x, dan 400x dengan metode *coverslip culture medium* (Goodfellow *et al.*, 2012). *Coverslip* yang bersih dan steril ditanam pada sudut 45° dalam *plate* agar dan dinkubasi selama 7 hari. *Coverslip* dikeluarkan dari *plate* agar dengan menggunakan pinset dan diletakkan di atas kaca objek yang bersih. *Coverslip* diamati menggunakan mikroskop cahaya Zeiss Axio A1.

3.3.4 Kultivasi dan Ekstraksi

Inokulum dibuat sebanyak 30 mL dengan menggunakan media cair koloid kitin 1% dalam air laut buatan (NaCl 3%) dalam labu Erlenmeyer 100 mL dan diinkubasi selama 7 hari dengan keadaan statis. Fermentasi dilakukan menggunakan teknik *solid state fermentation* (SSF) berdasarkan pada (Setiawan *et al.*, 2021) dengan beberapa modifikasi. Kulit udang diambil dari PT. Indokom Samudra Persada, Lampung Selatan. Kemudian dicuci menggunakan air untuk menghilangkan kotoran dan didiamkan hingga air kering. Kulit udang dihaluskan dengan blender hingga hancur. Selanjutnya, kulit udang dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 2000 mL dan disterilisasi menggunakan *autoclave*. Inokulum dipindahkan ke dalam media kulit udang (1:7,5), diinkubasi selama 14 hari dalam keadaan statis pada suhu ruang. Biomassa aktinomycetes diekstraksi menggunakan etil asetat (EtOAc), kemudian filtrat EtOAc dipisahkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak dikarakterisasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT) dengan eluen *n*-heksana : EtOAc dan direaksikan dengan preaksi spesifik serum sulfat, Dragendrof, dan vanillin-asam sulfat (**Lampiran 2**).

3.3.5 Skrining Aktivitas Antibakteri

Skrining aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode *microdilution plate* didasarkan pada (Setiawan, *et al.*, 2022) dengan beberapa modifikasi. Percobaan dilakukan menggunakan *microplate* 96-well dengan Resazurin sebagai indikator warna. Stok bakteri patogen resisten (*Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aureginosa*) diremajakan pada media agar TSB 3% selama 18 jam, kemudian dibuat inokulum pada media TSB cair yang diinkubasi selama 4 jam, disesuaikan dengan standar kekeruhan 0,5 Mc Farland (10^8 CFU/mL). Pengujian dilakukan dengan tiga kali pengulangan. Kloramfenikol 2 mg/mL digunakan sebagai kontrol positif, ekstrak sampel 2 mg/mL dalam metanol pa 12,5% digunakan sebagai senyawa uji, dan methanol pa 12,5% digunakan sebagai kontrol negatif. *Plate* uji diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37 °C, kemudian nilai *optical density* (OD) diukur pada menggunakan *plate reader* Hospitex Diagnostic. Setelah itu, Resazurin ditambahkan dan diinkubasi selama 2 jam, kemudian diamati perubahan warna yang terjadi.

3.3.6 Karakterisasi Isolat Unggul

Isolat aktinomisetes unggul dikarakterisasi morfologinya baik secara makroskopis dan mikroskopis menggunakan *scanning electron microscope* (SEM) berdasarkan (Setiawan *et al.*, 2021) dengan beberapa modifikasi. Isolat unggul digores pada permukaan agar standar ISP-2 yang telah ditanam dengan *coverslip*, kemudian diinkubasi selama ± 3 hari dan *coverslip* dicabut untuk diamati menggunakan SEM.

3.3.7 Kultivasi Skala Besar (*Scale Up*) dan Fraksinasi

Scale up dilakukan untuk mendapatkan ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri dalam jumlah yang cukup banyak sehingga dapat digunakan untuk analisis selanjutnya. Isolat unggul yang aktif dikultivasi dalam jumlah tiga kali lebih banyak menggunakan Elenmeyer 2000 mL dengan media kulit udang dan diinkubasi selama 14 hari pada keadaan statis dan biomassa aktinomisetes diekstraksi dengan

EtOAc dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*. Ekstrak kasar dimurnikan dan difraksinasi menggunakan silika gel dengan teknik kromatografi kolom terbuka dengan eluen yang sesuai. Setiap fraksi yang diperoleh diuji kembali aktivitas antibakterinya untuk mendapatkan fraksi unggul untuk analisis selanjutnya.

3.3.8 Purifikasi dan Karakterisasi Senyawa

Fraksi aktif terpilih akan dimurnikan kembali menggunakan teknik kromatografi kolom hingga diperoleh senyawa murni dan dikarakterisasi menggunakan LC-MS/MS (**Lampiran 6**). Diagram alir penelitian ini dapat dilihat secara lengkap pada **Lampiran 1**.

V. SIMPULAN DAN SARAN

5.1 Simpulan

Adapun simpulan yang dapat diambil dari penelitian ini, sebagai berikut:

1. Isolasi mikroba endofit mangrove di Hutan Mangrove Peterngoran, Pesawaran, Lampung menunjukkan bahwa berhasil diisolasi total 19 isolat mikroba endofit mangrove dan 6 isolat telah diidentifikasi sebagai aktinomisetes.
2. Kultivas pada media kulit udang menunjukkan bahwa aktinomisetes yang diisolasi dapat tumbuh pada media kulit udang yang ditandai dengan munculnya warna putih pada permukaan media kultivasi dan setelah diekstraksi dengan EtOAc menghasilkan ekstrak kasar dengan rendemen rata-rata 0,515%.
3. Hasil skrining aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa 6 isolat aktinomisetes menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* resisten dan isolat 22-PLP4-A1 menunjukkan aktivitas penghambatan tertinggi sebesar 51,96%.
4. Isolasi senyawa menunjukkan bahwa diperoleh kristal murni (FE-1d) tidak berwarna dengan berat 10 mg dan karakterisasi dengan LC-MS/MS menunjukkan 2 senyawa dengan kelimpahan relatif yang tinggi pada puncak 12,40 dan 13,67 menit dengan *base peak* m/z 304,3004 dan m/z 332,3308 [M+H]⁺ dengan rumus molekul C₂₁H₃₈N dan C₂₃H₄₂N yang diduga sebagai senyawa turunan benzilamin (N-benzil-1-tetradekanamin dan Benzilamin N,N-dioktil).
5. Kristal FE-1d hasil isolasi tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* resisten.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian ini, diketahui bahwa kristal FE-1d memiliki potensi sebagai agen antikanker. Maka perlu:

1. Uji bioaktivitas lanjutan perlu dilakukan untuk mengetahui bioaktivitas yang dimiliki oleh kristal Fe-1d seperti uji antifungi, antidorman, sitotoksitas, dan sebagainya.
2. Pemurnian kembali dan analisis menggunakan instrumen NMR untuk memastikan struktur senyawa dari kristal FE-1d.
3. Perlu dilakukan analisis filogenetik untuk memastikan secara spesifik spesies dari isolat aktinomisetes 22-PLP4-A1.
4. Kajian lebih lanjut secara *in silico* dari senyawa yang didapatkan untuk mengetahui potensi senyawa tersebut melalui interaksinya dengan suatu protein sel pada penyakit tertentu.

DAFTAR PUSTAKA

- Afeyan, N. B., Gordon, N. F., Fulton, S. P., and Regnier, F. E. 1992. Perfusion Chromatography: a Novel Tool for Protein Purification and Analysis. In *Techniques in Protein Chemistry III*. Academic Press, Inc. Cambridge.
- Akova, M. 2016. Epidemiology of antimicrobial resistance in bloodstream infections. *Virulence*, 7(3), 252–266.
- Amrita, K., Nitin, J., and Devi, C. S. 2012. Novel bioactive compounds from mangrove derived actinomycetes. *International Research Journal of Pharmacy*, 3(9), 25–29.
- 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.
- 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.
- Bele, A., Khale, A., and Archana, M. 2011. an Overview on thin layer chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(2), 256–267.
- Bennur, T., Kumar, A. R., Zinjarde, S., and Javdekar, V. 2015. Nocardiosis species: Incidence, ecological roles and adaptations. *Microbiological Research*, 174, 33–47.
- Bergquist, J., and Silberring, J. 1998. Identification of catecholamines in the immune system by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12(11), 683–688.
- Bialecki, J., Ruzicka, J., and Attygalle, A. B. 2006. An unprecedented rearrangement in collision-induced mass spectrometric fragmentation of protonated benzylamines. *Journal of Mass Spectrometry*, 41, 1195-1204.
- Brader, G., Compant, S., Vescio, K., Mitter, B., Trognitz, F., Ma, L. J., and

- Sessitsch, A. 2017. Ecology and Genomic Insights into Plant-Pathogenic and Plant-Nonpathogenic Endophytes. *Annual Review of Phytopathology*, 55(May 2017), 61–83.
- Chatterjee, A., and Abraham, J. 2020. Mangrove endophytes: A rich source of bioactive substances. In *Biotechnological Utilization of Mangrove Resources*. INC.
- Chen, M. S., Chen, X. H., Huang, Z. H., Yan, X. R., and Tuo, L. 2021. *Phycococcus avicenniae* sp. nov., a novel endophytic actinomycete isolated from a branch of *Avicennia mariana*. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 114(9), 1431–1442.
- Coskun, O. 2016. Separation techniques: chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*, 3(2), 156–160.
- Damai, A. A., Boer, M., Marimin, Damar, A., and Rustiadi, E. 2011. Analisis prospektif partisipatif dalam pengelolaan wilayah pesisir teluk Lampung. *Forum Pascasarjana*, 34(2), 281–296.
- Das, S. K., Samantaray, D., Patra, J. K., Samanta, L., and Thatoi, H. 2016. Antidiabetic potential of mangrove plants: a review. *Frontiers in Life Science*, 9(1), 75–88.
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., and Walker, M. J. 2020. Antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(3).
- Ding, L., Maier, A., Fiebig, H.-H., Görls, H., Lin, W.-H., Peschel, G., and Hertweck, C. 2011. Divergolides A-D from a Mangrove Endophyte Reveal an Unparalleled Plasticity in ansa-Macrolide Biosynthesis. *Angewandte Chemie*, 123(7), 1668–1672.
- Ding, L., Maier, A., Fiebig, H. H., Lin, W. H., and Hertweck, C. 2011. A family of multicyclic indolosesquiterpenes from a bacterial endophyte. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9(11), 4029–4031.
- Fujita, K. ichi, Enoki, Y., and Yamaguchi, R. 2008. Cp*Ir-catalyzed N-alkylation of amines with alcohols. A versatile and atom economical method for the synthesis of amines. *Tetrahedron*, 64(8), 1943–1954.
- Gayathri, P., and Muralikrishnan, V. 2013. Isolation and characterization of Endophytic Actinomycetes from mangrove plant for antimicrobial activity. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2(11), 78–89.

- Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W., & Whitman, W.B. (Eds.). 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed. Springer. New York.
- Gomes, R. C., Semêdo, L. T. A. S., Soares, R. M. A., Alviano, C. S., Linhares, L. F., and Coelho, R. R. R. 2000. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Letters in Applied Microbiology*, 30(2), 146–150.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H., Zhuang, L., Lin, H. P., Yu, H. P., Li, J., Yao, X. S., Goodfellow, M., and Ruan, J. S. 2009. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Marine Drugs*, 7(1), 24–44.
- Ignacimuthu, S., and Shanmugam, N. 2010. Antimycobacterial activity of two natural alkaloids, vasicine acetate and 2-acetyl benzylamine, isolated from Indian shrub *Adhatoda vasica* Ness. leaves. *Journal of Biosciences*, 35(4), 565–570.
- Jiang, Z. K., Hu, X. X., Xiao, L. L., Ren, Y. R., Shakhtina, A. N., Lukianov, D. A., Osterman, I. A., Sergiev, P. V., Dontsova, O. A., Wang, H., Wu, G., You, X. F., and Sun, C. H. 2021. Beilunmycin, a new virginiamycin antibiotic from mangrove-derived *Streptomyces* sp. 2BBP-J2 and the antibacterial activity by inhibiting protein translation. *Journal of Asian Natural Products Research*, 23(10), 992–1000.
- Katritzky, A. R., Lue, P., Rasala, D., and Urogdi, L. 1989. The Chemistry of N-Substituted Benzotriazoles. Part 14. Novel Routes to Secondary and Tertiary Amines and to N,N-Disubstituted Hydroxylamines. *Journal of the Chemical Society Perkin Transaction 1*, 1989 225-233.
- Kjer, J., Debbab, A., Aly, A. H., and Proksch, P. 2010. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nature Protocols*, 5(3), 479–490.
- KKP. 2020. Produksi Udang Budi Daya di Indonesia (<https://kkp.go.id/brsdm/sosek/artikel/39265-produksi-budi-daya-udang-di-indonesia>). Diakses pada 15 Juni 2022 pukul 20.30 WIB.
- Kumar, A., Droby, S., Singh, V. K., Singh, S. K., and White, J. F. 2020. Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial Endophytes* (Vol. 1, Issue May 2019).
- Larsson, D. G. J., and Flach, C. F. 2022. Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269.

- Lederer, E., and Lederer, M. 1957. *Chromatography: A Review of Principles and Application*. Elsevier Publishing Company. Amsterdam.
- Li, Q., Chen, X., Jiang, Y., and Jiang, C. 2016. Morphological Identification of Actinobacteria. *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, i.
- Lin, W., Li, L., Fu, H., Sattler, I., Huang, X., and Grabley, S. 2006. Erratum: New cyclopentenone derivatives from an endophytic *Streptomyces* sp. isolated from the mangrove plant *Aegiceras comiculatum* (The Journal of Antibiotics (2005) 58, 9 (594-598)). *Journal of Antibiotics*, 59(2), 594–598.
- Lin, C., Lu, C., and Shen, Y. (2010). Three New 2-pyranone Derivatives from Mangrove. *Cell*, 4, 176–179.
- Marshall, K. C., and Alexander, M. 1960. Growth Characteristics of Fungi and Actinomycetes. *Journal of Bacteriology*, 80(3), 412–416.
- Masand, M., Jose, P. A., Menghani, E., and Jebakumar, S. R. D. 2015. Continuing hunt for endophytic actinomycetes as a source of novel biologically active metabolites. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(12), 1863–1875.
- Miller, J. M. 2003. *Chromatography. Digital Encyclopedia of Applied Physics* (Issue Ic).
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., and Pardesi, K. R. 2019. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: A review. *Frontiers in Microbiology*, 10(APR).
- Neill, J. O'. 2014. *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired*. December.
- Niksic, H., Becic, F., Koric, E., Gusic, I., Omeragic, E., Muratovic, S., Miladinovic, B., and Duric, K. 2021. Cytotoxicity screening of *Thymus vulgaris* L. essential oil in brine shrimp nauplii and cancer cell lines. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9.
- Nimura, K., Niwano, Y., Ishiduka, S., and Fukumoto, R. 2001. Comparison of in vitro antifungal activities of topical antimycotics launched in 1990s in Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(2), 173–178.
- Okumu, M. O., Mbaria, J. M., Gikunju, J. K., Mbuthia, P. G., Madadi, V. O., Ochola, F. O., and Jepkorir, M. S. 2021. *Artemia salina* as an animal model for the preliminary evaluation of snake venom-induced toxicity. *Toxicon: X*, 12, 100082.

- Pandey, A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 81–84.
- Poole, C. F. 2003. Thin-layer chromatography: Challenges and opportunities. *Journal of Chromatography A*, 1000(1–2), 963–984.
- Postberg, F., Khawaja, N., Abel, B., Choblet, G., Glein, C. R., Gudipati, M. S., Henderson, B. L., Hsu, H. W., Kempf, S., Klenner, F., Moragas-Klostermeyer, G., Magee, B., Nölle, L., Perry, M., Reviol, R., Schmidt, J., Srama, R., Stolz, F., Tobie, G., and Waite, J. H. 2018. Macromolecular organic compounds from the depths of Enceladus. *Nature*, 558(7711), 564–568.
- Rajawat, J., and Jhingan, G. 2019. Mass spectroscopy. In *Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources*. Elsevier Inc.
- Ruangpan, L., and Tendencia, E. 2004. Bacterial isolation, identification and storage. *Laboratory Manual of Standardized Methods for Antimicrobial Sensitivity Tests for Bacteria Isolated from Aquatic Animals and Environment*, 3–11.
- Setiawan, A., Lutfiah, R., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Hendri, J., and Arai, M. 2022. Antibacterial activity of EtOAc extract from marine-derived fungus *Aspergillus nomiae* A12-RF against clinical pathogen bacteria *Staphylococcus aureus*. *Bioflux* 15(3), 1413–1421.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., and Arai, M. 2022. Fungicide Activity of Culture Extract from *Kocuria palustris* 19C38A1 against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Fungi*, 8(3).
- Setiawan, A., Widyastuti, W., Irawan, A., Wijaya, O. S., Laila, A., Setiawan, W. A., Juliasih, N. L. G. R., Nonaka, K., Arai, M., and Hendri, J. 2021. Fermentation shrimp shell waste in solid state using *Pseudonocardia carboxydivorans* 18A13O1 to produce bioactive metabolites. *Fermentation*, 7(4), 1–10.
- Singh, R., and Dubey, A. K. 2015. Endophytic Actinomycetes as Emerging Source for Therapeutic Compounds. *Indo Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, 05(02), 106–116.
- Tharasse-Block, C., Chabenat, C., Boucly, P., and Marchand, J. 1987. Determination of ambenonium chloride in serum by reversed-phase ion-pair liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 421(C), 407–411.

- Turner, R. A. 1965. *Screening Methods in Pharmacology*. Academic Press. New York.
- Valli, S., Sugasini, S. S., Aysha, O. S., Nirmala, P., Vinoth Kumar, P., and Reena, A. 2012. Antimicrobial potential of actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(6), 469–473.
- Wang, P., Kong, F., Wei, J., Wang, Y., Wang, W., Hong, K., and Zhu, W. 2014. Alkaloids from the mangrove-derived actinomycete *Jishengella endophytica* 161111. *Marine Drugs*, 12(1), 477–490.
- WHO. 2017. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics are Urgently Needed (<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>). Diakses tanggal 10 Agustus 2022 pukul 20.33 WIB.
- WHO. 2021. Antimicrobial Resistance (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>). Diakses tanggal 10 Agustus 2022 pukul 20.03 WIB.
- Xie, Q. Y., Wang, C., Wang, R., Qu, Z., Lin, H. P., Goodfellow, M., and Hong, K. 2011. *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Micromonosporaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(5), 1153–1159.
- Xu, D. B., Ye, W. W., Han, Y., Deng, Z. X., and Hong, K. 2014. Natural products from mangrove actinomycetes. *Marine Drugs*, 12(5), 2590–2613.
- Yaron, S., and Römling, U. 2014. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microbial Biotechnology*, 7(6), 496–516.