

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI
ENDOFIT MANGROVE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

(Skripsi)

Oleh

**CICI NURHIDAYAH
NPM 1917011081**



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

ABSTRAK

ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT MANGROVE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN

Oleh

CICI NURHIDAYAH

Penelitian ini dilatar belakangi oleh adanya fenomena infeksi yang disebabkan bakteri yang resisten terhadap berbagai antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh senyawa bioaktif yang berasal dari fungi endofit mangrove yang berpotensi sebagai antibakteri. Isolat fungi dari endofit mangrove diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar *ring* dan analisis karakteristik senyawa menggunakan LC-MS/MS dan FTIR. Fungi endofit mangrove diremajakan menggunakan media agar koloid kitin hingga mendapatkan isolat murni. Isolat dikultivasi menggunakan metode OSMAC dengan 3 media berupa kulit udang, beras, dan kentang. Kultur diekstraksi menggunakan etil asetat. Ekstrak kasar diuji bioaktivitasnya sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *S.aureus* dan *P.aeruginosa*. Ekstrak kasar isolat potensial diuji bioautografi kontak. Fraksinasi dilakukan menggunakan kromatografi kolom dan diuji aktivitas antibakterinya dengan bioautografi *overlay*. Fraksi aktif selanjutnya dikarakterisasi menggunakan LC-MS/MS dan FTIR. Sebanyak 6 isolat fungi endofit yang telah diremajakan terindikasi genus *Aspergillus* dan *Acremonium*. Skrining antibakteri dari keenam isolat menunjukkan isolat 21BC3-LRB memiliki daya hambat yang paling besar terhadap *S.aureus* dan isolat 21BC2-LRKU terhadap *P.aeruginosa*. Karakteristik senyawa yang dihasilkan fraksi 21BC2-LRKU1 menunjukkan adanya senyawa alkaloid dengan struktur dasar pirolidin dan terdapat beberapa gugus fungsi antara lain gugus C – H, gugus C=O, gugus N – H, dan gugus C – N tersier.

Kata kunci : Fungi endofit mangrove, kitin, antibakteri

ABSTRACT

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF MANGROVE ENDOPHYT FUNGI AND TESTING THEIR BIOACTIVITY AS ANTIBACTERIAL AGAINST PATHOGEN BACTERIA

By

CICI NURHIDAYAH

The rising prevalence of antibiotic-resistant bacterial infections underscores the urgent need for alternative therapeutic agents. This study focuses on harnessing the potential of bioactive compounds from mangrove endophytic fungi with antibacterial properties. Fungal isolates obtained from mangrove endophytes underwent antibacterial testing using the agar ring diffusion method. Compound characteristics were analyzed using LC-MS/MS and FTIR. Rejuvenation of mangrove endophytic fungi involved the use of colloidal chitin agar media to obtain pure isolates. The OSMAC method, employing shrimp shells, rice, and potatoes as media, was used for isolate cultivation. Ethyl acetate was employed for culture extraction. Crude extracts were evaluated for antibacterial activity against pathogenic bacteria, specifically *S. aureus* and *P. aeruginosa*, using the agar well diffusion method. Bioactivity was further confirmed through contact bioautography. Column chromatography facilitated fractionation, and overlay bioautography assessed antibacterial activity of fractions. The active fraction was characterized using LC-MS/MS and FTIR. Among the rejuvenated isolates, six were identified as belonging to the genera *Aspergillus* and *Acremonium*. Antibacterial screening revealed that isolate 21BC3-LRB exhibited significant inhibition against *S. aureus*, while isolate 21BC2-LRKHU demonstrated notable activity against *P. aeruginosa*. The characterization of compounds produced by the 21BC2-LRKHU1 fraction indicated the presence of alkaloid compounds with a pyrrolidine basic structure. Functional groups identified included C–H, C=O, N–H, and tertiary C–N groups.

Keyword : Mangrove endophytic fungi, chitin, antibacterial

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI
ENDOFIT MANGROVE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI
ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

Oleh

Cici Nurhidayah

Skripsi

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

Pada

Jurusan Kimia

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung



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

Judul Penelitian : **ISOLASI DAN KARAKTERISASI SENYAWA BIOAKTIF FUNGI ENDOFIT MANGROVE SERTA UJI BIOAKTIVITASNYA SEBAGAI ANTIBAKTERI TERHADAP BAKTERI PATOGEN**

Nama : *Cici Nurhidayah*


Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011081


Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

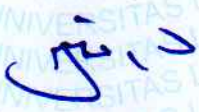


1. Komisi Pembimbing


Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.
NIP. 197308252000031001


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

2. Ketua Jurusan Kimia FMIPA


Mulyono, S.Si., M.Si., Ph.D.
NIP. 197406112000031002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

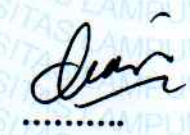
Ketua : Syaiful Bahri, S.Si., M.Si.



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



**Penguji
Bukan Pembimbing : Dr. Dian Herasari, S.Si, M.Si.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

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

NIP. 197110012005011002



Tanggal Lulus Ujian Skripsi : 17 November 2023

**SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI**

Yang bertanda tangan dibawah ini

Nama : Cici Nurhidayah
Nomor Pokok Mahasiswa : 1917011081
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul **“Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Fungi Endofit Mangrove Serta Uji Bioaktivitasnya Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen”** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil penelitian, maupun analisisnya.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan sebenar-benarnya dan penuh kesadaran untuk dapat digunakan sebagaimana mestinya.

Bandar Lampung, 17 November 2023

Yang Menvatakan



Cici Nurhidayah
NPM 1917011081

RIWAYAT HIDUP

Nama : Cici Nurhidayah
Tempat, Tgl Lahir : Cilacap, 30 Januari 2001
Jenis Kelamin : Perempuan
Agama : Islam
Kewarganegaraan : Indonesia
Status : Pelajar
Alamat : A1 No.45 Teluk Gong Kota Jakarta Utara
Telepon : 081369668669
Email : cicinurhidayah97@gmail.com
Pendidikan :
2006 – 2012 SD Negeri 02 Petang, Jakarta Utara
2012 – 2015 SMP Negeri 112, Jakarta Utara
2015 – 2018 SMA Negeri 111, Jakarta Utara
2019 – sekarang S1 Kimia, Universitas Lampung
Pengalaman :
- Founder Ci.nta_Official (2020 – sekarang)
- Anggota HIMAKI (April 2020 – April 2021)
- Anggota BEM FMIPA (Januari 2021 – Januari 2022)
Kemampuan :
- Editing
- Marketing

MOTTO

“Berpikirlah yang positif maka hal-hal yang positif akan datang padamu.”

(Cici Nurhidayah)

“Investasi paling penting yang bisa kamu lakukan adalah untuk dirimu sendiri.”

(Warren Buffett)

“Cara untuk memulai adalah berhenti berbicara dan mulai melakukan.”

(Walt Disney)

“Masa depan adalah milik mereka yang percaya pada keindahan mimpi mereka.”

(Eleanor Roosevelt)

PERSEMBAHAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Dengan mengucapkan *Alhamdulillah* *rabbi 'aalamiin* segenap rasa syukur,
kupersembahkan karya ini kepada:

Keluarga Tersayangku

Mama dan **Papaku** yang selalu mendoakan dan memberi support dalam menyelesaikan studi S1 Kimia.

Dengan segala hormat kepada :

Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., Bapak Prof. Drs. Andi Setiawan, M.Sc., Ph.D., dan Ibu Dr. Dian Herasari, S.Si., M.Si., serta seluruh Dosen Pengajar Jurusan Kimia yang telah membimbing dan mendidik saya hingga mencapai gelar Sarjana.

Sahabatku yang telaj kebersamai, memberikan support, mendoakan, dan memberi semangat.

Almamater tercinta Universitas Lampung.

Kepada diriku sendiri yang telah berjuang.

SANWACANA

Alhamdulillah robbil 'alamin segala puji bagi Allah subhanahu wata'ala atas segala nikmat dan karunia-Nya sehingga Penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Bioaktif Fungi Endofit *Mangrove* Serta Uji Bioaktivitasnya Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen". Sholawat dan salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad shallallahu 'alaihi wassalam, semoga kita diakui sebagai umatnya dan memperoleh syafaatnya, Aamiin.

Penulis menyadari bahwa dalam proses pengerjaan dan penulisan skripsi ini tidak terlepas dari kesulitan dan rintangan, namun itu semua bisa terlewati berkat rahmat dan ridho Allah SWT serta bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga dalam kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Kedua orang tua dan keluarga penulis, yang telah mendo'akan, mendukung, memberikan semangat, memberikan afirmasi positif kepada penulis untuk dapat menyelesaikan pendidikan S1.
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.
3. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung yang telah memberikan semangat belajar sehingga penulis dapat menyelesaikan pendidikan sarjana kimia.
4. Bapak Syaiful Bahri, S.Si., M.Si., selaku Dosen Pembimbing I dan Pembimbing Akademik yang telah membimbing, mengarahkan, menasihati, memotivasi penulis.

5. Bapak Prof. Drs. Andi Setiawan, M.Sc., P.hD., selaku Dosen Pembimbing II yang telah membimbing, memberikan semangat, dan memotivasi penulis.
6. Ibu Dian Herasari, S.Si., M.Si., selaku Dosen Penguji yang telah memberikan arahan, nasihat, dan memotivasi penulis.
7. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia FMIPA Universitas Lampung yang telah mendidik, membimbing, dan memberikan semangat kepada penulis.
8. Rekan seperbimbingan “Syaiful Bahri Research”, Ibnu dan Bayu yang telah memberikan kesan baik, dan saran.
9. Kakak seperbimbingan “Syaiful Bahri Research”, kak Lanang dan Indra yang selalu memberikan semangat dan memberi arahan, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitiannya dengan baik.
10. Kakak-kakak Biomass Annisa Elcentia dan Fendi Setiawan yang telah memberikan arahan kepada penulis selama di laboratorium.
11. Sahabat grup ABCD, Afrilia, Barep, Mauren, Novani, Afif, Isro, dan Dayu, yang selalu memberi support dan mendoakan.
12. Teman dekat saya, Ilham Fadilah yang sudah banyak membantu dan memberi support saya dalam menyelesaikan skripsi.
13. Semua pihak lainnya yang telah membantu dalam penyusunan skripsi ini yang tidak dapat disebutkan satu per satu. Terimakasih.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis menyampaikan permohonan maaf atas segala kekurangan tersebut. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Bandar Lampung, 17 November 2023

Penulis,

Cici Nurhidayah

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR TABEL	xix
DAFTAR GAMBAR.....	xxvi
I. PENDAHULUAN	17
1.1. Latar Belakang	17
1.2. Tujuan Penelitian.....	3
1.3. Manfaat Penelitian.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Ekosistem Mangrove.....	5
2.2. Mikroba Endofit Mangrove.....	6
2.3. Alkaloid.....	7
2.4. Kitin.....	8
2.5. <i>Solid State Fermentation</i>	9
2.6. OSMAC.....	9
2.7. Ekstraksi Senyawa Metabolit	10
2.8. Kromatografi	11
2.8.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	11
2.8.2. Kromatografi Kolom.....	13
2.9. <i>Bioassay</i>	14
2.9.1. Bakteri Patogen.....	14

2.9.2.	Bakteri <i>S.aureus</i>	15
2.9.3.	Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	16
2.9.4.	Antibakteri	17
2.9.5.	Metode Pengujian Antibakteri	17
2.9.6.	Mekanisme antibakteri	19
2.10.	Karakterisasi Senyawa dengan LC-MS/MS	20
2.11.	<i>Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer</i> (FT-IR).....	20
III. METODE PENELITIAN.....		24
3.1.	Waktu dan Tempat Penelitian	24
3.2.	Alat dan Bahan	24
3.3.	Metode Penelitian.....	25
3.3.1.	Peremajaan Isolat Fungi Endofit Mangrove	25
3.3.2.	Kultivasi dan Skrining Antibakteri	26
3.3.3.	Uji Bioautografi Kontak	27
3.3.4.	Fraksinasi Kromatografi Kolom dan Bioautografi <i>Overlay</i>	28
3.3.5.	Karakterisasi Senyawa	28
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		29
4.1.	Peremajaan Isolat Fungi Endofit Mangrove.....	29
4.2.	Kultivasi dan Skrining Antibakteri	32
4.3.	Uji Bioautografi Kontak.....	36
4.4.	Fraksinasi Kromatografi Kolom dan Uji Bioautografi <i>Overlay</i>	37
4.5.	Karakterisasi Senyawa	39
4.5.1.	Karakterisasi dengan <i>Liquid Chromatography Mass Spectrometer</i> (LC-MS/MS).....	39
4.5.2.	Karakterisasi dengan <i>Fourier Transform Infra Red</i> <i>Spectrophotometer</i> (FT-IR).....	43

V. KESIMPULAN DAN SARAN.....	45
5.1. Kesimpulan.....	45
5.2. Saran.....	46
DAFTAR PUSTAKA.....	47
LAMPIRAN.....	54

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Bilangan gelombang FTIR.....	21
2. Identifikasi makroskopis fungi endofit mangrove.	29
3. Identifikasi mikroskopis fungi endofit mangrove dengan pembesaran 400x....	31
4. Massa ekstrak kasar	32
5. KLT hasil ekstrak kasar	33
6. Analisis puncak kromatogram BPI sampel 21BC2-LRKU1	40
7. Gugus fungsi hasil analisis FT-IR.....	44

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Plat KLT.....	12
2. Kromatografi Kolom.....	13
3. Koloni <i>Staphylococcus aureus</i>	15
4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
5. Hasil Skrining Antibakteri pada (a) Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dan (b) Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	34
6. Hasil Bioautografi Kontak	36
7. Hasil Fraksinasi Kromatografi Kolom.....	37
8. KLT Fraksi Hasil Fraksinasi Kolom.....	38
9. Hasil Bioautografi <i>overlay</i>	38
10. <i>Base Peak Intensity</i> (BPI) sampel 21BC2-LRKU1.	39
11. Spektrogram Massa Sampel 21BC2-LRKU1 Waktu Retensi 4,75 menit.	42
12. Perkiraan Struktur Senyawa <i>Peak</i> 4,75 Sampel 21BC2-LRKU1.	42
13. Struktur Dasar Prolidin.	43
14. Spektrum FT-IR Sampel 21BC2-LRKU1.	43

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infeksi nosokomial/HAIs (*Hospital Acquired Infections*) menjadi masalah yang serius bagi kesehatan masyarakat. Sebuah survei yang dilakukan pada 183 rumah sakit di Amerika Serikat dengan 11.282 pasien melaporkan bahwa 4% pasien terinfeksi dengan setidaknya satu jenis HAIs (Haque *et al.*, 2018). Prevalensi infeksi HAIs pada pasien di negara maju bervariasi antara 3,5% dan 12%, sedangkan di negara berkembang termasuk Indonesia prevalensi infeksi HAIs 9,1% dengan variasi 6,1% -16%. Menurut data Kementerian Kesehatan, infeksi HAIs di Indonesia mencapai 15,74%, jauh di atas negara maju yang berkisar 4-8-15,5% (Afriani *et al.*, 2021). Bakteri yang sering menyebabkan infeksi nosokomial adalah *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.* Mikroba ini menular melalui makanan, obat, alat kesehatan, atau kontak langsung melalui tangan medis, paramedis, atau personil rumah sakit lainnya (Konoralma, 2019).

Bakteri *Staphylococcus aureus* tergolong ke dalam patogen manusia yang sangat umum memicu berbagai penyakit menular, seperti infeksi kulit dan jaringan lunak, endokarditis, osteomielitis, bakteremia, dan pneumonia mematikan. Menurut sensitivitas terhadap obat antibiotik, *Staphylococcus aureus* dapat dibagi menjadi sensitif methicillin *Staphylococcus aureus* (MSSA) dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Beberapa dekade terakhir, evolusi bakteri dan penyalahgunaan antibiotik menyebabkan bakteri *S. aureus* secara bertahap memiliki kekebalan terhadap sejumlah antibiotik yang telah ada.

Peristiwa resistensi tersebut menyebabkan tingkat infeksi terkait MRSA meningkat dan menyebabkan pengobatan anti-infeksi klinis menjadi lebih sulit (Guo *et al.*, 2020). Begitupula dengan infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* selalu menjadi tantangan bagi penyedia layanan kesehatan karena *Pseudomonas aeruginosa* memiliki resistensi intrinsik terhadap berbagai macam antimikroba (Tsao *et al.*, 2017). Berbagai strategi penanganan penyakit infeksi tersebut sudah dilakukan, termasuk penggunaan antibiotik dan senyawa antimikroba. Namun demikian, resistensi terhadap senyawa antibiotik/antimikroba kemudian muncul akibat penggunaan dengan dosis yang kurang tepat dan adanya kemampuan mempertahankan diri dari bakteri (Nawea *et al.*, 2017). Hal ini menyebabkan upaya untuk memperoleh jenis antibiotik baik secara sintesis kimia maupun eksplorasi dari isolat-isolat mikroba baru masih terus dilakukan sampai saat ini. Eksplorasi senyawa bahan alam dilakukan baik yang berasal dari hewan, tumbuhan, bakteri, dan fungi (Alvarez *et al.*, 2020). Hingga saat ini kajian mengenai senyawa yang memiliki bioaktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen resisten yang bersumber dari mikroba bahan alam penting untuk dieksplorasi dan dikembangkan.

Keanekaragaman hayati yang kaya menjadi sumber keanekaragaman kimia. Eksplorasi tumbuhan darat telah banyak dilakukan, Etivitasari *et al.* (2021) melaporkan senyawa metabolit arundifungin dari fungi endofit *arthrium sp.* yang berasal dari tumbuhan bangle memiliki aktivitas antibakteri. Akan tetapi, eksplorasi tanaman laut seperti tumbuhan mangrove masih jarang dilakukan. Padahal tumbuhan mangrove memiliki potensi menghasilkan senyawa antibakteri, hal ini dibuktikan dengan berbagai sumber daya yang berasal dari mangrove dan dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional (Kemung *et al.*, 2020). Mangrove telah banyak diuji dan dinyatakan bersifat *antiviral*, *antibakterial* dan *anti-ulcer* (Dhayanithi *et al.*, 2021). Mikroba endofit dapat berupa jamur, bakteri, dan virus. Akan tetapi yang paling banyak dikembangkan saat ini ialah jamur endofit karena jamur lebih banyak menghasilkan senyawa metabolit sekunder (Rozirwan *et al.*, 2018). Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi endofit dapat berfungsi bagi inang untuk meningkatkan ketahanan terhadap serangan mikroba patogen.

Metabolit sekunder seperti alkaloid, fenol, steroid dan terpenoid yang dihasilkan tumbuhan mangrove dinyatakan memiliki kepentingan toksikologi, farmakologi dan ekologi (Dhayanithi *et al.*, 2021). Berdasarkan hal tersebut, pemanfaatan senyawa bioaktif atau metabolit sekunder yang fungsional yang dihasilkan dari fungi endofit dapat menjadi strategi untuk produksi senyawa bioaktif yang fungsional (Tangapo *et al.*, 2022).

Ekosistem mangrove di Indonesia diperkirakan mencakup 23% ekosistem mangrove dunia, penelitian mengenai senyawa antibakteri yang berasal dari endofit mangrove perlu dieksplorasi, khususnya di provinsi Lampung. Berdasarkan hal tersebut, penelitian ini difokuskan pada penemuan senyawa bioaktif dari sediaan deposit fungi endofit mangrove yang berasal dari kawasan hutan mangrove Sriminosari, Lampung Timur yang selanjutnya akan diremajakan menggunakan media agar koloid kitin. Lalu isolat yang tumbuh diamati secara makroskopis dan mikroskopis. Isolat dikultivasi melalui pendekatan OSMAC dengan 3 media yang berupa media kulit udang, selanjutnya dimaserasi menggunakan EtOAc, ekstrak diidentifikasi menggunakan plat KLT, kemudian diskriming dengan metode difusi agar ring untuk memperoleh isolat unggul, selanjutnya isolat unggul diuji bioautografi kontak untuk mengetahui senyawa yang aktif pada KLT. Senyawa yang memiliki aktivitas paling unggul difraksinasi menggunakan kromatografi kolom. Hasil dari fraksinasi diuji bioautografi *overlay*, kemudian dikarakterisasi senyawanya menggunakan LC-MS/MS untuk mengetahui berat molekul dan struktur senyawa yang terdapat pada senyawa bioaktif dan FTIR untuk mengetahui gugus fungsi dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam fungi endofit mangrove.

1.2. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Meremajakan isolat fungi yang berasal dari endofit mangrove Sriminosari, Lampung Timur.

2. Mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat fungi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode difusi agar *ring*.
3. Mengetahui karakteristik senyawa bioaktif dari isolat unggul fungi menggunakan LC-MS/MS dan FTIR.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini, yaitu memberikan informasi mengenai potensi fungi endofit mangrove di kawasan hutan mangrove Sriminosari, Lampung Timur dan aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* serta karakteristik senyawa bioaktif yang dihasilkan.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Ekosistem Mangrove

Pada tahun 2021, luas mangrove nasional berdasarkan hasil pemetaan mangrove nasional adalah 3.364.080 Ha (Ditjen PDASRH, 2021) luas mangrove yang ada di Indonesia merupakan 20,37% dari total luas mangrove di dunia dan menjadikan Indonesia sebagai pemiliki kawasan hutan mangrove terluas di Asia Tenggara (ITTO, 2012). Ekosistem mangrove dikawasan pesisir Labuhan Maringgai, Kabupaten Lampung, Provinsi Lampung Timur, terdapat beberapa jenis mangrove di Labuhan Maringgai, seperti *Avicenna marina*, *Rhizophora mucronate*, *Avicenna officinalis*, dan *Rhizophora apiculate* (Herison *et al.*, 2021).

Ekosistem mangrove adalah ekosistem pantai yang disusun oleh berbagai jenis vegetasi yang mempunyai bentuk adaptasi biologis dan fisiologis secara spesifik terhadap kondisi lingkungan yang cukup bervariasi. Ekosistem mangrove umumnya didominasi oleh beberapa spesies mangrove sejati, di antaranya *Rhizophora sp*, *Avicennia sp*, *Bruguiera sp*, dan *Sonneratia sp*. Spesies mangrove tersebut dapat tumbuh dengan baik pada ekosistem perairan dangkal karena adanya bentuk perakaran yang dapat membantu untuk beradaptasi terhadap lingkungan perairan, baik dari pengaruh pasang surut maupun faktor-faktor lingkungan lainnya yang berpengaruh terhadap ekosistem mangrove seperti suhu, salinitas, oksigen terlarut, sedimen, pH, arus, dan gelombang (Saru, 2019). Ekosistem ini menawarkan banyak keuntungan lingkungan bagi populasi manusia. Duryat *et al*, (2023) melaporkan bahwa di kawasan Pesisir Timur Lampung ditemukan 22

spesies mangrove yang beberapa diantaranya telah dilaporkan memiliki khasiat dalam pencegahan dan penyembuhan penyakit.

2.2. Mikroba Endofit *Mangrove*

Mikroba endofit merupakan mikroba yang hidup dalam jaringan tumbuhan. Mikroba endofit ini berfungsi untuk mempertahankan eksistensi tumbuhan inang untuk tetap dapat bertahan hidup dan untuk melindungi dirinya dari predator. Hal ini membuat mikroba endofit secara terus-menerus memproduksi senyawa-senyawa kimia baru sebagai pertahanan melindungi inangnya (Rozirwan, 2020).

Salah satu tumbuhan yang banyak mengandung senyawa bioaktif yaitu tumbuhan mangrove. Ekstraksi dari tanaman menjadi kurang efektif dengan kendala ketersediaan tumbuhan, maupun degradasi lingkungan yang dapat berdampak pada hilangnya keanekaragaman hayati (Hasiani *et al.*, 2015). Menurut Mukhlis (2018), mikroba endofit mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama atau mirip dengan inangnya, maka isolasi senyawa bioaktif tersebut tidak harus menebang tanaman inang sebagai simplisianya, sehingga biodiversitas tanaman tersebut di alam tetap terjaga. Fungi endofit diketahui sebagai salah satu sumber penghasil berbagai senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri, antifungi, antikanker, dan antivirus. Senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi endofit dapat berfungsi bagi inang untuk meningkatkan ketahanan terhadap serangan mikroba patogen. Spesifikasi inang sebagai asal fungi endofit ikut menjadi faktor penentu kemampuan fungi endofit tersebut dalam memproduksi senyawa bioaktif (Tangapo *et al.*, 2022).

Fungi merupakan organisme eukariotik yang tidak berklorofil dan tumbuh seperti benang, benang tunggal atau bercabang yang disebut hife dan hife ini akan membentuk suatu kumpulan yang disebut dengan miselium (miselia). Hife terdiri dari dua macam yaitu hife fertile dan vegetative. Secara umum fungi dikelompokkan menjadi dua kelompok berdasarkan tipe selnya yaitu fungi yang

bersifat uniseluler (Khamir; ragi, yeast) dan multiseluler (kapang; jamur, cendawan). Fungi dapat bersifat obligat, yaitu tumbuh bersporulasi di laut, atau bersifat fakultatif, yaitu berasal dari lingkungan air tawar atau darat yang mampu tumbuh dan juga bersporulasi di lingkungan laut. Kondisi lingkungan yang ekstrim di laut seperti salinitas tinggi, tekanan tinggi, variasi suhu, kompetisi dengan bakteri, virus dan jamur lain dapat menyebabkan fungi laut mampu mengembangkan senyawa metabolit spesifik yang berbeda dengan jamur terrestrial (Ayer *et al.*, 2018).

2.3. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa alami (produk alam) yang mengandung nitrogen dan memiliki aktivitas biologis yang signifikan. Alkaloid umumnya memiliki sifat kimia yang mirip dengan basa. Beberapa senyawa yang mengandung nitrogen dari tumbuhan tidak bersifat basa, tetapi masih diklasifikasikan sebagai alkaloid karena aktivitas biologisnya memiliki struktur nitrogen heterosiklik yang kompleks (Zhou, 2020). Dapat dilihat dari struktur kimia alkaloid bahwa sebagian besar alkaloid ini Metabolit sekunder ini ditemukan sekitar 20% spesies pada tanaman yang memiliki efek pertahanan terhadap patogen.

Karena aktivitas biologisnya yang kuat, banyak dari sekitar 12.000 alkaloid diketahui telah digunakan sebagai obat, stimulan, anestesi, dan racun. Tidak seperti kebanyakan jenis metabolit sekunder lainnya, banyak jenis alkaloid memiliki sumber biosintetik yang unik (Ziegler, 2008). Melalui upaya bersama ahli kimia, medis, farmakologi dan ahli lainnya, orang telah menemukan bahwa berbagai alkaloid memiliki aktivitas antitumor, antibakteri, antivirus, dan efek terapi lainnya. Sejauh ini, hampir 100 senyawa alkaloid telah digunakan atau sedang diuji klinis (Zhou, 2020). Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun dari peptidoglikan pada sel bakteri sehingga menyebabkan kematian pada sel. Adapun mekanisme lain dari alkaloid dapat menghambat enzim topoisomerase pada sel bakteri (Coyle, 2005).

2.4. Kitin

Kitin adalah homopolimer yang tersusun atas N-acetyl d-glucosamine dan glucosamine yang terikat dengan β 1–4 glycosidic. Kitin ditemukan sebagai bahan penyusun cangkang atau rangka luar serangga dan krustasea, serta penyusun dinding sel fungi, diatom, bakteri, dan alga (Bastiaens *et al.*, 2019). Karakter kitin yang kaku dan keras, serta keberadaannya sebagai bahan penyusun rangka luar atau dinding sel beberapa jenis makhluk hidup diduga terkait peran kitin sebagai templat untuk biomineralisasi kalsium dan silika, dimana fase kalsifikasi dan silikifikasi berpusat pada area keberadaan kitin. Proses ekstraksi kitin dari kulit udang dilakukan menggunakan larutan asam kuat pekat (biasanya HCl) di suhu ruang untuk menghilangkan mineral, diikuti dengan penggunaan basa kuat (umumnya NaOH) di suhu sekitar 100°C untuk melepas protein dan pigmen warna. Hasilnya diperoleh serbuk kitin berwarna putih (Nainggolan, 2023).

Limbah udang (kepala dan kulit) merupakan salah satu sumber bahan baku penghasil kitin yang mudah diperoleh dan berlimpah ketersediaannya di alam. Porsi tubuh udang yang tidak dapat dimakan (termasuk kepala, kulit, dan ekor) dapat mencapai 46% (Arancibia *et al.*, 2014), dengan nilai ekonomi yang sangat rendah. Kandungan kitin pada kulit udang berkisar 15- 40%. Selain itu kulit udang juga mengandung protein sebesar 20-40% dan mineral 30-60% (Bastiaens *et al.*, 2019). Adapun jenis kitin penyusun kulit udang adalah α -kitin, yaitu kitin dengan struktur kristalinitas yang sangat kuat dikarenakan adanya dua ikatan intramolekul dan antar(inter)molekul yang tersusun secara anti-pararel di tiap unit sel kitin yang memungkinkan terbentuknya ikatan hidrogen yang maksimum. Hal ini membuat α -kitin memiliki karakter bahan yang lebih kaku dan stabil dibanding jenis kitin lainnya, bersifat tidak reaktif, dan tidak larut air (Bastiaens *et al.*, 2019).

2.5. *Solid State Fermentation*

Solid-state Fermentation (SSF) didefinisikan sebagai fermentasi yang melibatkan padatan tanpa adanya (atau mendekati tidak adanya) air bebas, namun substrat harus memiliki kelembaban yang cukup untuk mendukung pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme (Maftukhah, 2019).

Tujuan dari SSF adalah untuk membawa kapang atau mikroba yang telah dikultivasi agar berinteraksi dengan kuat pada substrat yang tidak larut serta mencapai konsentrasi nutrisi tertinggi dari substrat (Ningrum, 2015). Menurut Ningrum (2015), fermentasi substrat padat mempunyai beberapa kelebihan, yaitu :

- a. Biasanya menggunakan substrat tunggal, seperti limbah padat yang mengandung karbohidrat, protein, lemak, dan mineral. Oleh sebab itu tambahan lain yang diperlukan biasanya hanya air.
- b. Persiapan inokulum lebih sederhana.
- c. Menghasilkan kepekatan produk yang lebih tinggi. Kontrol terhadap kontaminan lebih mudah.
- d. Memiliki produktivitas yang tinggi.
- e. Kondisi medium mendekati keadaan tempat tumbuh alamiah.
- f. Aerasi optimum.
- g. Tidak diperlukan kontrol pH dan suhu yang teliti.
- h. Biaya rendah.

2.6. OSMAC

Modifikasi komposisi media dan parameter kultivasi jamur dapat memicu pembentukan senyawa baru, yang dikenal sebagai pendekatan *one strain many compound* (OSMAC) (Oktari, 2022).

Mikroorganisme laut, khususnya jamur yang berasal dari laut, telah terbukti menjadi produsen metabolit sekunder yang aktif secara biologis yang menjanjikan untuk bahan kimia dalam penemuan obat. Pengurutan genom keseluruhan jamur

telah menunjukkan adanya jalur diam, yang tidak diekspresikan dalam kondisi kultur standar. Namun, perubahan kondisi kultur dapat mengaktifkan kelompok gen yang berpotensi sehingga meningkatkan variasi metabolit sekunder. Pendekatan OSMAC telah terbukti menjadi strategi yang ampuh dengan mengubah parameter yang berbeda. Sebagai contoh, melalui modifikasi media kultur. Dalam beberapa dekade terakhir, jamur yang berasal dari spons dalam genus *Aspergillus sp.* telah menghasilkan berbagai metabolit, yang telah menampilkan aktivitas biologis dan farmakologis seperti antivirus, antibakteri, antitumor, dan antiinflamasi. Dalam hal ini, pendekatan OSMAC digunakan untuk perbandingan profil metabolik jamur turunan spons *Aspergillus sp.* yang masing-masing dikultur pada media PDB dan media beras padat. Ekstrak EtOAc masing-masing yang diperoleh dari dua kultur dianalisis oleh HPLC mengungkapkan variasi menarik dalam metabolit sekundernya.

2.7. Ekstraksi Senyawa Metabolit

Ekstraksi merupakan salah teknik pemisahan kimia untuk memisahkan atau menarik satu atau lebih komponen atau senyawa-senyawa (analit) dari suatu sampel dengan menggunakan pelarut tertentu yang sesuai. Ekstraksi padat-cair atau *leaching* merupakan proses transfer secara difusi analit dari sampel yang berwujud padat ke dalam pelarutnya. Ekstraksi dari sampel padatan dapat dilakukan jika analit yang diinginkan dapat larut dalam pelarut pengestraksi. Pada ekstraksi ini prinsip pemisahan didasarkan pada kemampuan atau daya larut analit dalam pelarut tertentu. Dengan demikian pelarut yang digunakan harus mampu menarik komponen analit dari sampel secara maksimal. Berdasarkan metode yang digunakan, ekstraksi padat cair dibedakan menjadi maserasi, perkolasi, dan sokletasi (Leba, 2017).

Maserasi merupakan salah satu jenis ekstraksi padat cair yang paling sederhana. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara merendam sampel pada suhu kamar menggunakan pelarut yang sesuai sehingga dapat melarutkan analit dalam sampel.

Sampel biasanya direndam selama 3-5 hari sambil diaduk sesekali untuk mempercepat proses pelarutan analit. Ekstraksi dilakukan berulang kali sehingga analit terekstraksi secara sempurna. Indikasi bahwa semua analit telah terekstraksi secara sempurna adalah pelarut yang digunakan tidak warna. Kelebihan ekstraksi ini adalah alat dan cara yang digunakan sangat sederhana, dapat digunakan untuk analit baik yang tahan terhadap pemanasan maupun yang tidak tahan terhadap pemanasan. Kelemahannya adalah menggunakan banyak pelarut (Leba, 2017).

2.8. Kromatografi

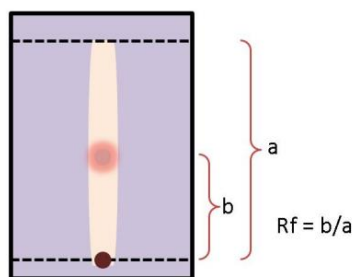
Kromatografi adalah metode pemisahan secara fisika yang mana komponen-komponen yang akan dipisahkan terbagi di antara dua fase, yang satu adalah fase diam sementara yang lain adalah fase gerak yang bergerak pada arah tertentu (Rochman, 2020).

2.8.1. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT merupakan metode pemisahan campuran analit dengan mengelusi analit melalui suatu lempeng kromatografi lalu melihat komponen atau analit yang terpisah dengan penyemprotan atau pengecatan. KLT merupakan metode analisis yang sederhana yang dapat disiapkan di laboratorium dengan cara meletakkan lempeng-lempeng kedalam wadah dengan ukuran yang sesuai lalu discaning secara visual (Gandjar, 2012; Kusna dan Siska, 2023)

Metode ini juga memanfaatkan perbedaan afinitas analit dengan fase gerak dan fase diam untuk mencapai pemisahan campuran kompleks molekul organik. Senyawa yang mempunyai R_f lebih besar berarti mempunyai kepolaran yang rendah, begitu juga sebaliknya. Hal tersebut dikarenakan fasa diam bersifat polar. Senyawa yang lebih polar akan tertahan kuat pada fasa diam, sehingga menghasilkan nilai R_f yang rendah. R_f KLT yang bagus berkisar antara 0,2 - 0,8. Pelat KLT berupa lembaran kaca, logam atau plastik yang dilapisi dengan lapisan tipis adsorben padat.

Sejumlah kecil campuran yang akan dianalisis ditotolkan di bagian bawah pelat dan pelat KLT ditempatkan pada wadah pelarut yang dalam sehingga hanya bagian paling bawah pelat yang berkontak langsung dengan eluen saat dielus. Pelarut bermigrasi ke atas pelat (perkembangan menaik) dan komponen sampel dipisahkan. Pelat KLT dikeluarkan dari bilik dan pelarut dibiarkan menguap, spot noda yang terpisah dapat dideteksi dengan memvisualisasikan di bawah sinar UV 254 nm, 366 nm, maupun sinar fluoresens dengan menggunakan autoradiografi dan pengukuran radiasi dari senyawa berlabel radioaktif. Cara lain dapat dilakukan melalui pencampuran dengan beberapa reagen, misalnya reagen serum (IV) sulfat untuk mendeteksi senyawa organik secara umum, dan reagen *Dragendorff* untuk mendeteksi adanya gugus N tersier (nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K⁺) (Astuti et al., 2021; Setiawan et al., 2022; Susilo & Suciati, 2016).



Gambar 1. Plat KLT

Seperti halnya pada kertas harga R_f didefinisikan sebagai berikut :

$$\text{Harga } R_f = \frac{\text{Jarak yang digerakkan oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang digerakkan oleh pelarut dari titik asal}}$$

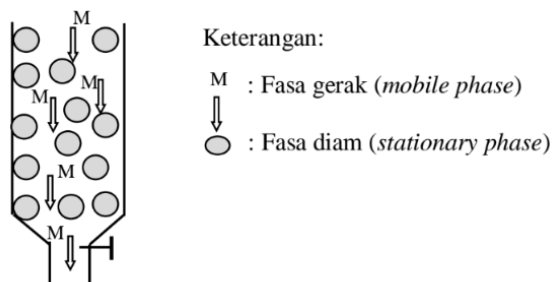
Keuntungan penggunaan KLT untuk analisis antara lain, sampel dalam jumlah banyak dapat dianalisis secara paralel dalam satu waktu secara bersamaan, mudah untuk pelaksanaan multideteksi tanpa mengulang pemisahannya, hasil yang diperoleh dapat berupa foto kromatogram dan data-data yang menyertai suatu kromatogram, resolusi yang tinggi dan pemisahan yang baik sehingga analisis dapat akurat, biaya yang efektif, konsumsi fase gerak yang sedikit dan menyediakan

informasi sidikjari dengan atau tanpa senyawa standar, serta aplikasinya sangat luas (Batubara dan Wahyuni, 2022).

2.8.2. Kromatografi Kolom

Pemisahan dengan kromatografi kolom didasarkan pada mekanisme adsorpsi dan partisi. Proses adsorpsi melibatkan beberapa interaksi yakni ikatan hydrogen, gaya van der Waals, gaya dipol-dipol, interaksi ionik dan filtrasi atau permiasi antara senyawa-senyawa dalam campuran dengan fasa diam. Senyawa yang dapat berinteraksi dengan fasa diam akan teretensi sedangkan senyawa yang tidak dapat berinteraksi dengan fasa diam akan bergerak mengikuti fasa gerak dan elusi terlebih dahulu. Hasil pemisahan dikumpulkan berupa fraksi-fraksi ketika keluar dari kolom (Leba, 2017).

Pada metode ini campuran yang akan dipisahkan dimasukkan pada bagian ujung atas kolom dan fasa gerak dibiarkan mengalir melalui fasa diam di dalam kolom yang pada Gambar hanya dipengaruhi oleh gaya gravitasi, seperti yang diilustrasikan pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Kromatografi Kolom

Menurut Leba (2017) keuntungan pemisahan dengan metode kromatografi kolom adalah:

- a) Dapat digunakan untuk sampel atau konstituen yang sangat kecil.
- b) Cukup selektif terutama untuk senyawa-senyawa organik multi komponen.
- c) Proses pemisahan dalam dilakukan dalam waktu yang relatif singkat.

d) Seringkali murah dan sederhana karena umumnya tidak memerlukan alat yang mahal dan rumit.

2.9. Bioassay

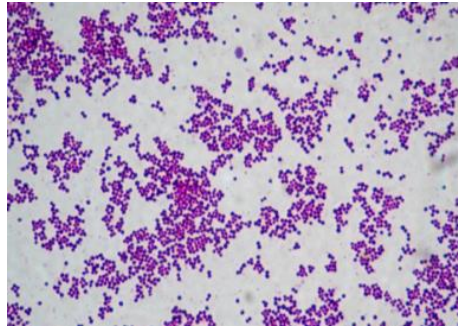
Bioassay adalah metode yang memanfaatkan bahan hidup untuk mendeteksi zat dan/atau menentukan potensi toksisitas bahan kimia atau matriks yang terkontaminasi. *Bioassays* penting dalam toksikologi, yang merupakan 'studi tentang zat beracun dan pengaruhnya terhadap organisme dan lingkungan', dan digunakan dalam menilai toksisitas akut dan kronis (Christofi, 2005).

Bioassay dapat dibagi menjadi empat kategori besar berdasarkan jenis fungsi yang diukur dalam sel target yang diinkubasi dengan adanya sitokin: (1) uji yang mengukur proliferasi atau penghambatan pertumbuhan; (2) uji sitotoksitas; (3) uji tergantung pada induksi fungsi sel tertentu, seperti kemotaksis; dan (4) menguji memperkirakan jumlah protein yang diinduksi dalam sel target. *Bioassay* lebih sensitif daripada *immunoassay*, tetapi terutama karena relevan secara biologis (Whiteside, 2003).

2.9.1. Bakteri Patogen

Bakteri patogen merupakan bakteri yang dapat menyebabkan penyakit bagi inangnya dengan adanya perubahan jaringan melalui perubahan genetik. Salah satu ciri dari bakteri patogen yaitu bersifat saprofit (Ihsan, 2021).

2.9.2. Bakteri *S.aureus*



Gambar 3. Koloni *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus memiliki klasifikasi sebagai berikut. (Todar, 2005):

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: <i>Mirococcaceae</i>
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) adalah bakteri Gram-positif berbentuk bulat, biasanya tersusun dalam bentuk rangkaian tak beraturan seperti anggur. *S. aureus* bersifat patogen oportunistik, berkoloni pada kulit & permukaan mukosa manusia dan mudah tumbuh pada kebanyakan medium bakteriologis dalam keadaan aerob maupun anaerob fakultatif. *S. aureus* banyak ditemukan di sekitar lingkungan hidup manusia dan merupakan penyebab terjadinya infeksi tersering di dunia yang bersifat piogenik. Hal ini disebabkan oleh kemampuan *S. aureus* yang mudah beradaptasi dengan lingkungan melalui ketahanan yang dimilikinya terhadap antimikrobia. Prototipe lesi dari *S. aureus* adalah furunkel atau abses lokal lainnya yang dapat menyebabkan nekrosis jaringan (faktor dermatonekrotik), menghasilkan enzim koagulase yang mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi dan di dalam saluran getah bening, mengakibatkan

pembentukan dinding yang membatasi proses dan diperkuat oleh penumpukan sel radang (Maromon *et al.*, 2020).

2.9.3. Bakteri *P. aeruginosa*



Gambar 4. *Pseudomonas aeruginosa*

Menurut Siegrist (2010) klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gamma Proteobacteria
 Ordo : Pseudomonadales
 Family : *Pseudomonadaceae*
 Genus : *Pseudomonas*
 Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif yang memiliki ukuran 0.5-0.8 mikron kali 1.5-3.0 mikron (Soedarto, 2015). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* bersifat obligat pada berbagai jenis media, memiliki bau manis seperti anggur atau seperti jagung. Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berbentuk batang, halus dan flouresen berwarna kehijauan sering memproduksi pigmen berwarna kebiruan dan tidak flouresen atau disebut dengan piosianin (*pyocyanin*). Piosianin larut dalam media agar. Suhu optimal untuk pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* adalah 42⁰C. Suhu tersebut dapat membantu untuk membedakan spesies *Pseudomonas* yang lain pada kelompok flouresen yang

bersifat oksidase positif. Bakteri ini memiliki beberapa galur menghasilkan pigmen fluoresen pioverdin yang menghasilkan warna kehijauan pada media agar. Beberapa galur menghasilkan pigmen merah gelap piorubin atau pigmen hitam piomelanin (Brooks *et al.*, 2005).

2.9.4. Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa organik yang dapat merusak dan menghambat bakteri tertentu baik secara alami maupun sintetik. Zat antibakteri adalah bahan yang digunakan untuk menghambat bakteri yang merugikan bagi manusia (Brooks *et al.*, 2005).

2.9.5. Metode Pengujian Antibakteri

Penentuan kerentanan patogen bakteri terhadap agen antibakteri dapat dilakukan dengan salah satu metode utama yaitu difusi dan bioautografi.

1. Metode Difusi Agar

Metode difusi agar dilakukan dengan menggunakan media agar yang diinokulasikan inokulum mikroorganisme uji. Kemudian kertas cakram (diameter 6 mm) yang mengandung senyawa uji dengan konsentrasi yang diinginkan diletakkan pada permukaan media agar. Cawan petri tersebut diinkubasi pada kondisi yang sesuai dan agen antimikroba akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang dapat dilihat dari zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram

Keuntungan metode disk difusi agar dibandingkan dengan metode lain adalah mudah, murah, tidak memerlukan peralatan khusus, dapat menguji banyak mikroorganisme dan agen antimikroba, serta sangat mudah dalam menginterpretasikan hasil yang diperoleh. Namun kekurangannya yaitu metode ini tidak cocok digunakan dalam penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), dan tidak dapat membedakan efek bakterisidal dan efek bakteristatik (Balouiri, 2015 ; Jorgensen dan Turnidge, 2016).

2. Metode kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi

Bioautografi adalah metode sederhana yang bersifat spesifik dan digunakan untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antiviral, sehingga mendekatkan metode separasi dengan uji biologis (Pratiwi, 2008). Metode ini merupakan alternatif untuk deteksi zat aktif, mencari antibakteri atau anti kapang baru, kontrol kualitas antimikroba, dan mendeteksi golongan senyawa (Kusumaningtyas, 2008). Ada 3 macam metode bioautografi, yaitu:

a. Bioautografi langsung

Uji bioautografi langsung dilakukan dengan menyemprot lempeng KLT dengan suspensi mikroorganisme atau dengan diletakkan lempeng KLT pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme bioautografi langsung lebih sensitif dan memiliki kemampuan untuk mendeteksi antibakteri pada konsentrasi rendah sekalipun (Pratiwi, 2008).

b. Bioautografi *overlay*

Uji bioautografi *overlay* dilakukan dengan menuangkan media agar yang telah dicampur dengan mikroorganisme di atas permukaan lempeng KLT, media ditunggu hingga padat, kemudian diinkubasi. Area hambatan dilihat melalui penyemprotan dengan tetrazolium klorida. Senyawa aktif antimikroba akan terlihat sebagai area jernih dengan latar belakang ungu (Pratiwi, 2008).

c. Bioautografi kontak

Uji bioautografi kontak dilakukan dengan cara meletakkan lempeng kromatogram hasil elusi senyawa yang akan diuji di atas media padat yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji. Daerah jernih yang tidak ditumbuhi mikroba menandakan adanya senyawa antimikroba (Kusumaningtyas, 2008).

2.9.6. Mekanisme antibakteri

Menurut Radji (2011) berdasarkan mekanisme kerjanya dalam menghambat bakteri, antibakteri digolongkan sebagai berikut :

- 1) Antibakteri yang dapat menghambat sintesis dinding sel
Dinding sel pada bakteri merupakan bagian yang berfungsi untuk mempertahankan struktur sel bakteri. Zat antimikroba yang masuk ke dalam bakteri umumnya akan melisiskan dan merusak dinding sel bakteri terlebih dahulu. Setelah bentuk dan struktur selnya mengalami kerusakan, maka zat antimikroba akan membunuh sel bakteri tersebut.
- 2) Antibakteri yang dapat merusak membran sel
Membran sel pada bakteri berfungsi untuk mengangkut nutrisi dan metabolit agar dapat keluar masuk sel. Selain itu, membran sel juga berfungsi sebagai tempat berlangsungnya respirasi dan terjadinya aktivitas biosintesis dalam sel. Beberapa jenis antibakteri dapat melisiskan dan merusak membran sel, sehingga menghambat pertumbuhan bakteri.
- 3) Antibakteri yang dapat mengganggu biosintesis asam nukleat
Antibakteri dapat menghambat proses yang dikatalisis oleh enzim menjadi produk yang lebih kompleks dalam suatu organisme hidup.
- 4) Antibakteri yang dapat menghambat sintesis protein beberapa jenis antibakteri dapat menghambat sintesis protein. Proses sintesis protein terdiri dari 2 macam, yaitu transkripsi (DNA ditranskripsi menjadi mRNA) dan translasi (mRNA ditranslasi menjadi protein).

Aktivitas antibakteri dapat dipelajari menggunakan beberapa metode, yaitu metode dilusi, metode difusi agar, dan metode difusi dilusi. Metode difusi adalah metode yang sering digunakan untuk analisis aktivitas antibakteri. Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Balouiri *et al.*, 2016).

2.10. Karakterisasi Senyawa dengan LC-MS/MS

Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Kromatografi cair memisahkan komponen-komponen sampel dan kemudian ion bermuatan dideteksi oleh spektrometer massa. Data LC-MS/MS dapat digunakan untuk memberikan informasi tentang berat molekul, struktur, identitas dan kuantitas komponen sampel tertentu, senyawa dipisahkan atas dasar interaksi relatif dengan lapisan kimia partikel-partikel (fase diam) dan elusi pelarut melalui kolom (fase gerak) (Mangurana *et al.*, 2019). Keuntungan dari LC-MS/MS yaitu dapat menganalisis lebih luas berbagai komponen, seperti senyawa termal labil, polaritas tinggi atau bermassa molekul tinggi, bahkan juga protein. (Mangurana *et al.*, 2019).

Ginting (2012) dalam Susanto (2019) menjelaskan teknik LC-MS/MS mempunyai kelebihan diantaranya adalah sebagai berikut :

- a. Penggunaan detektor spektrometer masa dapat memperoleh hasil analisis yang spesifik
- b. LC-MS tidak hanya bisa digunakan pada molekul volatil (< 500 Da), namun dapat digunakan pada molekul yang sangat polar dengan persiapan sampel cukup sederhana tanpa teknik derivatisasi.
- c. Metode pengujian bisa dikembangkan secara fleksibel dengan waktu yang singkat.
- d. Dapat menghasilkan data kuantitatif maupun kualitatif melalui seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.

2.11. *Fourier Transform Infra Red Spectrophotometer* (FT-IR)

FTIR adalah spektroskopi menggunakan infra merah (IR). Spektrometer IR memungkinkan identifikasi substansi gugus kompleks suatu senyawa. Cara kerja spektroskopi inframerah adalah sampel yang dipindai menggunakan sinar

inframerah, dilalukan menembus sampel dan ditangkap oleh detektor. Hasil pemindaian yang diolah dengan komputer, mampu menyajikan spektrum sampel (Wibisono, 2017).

Radiasi IR tidak memiliki cukup energi untuk menyebabkan transisi elektronik. Bila radiasi IR dilewatkan melalui suatu cuplikan, maka molekul akan menyerap energi sehingga terjadi vibrasi. Panjang gelombang serapan oleh suatu ikatan bergantung pada jenis getaran ikatan antar atom. Oleh karena itu, tipe ikatan yang berlainan akan menyerap radiasi IR pada panjang gelombang yang berbeda (Fessenden & Fessenden, 1986). Vibrasi yang terjadi meliputi vibrasi ulur dan tekuk dan dikenal beberapa istilah, yaitu rocking, twisting, scissoring, dan waging (Hollas, 2004).

Daerah radiasi spektroskopi IR berkisar pada bilangan gelombang 12800-10 cm^{-1} . Daerah 1400-4000 cm^{-1} merupakan daerah yang khusus untuk identifikasi gugus-gugus fungsional, sedangkan daerah 1500-800 cm^{-1} merupakan daerah sidik jari (*fingerprint region*) (Murad *et al.*, 2006). Pada daerah sidik jari, sedikit saja perbedaan struktur dan susunan molekul akan menyebabkan perubahan distribusi puncak serapan.

Tabel 1. Bilangan gelombang FTIR

Gugus Fungsi	Jenis Vibrasi	Frekuensi (cm^{-1})	Intensitas
C – H	(C sp^3) alkana (rentang)	3000-2850	Tajam
	-CH ₃ (bengkok)	1450-1375	Sedang
	-CH ₂ - (bengkok)	1465-1450	Sedang
	(C sp^2) alkena (rentang)	3100-3050	Sedang
	(keluar bidang)	1000-650	Tajam
	Aromatik (rentang)	3150-3050	Lemah
	(keluar bidang)	900-690	Sedang
	(C sp) alkuna (rentang)	3300	Sedang
C – H	Aldehida	2900-2800	Lemah

		2800-2700	Lemah
	Amida	1350-1000	Sedang-Lemah
C=C	Alkena	1680-1600	Sedang-Lemah
	Aromatik	1600-1475	Sedang-Lemah
C≡C	Alkuna	2250-2100	Sedang-Lemah
C=O	Aldehida	1740-1720	Tajam
	Keton	1725-1705	Tajam
	Asam karboksilat	1725-1700	Tajam
	Ester	1750-1730	Tajam
	Amida	1670-1640	Tajam
	Anhidrida	1810-1760	Tajam
	Klorida asam	1800	Tajam
C – O	Alkohol, ester, eter, asam karboksilat, anhidrida	1300-1000	Tajam
O – H	Alkohol, fenol, -bebas Ikatan-H	3650-3600 3500-3200	Sedang Sedang
	Asam karboksilat	3400-2400	Sedang
N – H	Amida primer dan sekunder (rentang) Bengkok	3500-3100 1640-1550	Sedang Sedang – Tajam
C – N	Amina, amida	1360-1180	Sedang – Tajam
C=N	Imina dan oksin	1690-1640	Lemah – Tajam
C≡N	Nitril	2260-2240	Tajam
X=C=Y	Allena, ketene, isosianat, isotiosianat	2270-1450	Lemah – Tajam
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 dan 1350	Tajam
S – H	Merkaptan	22	Lemah
S=O	Sulfon, sulfonil-klorida	1375 – 1300	Tajam
	Sulfat dan sulfanamiad	1200 – 1140	Tajam

Sumber : Sastrohamidjojo, 2013

Menurut Wonorahardjo (2020) terdapat beberapa kelebihan dari FT-IR dibandingkan IR dispersif yang menyebabkan instrumentasinya lebih sering dipilih dewasa ini.

- a. Resolusi dari frekuensi-frekuensi dalam spektrum lebih bagus sehingga puncak-puncak tampak lebih baik dan halus. Hal ini sangat menguntungkan dalam elusidasi struktur senyawa organik.
- b. Tidak diperlukan kalibrasi berkali-kali karena frekuensi yang dihasilkan cukup baik jika diulang (cukup reproduksibel).
- c. Pengoperasian instrumen lebih mudah dan cepat.
- d. Menggunakan komputer cepat dan juga mempunyai "*library*" spektrum yang berisi kumpulan spektrum yang pernah dibuat selama ini.
- e. Mudah diadaptasi untuk penggunaan jika dilakukan penggabungan dengan alat lain, lebih mudah mengarahkan berkas cahaya ke tempat sam pel eksternal, misalnya dalam gabungan GC-FT-IR.

III. METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari – Juli 2023 di Unit Pelaksana Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi (UPT-LTSIT) Universitas Lampung.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu, gelas piala, erlenmeyer, tabung reaksi, pipet tetes, *coverslip*, gelas ukur, kaca preparat, botol *chamber*, cawan petri, blender, botol semprot, kapas, kasa, plastik *wrap*, plastik tahan panas, tisu, pinset, jarum ose, labu evap, bunsen, korek api, *spin bar*, keranjang, *magnetic stirrer*, batang pengaduk, spatula, mikropipet 100 μL dan 1000 μL , tip mikropipet, wadah tip, spidol, lidi, autoklaf Tomy SX-700, *rotary evaporator* Buchii/R210, lampu UV λ 254 nm, lampu UV Kohler/SN402006, sentrifugator, neraca analitik Wigen Houser, laminar air flow ESCO/AVC4A1, inkubator Memmert- Germany/INC-02, *hospitex diagnostics*, mikroskop Axio Zeiss A1, dan drying oven Jisico.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini, yaitu limbah kulit udang, koloid kitin, agar-agar *plain*, sampel fungi endofit mangrove, larutan NaOH 3,5%, larutan HCl 1,25 N, air laut buatan, akuades, metanol, metanol *pro analysis*, etil asetat, n-heksana, DCM, silika C18, alkohol 70%, *Tryptic Soy Broth* (TSB), *mueler hinton* (MH), resazurin 0,02%, pereaksi serum (IV) sulfat, *ciprofloxacin*, pereaksi

Dragendorff, Reagen Ninhidrin.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1. Peremajaan Isolat Fungi Endofit *Mangrove*

Peremajaan isolat fungi endofit mangrove yang dilakukan merujuk dari Rahim *et al.* (2019) dengan beberapa modifikasi. Sediaan Isolat fungi endofit mangrove yang berasal dari endofit mangrove Sriminosari, Lampung Timur diremajakan pada media koloid agar kitin. Media agar kitin terbuat dari beberapa komposisi, yaitu agar, koloid kitin, dan air laut buatan dengan perbandingan agar 2% dan koloid kitin 2% dari volume totalnya. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media agar kitin dipindahkan ke dalam cawan petri di dalam ruang *Laminar Air Flow* (LAF), digoreskan sediaan fungi endofit mangrove, dan diinkubasi selama 14 hari pada suhu ruang. Isolat yang tumbuh diidentifikasi secara makroskopis dan dipisahkan hingga membentuk isolat tunggal (Setiawan *et al.*, 2022).

Isolat tunggal yang telah didapatkan, selanjutnya diidentifikasi secara mikroskopis menggunakan metode *cover slide culture* merujuk dari Setiawan *et al.* (2021) dengan beberapa modifikasi. *Coverslip* ukuran 22x22 mm dimasukkan ditengah media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang terbuat dari 20 g kentang, 2 g agar *plain*, 2 g d-glucose, dan 100 ml air laut steril pada sudut 45°, kemudian isolat tunggal fungi endofit mangrove digoreskan berdekatan dengan *coverslip* dan diinkubasi selama 4 hingga 7 hari pada suhu ruang. *Coverslip* diambil secara perlahan menggunakan pinset steril dan diletakkan pada kaca preparat yang bersih, kemudian diamati menggunakan mikroskop Axio Zeiss A1 dengan perbesaran 400x.

3.3.2. Kultivasi dan Skrining Antibakteri

Isolat fungi endofit yang telah dilakukan pengamatan secara makro dan mikro, selanjutnya dilakukan kultivasi. Merujuk pada Ginting *et al.* (2020) dengan beberapa modifikasi. Media *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang terbuat dari 20 g kentang, 2 g d-glucose, dan 100 ml air laut steril, selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Media PDB diberi isolat fungi menggunakan jarum ose bulat di dalam ruangan LAF, kemudian diinkubasi selama 7 hari pada suhu ruang. Setelah itu, dikultivasi dengan pendekatan OSMAC menggunakan 3 media, berupa kulit udang (50 g), beras (beras 50 g dan air laut steril 50 ml), dan kentang (kentang 50 g yang telah direndam air laut steril) yang selanjutnya disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian diinkubasi selama 14 hari, selanjutnya dilakukan ekstraksi. Menurut Puspitasari *et al.* (2017) ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat (EtOAc). Media kultivasi yang telah diinkubasi selama 14 hari ditambahkan pelarut etil asetat (1:1) dan disimpan pada suhu ruang selama 1x24 jam sembari sesekali diaduk. Kemudian saring dengan kertas saring sehingga diperoleh ekstrak etil asetat dan residu. Ekstrak etil asetat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kasar. Ekstrak kasar diuji KLT dengan cara melarutkan ekstrak kasar dengan pelarut etil asetat kemudian ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 4x1 cm menggunakan pipa kapiler. Kemudian dielusi dengan menggunakan eluen n-heksan 7:3 etil asetat. Setelah itu, Pelat KLT diamati nodanya dibawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm, selanjutnya diberikan reagen serium(IV)sulfat untuk mengidentifikasi adanya senyawa organik, dan reagen *dragendorff* untuk mengidentifikasi senyawa alkaloid..

Ekstrak kasar diuji aktivitas antibakteri dengan perlakuan awal, yaitu bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* diremajakan selama 24 jam menggunakan media *Tryptic Soy Agar* (TSA) yang terbuat dari *Tryptic Soy Broth* (TSB) 3%, 2 g agar *plain*, dan 100 ml akuades steril yang sudah disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit. Selanjutnya, bakteri uji yang sudah

tumbuh diinokulasi menggunakan media TSB 3% dan diinkubasi selama 2 jam. Inokulum yang telah ditumbuhkan bakteri disuspensikan ke dalam vial 8 ml dan distandarisasi Mc. Fraland 0,5. Ekstrak kasar sample dibuat konsentrasi stok 5 mg/mL atau 5.000 ppm, kontrol negatif dibuat dari dengan cara : 12.5 mL MeOH dilarutkan dalam 87.5 mL aquades steril, kontrol positif dibuat dari sediaan tablet *Ciprofloxacin* 500 mg sebanyak 2 mg/mL. Media TSA ditetaskan suspensi bakteri sebanyak 50 µL dan diratarakan menggunakan *cotton bud*, kemudian dipasang ring silinder dan dimasukkan sampel yang akan diuji sebanyak 50 µL. Selanjutnya, media TSA yang sudah diberi sampel diinkubasi selama 24 jam dan diamati zona bening yang terbentuk. Sampel yang memiliki zona bening tertinggi, kemudian dapat dilanjutkan dengan uji bioautografi kontak.

3.3.3. Uji Bioautografi Kontak

Uji bioautografi dilakukan untuk mendeteksi senyawa aktif yang mempunyai aktifitas sebagai antibakteri. Media pertumbuhan bakteri dibuat menggunakan 3,9 g *Mueler Hinton Agar* (MHA) dalam 100 ml aquades steril, kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Media MHA dituangkan pada cawan petri sebanyak 25ml, kemudian didiamkan sampai set dan digoreskan bakteri yang telah diremajakan sebelumnya. Ekstrak kasar dari sampel yang paling aktif ditotolkan pada pelat KLT dan dielusikan menggunakan eluen n-hexan 7:3 etil asetat. Pelat KLT ditempatkan di atas permukaan MHA selama 30 menit, kemudian pelat KLT pada media MHA tersebut dipindahkan dari permukaan medium dan diinkubasi selama 24 jam. Senyawa antimikroba yang telah berdifusi dari pelat KLT ke dalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi pada waktu dan suhu yang tepat sampai noda yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji tampak pada permukaan membentuk zona yang jernih (Dewanjee *et al.*, 2014). Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri, kemudian dipisahkan menggunakan kromatografi kolom. Fraksi yang dihasilkan diuji menggunakan bioautografi *overlay*.

3.3.4. Fraksinasi Menggunakan Kromatografi Kolom dan Bioautografi *Overlay*

Merujuk pada Supardan (2022) ekstrak kasar isolat unggul dilarutkan dalam metanol untuk mengambil senyawa alkaloid yang bersifat polar, kemudian disiapkan kolom kromatografi. Fase diam yang digunakan adalah *oktadesil silika* (C18) untuk mengisolasi senyawa-senyawa yang polar. Selanjutnya, silika C18 dielusi menggunakan pelarut metanol 100% dan ditetaskan ekstrak kasar. Hasil fraksinasi ditampung menggunakan vial yang diberi kode, kemudian setiap fraksi di KLT menggunakan eluen DCM 9:1 metanol dan diberi pereaksi *Dragendorff* untuk mengetahui fraksi-fraksi yang terdapat senyawa alkaloid. Fraksi yang terdapat senyawa alkaloid digabungkan, kemudian diuji bioautografi *overlay* untuk mengetahui aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.

Bioautografi *overlay* diawali dengan menotolkan filtrat pada pelat KLT yang dielusi menggunakan eluen DCM 9:1 metanol, kemudian diletakkan pada cawan petri. Selanjutnya, cawan petri yang berisi pelat KLT dituangkan media MHA 25ml yang sudah diberi suspensi bakteri, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Selanjutnya, media MHA yang telah diinkubasi selama 24 jam, kemudian diberi pewarna resazurin untuk mengetahui senyawa pada *spot* bagian KLT yang memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri, kemudian dikarakterisasi senyawanya menggunakan LC-MS/MS dan FTIR.

3.3.5. Karakterisasi Senyawa

Sampel isolat unggul yang sudah difraksinasi, selanjutnya dikarakterisasi menggunakan instrumen *Liquid Chromatography Mass Spectrometer* (LC-MS/MS) UPLC/Xevo G2-S Qtof di Badan Reserse Kriminal Polri Pusat Laboratorium Forensik Bogor dan *Fourier Transform Infra Red Spectrometer* (FT-IR) Prestige 21 Shimadzu di Laboratorium Kimia Analitik Institut Teknologi Bandung.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Adapun kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Hasil peremajaan isolat fungi yang berasal dari endofit mangrove Srimonosari, Lampung Timur didapatkan 6 isolat yang terindikasi secara mikroskopis termasuk ke dalam genus *Aspergillus* dan *Acremonium*.
2. Hasil skrining antibakteri menggunakan metode difusi agar *ring* menunjukkan ekstrak kasar isolat 21BC3-LRB memiliki aktivitas antibakteri tertinggi pada bakteri *Staphylococcus aureus*, sedangkan isolat 21BC2-LRKU memiliki aktivitas antibakteri paling besar terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Hasil karakterisasi LC-MS/MS sampel 21BC2-LRKU1 menunjukkan bahwa pada waktu retensi 5.19 menit dengan *base peak* 211.1443 m/z memiliki perkiraan formula molekul $C_{11}H_{19}N_2O_2$ yang terindikasi senyawa golongan alkaloid dengan kerangka dasar pirolidin.
4. Hasil karakterisasi FT-IR memiliki korelasi yang cukup sesuai dengan gugus fungsi pada struktur senyawa yang didapatkan dari LC-MS/MS, yaitu adanya gugus C – N ($1238,30\text{ cm}^{-1}$), gugus C – H alifatik ($1384,89\text{ cm}^{-1}$ dan $1448,54\text{ cm}^{-1}$), gugus C=O ($1662,64\text{ cm}^{-1}$), dan gugus N – H ($3689,83\text{ cm}^{-1}$)

5.2. Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat dilanjutkan ke tahap pemurnian senyawa alkaloid, karakterisasi sampel 21BC2-LRKU1 menggunakan instrumen NMR, serta analisis filogenetik pada isolat 21BC2-LR.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, Mudatsir, dan Susanti, S.S. 2021. "Motivasi Dan Supervisi Berhubungan Dengan Kinerja Infection Prevention And Control Link Nurse (Ipcn) Dalam Menerapkan Pencegahan Dan Pengendalian Infeksi." *Jurnal Keperawatan Silampari* 5(1): 2581-1975.
- Alvarez, F.J., Barrajon-Catalan, E., and Micol, V. 2020. "Tackling Antibiotic Resistance with Compounds of Natural Origin: A Comprehensive Review ." *Biomedicines* 8(405).
- Alyidrus, R., Wahyuni, Nurhikma, dan Nurrahmi K. 2022. "Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Batang Laruna (*Chromolaena Odorata* L.) Terhadap *Staphylococcus Aureus* Dan *Pseudomonas Aeruginosa*." *INHEALTH* Vol. 1, hal. 62~70.
- Arancibia, M. Y., Alemán, A., Calvo, M. M., López-Caballero, M. E., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. 2014. "Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials." *Food Hydrocolloids* 35:710-717.
- Atmojo, A. T. 2016. *Media Muller Hinton Agar*. *Indonesia Medical Laboratory*. <https://medlab.id/media-mueller-hinton-agar>.
- Astuti, P., Pratoko, D. K., Rollando, R., Nugroho, G. W., Wahyuono, S., Hertiani, T., & Nurrochmad, A. (2021). Bioactivities of A Major Compound from *Arthrinium rasikravindrae* An Endophytic Fungus of *Coleus amboinicus* Lour . *Journal Pharm Science*, 46(1), 23–30.
- Ayer, P.I.L., Sabdono, A., Trianto, A., 2018. Aktivitas Jamur Symbion Spons Terhadap Jamur Trichophytons sp. Di Pulau Biak, Kabupaten Biak-Numfor, Papua. *J. Acroporn Ilmu Kelaut dan Perikan Papua* 1, 50–57.
- Balouiri, M., Bouhdid, S. 2015. Antifungal Activity Of *Bacillus* Spp. Isolated From *Calotropis Procera* Ait. Rhizosphere Against *Candida Albicans*. *Asian J Pharm Clin Res* 8(2): 213-217.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S.K. 2016. "Methods for In Vitro Evaluating Antimicrobial activity." *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2): 71-79.

- Bastiaens, L., Soetemans, L., D'Hondt, E., & Elst, K. 2019. *Sources of chitin and chitosan and their isolation*. WILEY online library.
- Binuni R., Wilmar, M., Hariyadi, Yappy, S. 2020. "Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mangrove *Sonneratia alba* Dari Kecamatan Tagulandang, Sulawesi Utara Menggunakan Metode DPPH." *Biofarmasetikal Tropis* e-ISSN 2685-3167, 3(1), 79-85.
- Brooks, G.F., Janet, S.B., Stephen A.M. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Christofi, N. 2005. *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier.
- Coyle, M. B. 2005. *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA: American Society for Microbiology.
- Dhayanithi, N.B., Kumar, T.T.A., Murthy, R.G., Kathiresan, K. 2012. "Isolation of antibacterials from the mangrove, *Avicennia marina* and their activity against multi drug resistant *Staphylococcus aureus*." *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2(3): S1892-S1895.
- Ditjen PDASRH. 2021. *Peta Mangrove Nasional*. Retrieved From https://www.researchgate.net/profile/Prayoto-Tonoto/publication/358439377_MANGROVE_MAP_OF_INDONESIA/links/62029756baa59752_dfe689aa/MANGROVE-MAP-OF-INDONESIA.pdf
- Duryat, Rodiani, Maryono, Dani H. A. Prasetyo P. 2022. "Keanekaragaman Jenis Mangrove di Pesisir Lampung." *Lampung University Report* 1-7.
- El-Gendy, B.E.M., Mostafa, S.R. 2015. Antibacterial activity of diketopiperazines isolated from a marine fungus using t-butoxycarbonyl group as a simple tool for purification. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Hal. 1-4.
- Eltivitasari, A., Subagus, W., Puji, A. 2021. Endofit *Arthrimum* sp., Sumber Potensial Senyawa Obat : *Review*. *J Sains Farma Klin*. 8(3): 228-241
- Fitri, A., Yum, E., dan Yuana, N. 2019. "Uji Antimikroba Media Fermentasi Batch *Penicillium* sp. LBKURCC34." *Journal of UNRI* 1-6.
- Gandjar, I. G. dan A. Rohman. 2007. *Kimia Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Gandjar, L. 2012. *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Belajar.
- Ginting, L., Wijanarka, W., dan Kusdiyantini`. 2020. "Isolasi Bakteri Endofit Tanaman Pepaya (*Carica Papaya* L.) dan Uji Aktivitas Enzim Amilase." *Berkala Bioteknologi* 3(2): 1-7.
- Ginting, M.K. 2012. *Validasi Metode LC-MS/MS untuk Penentuan Senyawa Asam Trans, Trans-Mukonat, Asam Hippurat, Asam 2-Metil Hippurat, Asam 3-*

Metil Hippurat, Asam 4-Metil Hippurat dalam Urin sebagai Biomarker Paparan Benzena, Toluena, dan Xilena. Jakarta: UI Press.

- Guo, P., Xue, H.Y., Buttaaro, B.A., Tran, N.T., Wong, H.L. 2020. "Enhanced eradication of intracellular and biofilm-residing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) reservoirs with hybrid nanoparticles delivering rifampicin." *International Journal of Pharmaceutics* 589: 119784.
- Haque, M., Sartelli, M., McKimm, J., Bakar, M. 2018. "Health care-associated infections – an overview." *National Library of Medicine* 15(11): 2321-2333.
- Hasiani, V.V., Ahmad, I., dan Rijai, L. 2015. "Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.)." *Jurnal Sains dan Kesehatan* Vol. 1 No. 4.
- Herison, A., Darmawan, A., Romdania, Y., & Puspaningrum, C. (2021). Analysis of Suitability of the Mangrove Ecotourism Area Pandan Alas Sriminosari Village Labuhan Maringgai East Lampung. *Advances in Engineering Research, 202(Icsb 2019)*, 64–68.
- Ihsan, B. 2021. "Identifikasi Bakteri Patogen (*Vibrio spp.* dan *Salmonella spp.*) Yang Mengontaminasi Ikan Layang Dan Bandeng Di Pasar Tradisional." *JPHPI* Vol 24(1) 89-96.
- [ITTO] International Tropical Timber Organization. 2012. *ITTO Tropical Forest Update : A Newsletter from The International Tropical Timber Organization to Promote The Conservation and Sustainable Development of Tropical Forest.* Yokohama, Jepang. 24p.
- Indriani, C., Fadhila F.R., Kodariah L. 2020. Identification Of *Aspergillus Sp* Growth On White Bread Against Storage Temperatur. *Jurnal Kesehatan Rajawali.* Vol 10, No. 2 Hal. 92-103.
- Jorgensen, J.H. and Turnidge, J.D. 2016. *Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods.* New York : Manual of Clinical Microbiology.
- Kemung, H.M., Tan, L.T., Chana, K., Ser, Law, Lee, dan Goh. 2020. "Streptomyces sp. Strain MUSC 125 from Mangrove Soil in Malaysia with Anti-MRSA, Anti-Biofilm and Antioxidant Activities." *MDPI Journals* 25(15) 3545.
- Kusna, N.A. dan Siska, R. 2023. Identifikasi Rhodamin B Pada Blush On di Toko Kosmetik Daerah Podosugih Pekalongan Barat Menggunakan Metode KLT dan Benang Wol. *Jurnal Ilmiah Multidisiplin.* Vo.2(6) hal. 2282-2289.
- Kusumaningtyas, E., Astuti, E., & Darmono. 2008. "Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar Overlay dalam Penentuan Senyawa Antikapang." *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia.* 6 (2), 75-79.
- Khan MS, Gao J, Munir I, Zhang M, Liu Y, Xue J, Zhang X. 2021. "Characterization of endophytic fungi, *Acremonium sp.*, from Lilium

dauidii and analysis of its antifungal and plant growth-promoting effects." *Biomed Res* Page 1-14.

- Li, W., Ding, L., Wang, N., Xu, J., Zhang, W., Zhang, B., He., Wu., Jin. 2019. "Isolation and Characterization of Two New Metabolites from the Sponge-Derived Fungus *Aspergillus* sp. LS34 by OSMAC Approach." *Marine Drugs* 17(5) 283.
- Maftukhah, S. 2019. "Cellulase Enzyme Production Using Solid State Fermentation Method From Waste – A Review." *Jurnal Keilmuan dan Aplikasi Teknik* 6(2): 22-27.
- Mangurana, W.O.I., Yusniani, Sahidin. 2019. "Analisis Lc-Ms/Ms (Liquid Chromatograph Mass Spectrometry) Dan Metabolit Sekunder Serta Potensi Antibakteri Ekstrak N-Heksana Spons *Callyspongia Aerizusa* Yang Diambil Pada Kondisi Tutupan Terumbu Karang Yang Berbeda Di Perairan Teluk Staring." *Jurnal Biologi Tropis* 19(2).
- Maromon, Y., Pakan, P.D., dan agnes, M. 2020. "Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Kelapa Murni (Virgin Coconut Oil) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro." *Cendana Medical Journal* Vol. 20 (2) hal. 250-255.
- Marraskuranto, E., Muhammad, N., Swestri, U., Iriani, S., dan Kustiariyah, T. 2021. Kandungan Fitokimia, Potensi Antibakteri, Dan Antioksidan Hasil Ekstraksi *Caulerpa Racemosa* Dengan Pelarut Berbeda. *JPB Kelautan dan Perikanan*. Vol. 16 No. 1. Hal. 1-10.
- Mukhlis, D. K. dan Hendri, M. 2018. "Isolasi dan Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit pada Mangrove *Rhizophora apiculata* Dari Kawasan Mangrove Tanjung Api-Api Kabupaten Banyuasin Sumatera Selatan." *Maspari Journal* 10(2): 151–160.
- Nainggolan, K.N. 2023. "Ekstraksi Enzimatik Kitin dan Kitosandari Limbah Udang." *Manfish Journal* Vol.3, No.1, Hal.50-71.
- Nawea, Y., Mangindaan, R. E. P., dan Bara, R. A. 2017. "Uji Antibakteri Jamur Endofit dari Tumbuhan Mangrove *Sonneratia alba* yang Tumbuh di Perairan Pantai Tanawangko." *Jurnal Pesisir dan Laut Tropis* 1(1): 24-35.
- Ningrum, E.F. 2015. *Pembuatan Bioetanol dari mahkota buah nanas varietas queen dengan menggunakan mikroba Saccharomyces*. Palembang: Politeknik Negri Sriwijaya.
- Nugraha, S. E., Achmad, S., & Sitompul, E. 2018. Antibacterial activity of ethanol extract of purple passion fruit peel (*Passiflora edulis* Sims) on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 1(2), 29–34.

- Oktari, V.R. 2022. *Induksi Produksi Metabolit Sekunder Jamur Endofit Aspergillus tamarii NFBI Dengan Penambahan Monosodium Glutamat 3,5% pada Media Beras dan Uji Aktivitas Antibakteri*. Padang: Universitas Andalas.
- Pelczar, JR.M.J., E.C.S. Chan, and N.R. Krieg. 1968. *Microbiology*. United States of America: McGraw-Hill.
- Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Yogyakarta. Erlangga.
- Radji, M. 2011. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Rahim, I., Suherman, Andi. 2019. "The Diversity of Rot Fungi from Cocoa Plantation and Its Ability to Grow on Carbon Source Media." *Planta Tropika* 7(2): 125-129.
- Rochman, A. 2020. *Analisis Farmasi dengan Kromatografi Cair*. Yogyakarta: UGM Press.
- Rozirwan, Muda, H.I., Ulqodry, T.Z. 2020. "Short Communication: Antibacterial potential of Actinomycetes isolated from mangrove sediment in Tanjung Api-Api, South Sumatra, Indonesia." *Biodiversitas Journal of Biological* 21(12) 5723-5728.
- Rozirwan, Mukhlis, D.K., Hendri, M. 2018. "Isolasi Dan Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit Pada Mangrove *Rhizophora apiculata* Dari Kawasan Mangrove Tanjung Api-Api Kabupaten Banyuasin Sumatera Selatan." *Maspuri Journa* .10(2):151-160.
- Saru, A. 2019. *Potensi Ekologis dan Pengelolaan Ekosistem Mangrove di Wilayah Pesisir*. Bogor: IPB Press.
- Sastrohamidjojo, H. 1991. *Kromatografi, Edisi II*. Yogyakarta: Liberty.
- Sastrohamidjojo, H. 2005. *Kimia Organik*. Yogyakarta. UGM Press.
- Setiawan, A., Setiawan, F., Juliasih, N. L. G. R., Widyastuti, W., Laila, A., Setiawan, W. A., Djailani, F. M., Mulyono, M., Hendri, J., & 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., Luh, N., Ratna, G., Nonaka, K., & Arai, M. 2021. "Solid State Fermentation of Shrimp Shell Waste Using *Pseudonocardia carboxydivorans* ." *Fermentation* 7: 1-10.
- Siegrist, J. 2010. "Pseudomonas a Communicative Bacteria." *Microbiology Focus* 2(4).
- Snyder, S.H., Joseph, P.S., Maureen, A.C., Heather, L.V., Gregory, S.H., Ted, M.L, Lynda, H. 1997. "Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive

analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A." *Nature Medicine* 3, 421-428.

- Soedarto. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: CV. Sagung Seto.
- Suhardi, J.A., Sesilia R.P., Sisilia, T.R., Ratnah, Djuniasti, K., dan Alfrida, M.S. 2023. "Isolasi, Identifikasi Dan Aktivitas Antibakteri Dari Fungi Endofit Daun Miana Terhadap Escherichia Coli Dan Vibrio Cholerae." *Media Farmasi* p.issn 0216-2083 Vol.19(1).
- Sukmiwati M, Diharmi A, Mora E, Susanti E. 2018. "Aktivitas antimikroba teripang kasur (*Stichopus vastus* Sluiter) dari Perairan Natuna Kepulauan Riau." *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 21(2): 328-335.
- Suliati, Rahmawati, dan Makarlina. 2017. "Jenis- Jenis Jamur Endofit Tanaman Jeruk Siam (*Citrus nobilis* var. *microcarpa*) di Perkebunan Dungun Prapakan Sambas." *Probiot* Vol. 6 (3) : 173 – 181.
- Supardan, A.D. 2022. "Uji Toksisitas Hasil Fraksinasi Kolom Kromatografi Ekstrak Metanol Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl)." *Jurnal Sains Terapan : Wahana Informasi dan Alih Teknologi Pertanian* Vol. 12(1): 32-42.
- Suriaman, E., Wulandika, P.A. 2017. "Uji Mpn Coliform Dan Identifikasi Fungi Patogen Pada Air Kolam Renang Di Kota Malang." *Jurnal SainHealth* Vol. 1 No. 1: Hal. 15-22.
- Susanto, E. 2019. *Peptida Bioaktif Sebagai Antioksidan Eksplorasi pada Ceker Ayam*. Yogyakarta: Deepublish.
- Susilo, & Suciati, R. (2016). Studies of Morphological and Secondary Metabolites Variaty of Mosses (Bryophyta) in Cibodas, West Java. *International Journal of Advanced Research (IJAR)*, 4(12), 1397–1402.
- Tangapo, A.M., Mambu, S.M., Kolondam, B., Pasaapa,N., Pelealu, J. 2022. "Eksplorasi Fungi Endofit Tumbuhan Mangrove *Avicennia marina* sebagai Penghasil Senyawa Antibakteri." *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan* 13 (2),:25 - 31.
- Todar, K. 2005. "Online Textbook of Bacteriology." *Science Magazine* (Science Magazine) 429-450.
- Tsao LH, Hsin CY, Liu HY, Chuang HC, Chen LY, Lee YJ. 2017. "Risk factors for healthcare-associated infection caused by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*." *International Journal Of Antimicrobial Agents* Vol.5 S139-S140.
- Venn, R.F. (2008). *Principles and Practice of Bioanalysis*. 2nd ed. CRC Press. New York.
- Whiteside, T.L. 2003. *The Cytokines Handbook*. London: EGC.

- Zampolli, J., Giani, A., Canito, A., Sello, G. & Gennaro, P. 2022. "Identification of a novel biosurfactant with antimicrobial activity produced by *Rhodococcus opacus* R7." *Microorganisms* 10(2): 1-16.
- Zhou, Y., Ramsey, S., Provasi, D. 2020. "Predicted Mode of Binding to and Allosteric Modulation of the μ -Opioid Receptor by Kratom's Alkaloids with Reported Antinociception In Vivo." *Biochemistry* 60(18): 1420–1429.
- Ziegler, J. 2008. "Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking." *Annual Review of Plant Biology* 59:735–69.