KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FUNGI YANG BERASOSIASI DENGAN BIOTA LAUT MENGGUNAKAN *LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY* (LC-MS)

(Skripsi)

Oleh

MIFTA RAHMA WIDIYANTI

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS LAMPUNG

BANDAR LAMPUNG

2023

ABSTRAK

KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FUNGI YANG BERASOSIASI DENGAN BIOTA LAUT MENGGUNAKAN *LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY* (LC-MS)

Oleh

MIFTA RAHMA WIDIYANTI

Peningkatan kasus resistensi bakteri pada antibiotik menyebabkan permasalahan yang serius di dunia kesehatan. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder dari fungi yang berasosiasi dengan spons menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscpy* (LC-MS). Pada penelitian ini, 5 isolat fungi diperoleh dari deposit di UPT Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi Teknologi, Universitas Lampung. Isolat tersebut diremajakan dengan TSB dan Malt Ekstrak dan teramati fungi telah homogen berwarna putih. Pengamatan morfologi fungi dilakukan dengan menggunakan perbesaran 400x. Kultivasi fungi menggunakan media beras dengan metode *Solid State Fermentation* (SSF) selama 7 hari dalam keadaan statik. Hasil kultivasi diekstraksi menggunakan EtOAC. Hasil ekstrak masing-masing isolat diuji Kromatografi Lapis Tipis dan teramati 2 isolat fungi (18A06RF dan 18B16RF) mengandung senyawa alkaloid. Berdasarkan hasil uji bioautografi didapatkan ekstrak aktif 18A06RF yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri *P. aeruginosa*. Berdasarkan hasil analisis menggunakan LCMS teramati fraksi 18A06RF memiliki puncak dominan pada waktu retensi 16.52 dengan rumus formula molekul $C_{48}H_{88}N_{13}O_{11}$.

Kata Kunci: Fungi, Antibakteri, Metabolit Skunder, Uji Bioautografi, Alkaloid, *Solid State Fermentation* (SSF)

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SECONDARY METABOLITE COMPOUNDS FROM FUNGI ASSOCIATED WITH MARINE BIOTA USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY (LC-MS)

By

MIFTA RAHMA WIDIYANTI

The increase in cases of bacterial resistance to antibiotics cause serious problems in the world of health and humans. The aim of this study was to obtain secondary metabolites from fungi associated with sponges using Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS). In this study, 5 fungal isolates were obtained from deposits at the UPT Integrated Laboratory and Technology Innovation Center, University of Lampung. The isolate was rejuvenated with TSB and Malt Extract and it was observed that the fungus had a white homogeneous color. Fungal morphology observations were carried out using a magnification of 400x. Cultivation of fungi was using rice as a medium with the Solid State Fermentation (SSF) method for 7 days in a static state. Cultivation results were extracted using EtOAC. The extract of each isolate was tested by Thin Layer Chromatography and it was observed that 2 fungi isolates (18A06RF and 18B16RF) contained alkaloid compounds. Based on the results of the bioautographic test, it was found that the active extract 18A06RF had activity as an antibacterial for *P. aeruginosa*. Based on the results of analysis using LCMS it was observed that the 18A06RF fraction had a dominant peak at a retention time of 16.52 with the molecular formula $C_{48}H_{88}N_{13}O_{11}$.

Keywords: Fungi, Antibacterial, Secondary Metabolites, Bioautographic Test, Alkaloids, Solid State Fermentation (SSF)

KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FUNGI YANG BERASOSIASI DENGAN BIOTA LAUT MENGGUNAKAN *LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY* (LC-MS)

Oleh

MIFTA RAHMA WIDIYANTI

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	: **KARAKTERISASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER DARI FUNGI YANG BERASOSIASI DENGAN BIOTA LAUT MENGGUNAKAN *LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROSCOPY* (LC-MS)**
Nama Mahasiswa	: Mifta Rahma Widiyanti
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1657011007
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

MENYETUJUI

1. Komisi Pembimbing

Prof. Andi Setiawan, Ph.D.	**Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.**
NIP 19580922 198811 1 001	NIP 19770713 200912 2 002

2. Ketua Jurusan Kimia

Mulyono, Ph.D.
NIP 19740611 200003 1 002

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

Ketua : **Prof. Andi Setiawan, Ph.D.** .....

Sekretaris : **Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si.** .....

Anggota : **Prof. John Hendri, Ph.D.** .....

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 : **05 Juni 2023**

SURAT PERNYATAAN
KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini

Nama	: Mifta Rahma Widiyanti
Nomor Pokok Mahasiswa	: 1657011007
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi	: Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenar-benarnya dan sesungguhnya, bahwa skripsi saya yang bejudul **"Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut Menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)"** adalah benar karya saya sendiri, baik gagasan, hasil, dan analisisnya. Selanjutnya, saya juga tidak keberatan jika sebagian atau seluruh data di dalam skripsi tersebut digunakan oleh dosen atau program studi untuk kepentingan publikasi, sepanjang nama saya disebutkan dan terdapat kesepakatan sebelum dilakukan publikasi.

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

Bandar Lampung, 10 Juni 2023
Yang Menyatakan,

Mifta Rahma Widiyanti
NPM. 1657011007

RIWAYAT HIDUP

Penulis bernama Mifta Rahma Widiyanti, lahir di Jakarta 21 Desember 1997. Penulis merupakan putri dari pasangan Bapak Janu Widiyanto dan Ibu Chusni Santi. Penulis merupakan anak pertama dari tujuh bersaudara. Penulis mengawali pendidikan formal di TK Islam Nurul Azhar pada tahun 2002 dan melanjutkan di SD Islam Terpadu (SDIT) Citra Az-Zahra yang diselesaikan pada tahun 2010 dan melanjutkan di SMP Trimulia Jakarta yang lulus pada tahun 2013. Selanjutnya, penulis melajutkan pendidikan di Madrasah Aliyah (MA) Annajah Jakarta yang diselesaikan pada tahun 2016. Pada tahun 2016, penulis terdaftar sebagai mahasiswi Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung melalui jalur tertulis Seleksi Mandiri Universitas Lampung (SIMANILA).

Selama menempuh pendidikan di Jurusan Kimia, penulis mengikuti berbagai organisasi baik Himpunan Mahasiswa jurusan Kimia (Himaki) kepengurusan periode 2017-2019 sebagai anggota Bidang Kaderisasi dan Pengembangan Organisasi (KPO) kepengurusan periode 2017-2019 dan Kader Muda Himaki kepengurusan periode 2016. Selama kepengurusan penulis aktif mengikuti kegiatan yang diadakan oleh himpunan. Penulis juga aktif mengikuti organisasi sebagai anggota muda Garuda BEM FMIPA Universitas Lampung kepengurusan periode 2016.

Pada tahun 2020, penulis mengikuti program Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Desa Subik, Kecamatan Abung Tengah, Kabupaten Lampung Utara. Penulis menyelesaikan Praktek Kerja Lapangan (PKL) di Unit Pelaksanaan Teknis (UPT) Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi dan Teknologi Universitas Lampung

Kota Bandar Lampung dengan judul Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut pada tahun 2020. Penulis menyelesaikan penelitian skripsi yang berjudul **"Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut Menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)"** pada tahun 2023.

MOTTO

"Andai saja kamu tahu bagaimana Allah mengatur urasan-urusanmu, hatimu akan luluh karena begitu mencintai-Nya"

(Imam Syafi)

"Lakukan semua yang kamu inginkan, jangan pedulikan pendapat orang lain. Ikuti saja kata hatimu."

(Tale of Nokdu)

"If you want to love others, you should love yourself first"

(RM)

"Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan"

(Al-Insyirah : 6)

"Doamu yang mana, usahamu yang keberapa, kau tak pernah tahu mana yang akan membuahkan hasil. Tugas kita hanya satu untuk keduanya: Perbanyaklah"

(Anonim)

"The bad news is time flies. The good news is you're the pilot"

(Michael Altshuler)

"Dengan menyebut nama Allah yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang"

Atas rahmat Allah SWT
Kupersembahkan karya kecilku ini sebagai wujud bukti dan tanggung jawab kepada :

Kedua orang tuaku yang telah menyayangi, merawat, mendidik, mengajarkan kebaikan, dan selalu mendoakan keberhasilanku dalam setiap sujud.

Adik-adikku serta keluarga besarku yang selalu memberikan semangat dan doa yang terbaik untukku.

Dengan segala rasa hormat kepada pembimbing penelitianku :
Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph. D
Ibu Dr. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, M.Si
Bapak Prof. John Hendri, Ph. D

Terima kasih atas ilmu, nasihat, dan kesabaran dalam membimbing saya selama ini.

Dosen Jurusan Kimia yang selalu membagi ilmunya untukku

Sahabat dan teman-temanku

Almamater Tercinta Universitas Lampung

SANWACANA

Alhamdulillahi robbil ‘alamin segala puji hanya bagi Allah SWT, atas rahmat dan ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut Menggunakan Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS)”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains di Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung.

Penulis menyadari bahwa penyelesaian skripsi ini tidak lepas dari bimbingan dan bantuan dari berbagai pihak. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Penyemangat terbesar dalam hidup saya, kedua orang tua yaitu, Umi, Papa, Abi, dan Bunda yang selalu mendidik, memberikan kasih sayang, dukungan, doa, motivasi, nasihat, dan semua yang terbaik kepada penulis hingga saat ini.

2. Adik-adikku tersayang Zahra, Naufal, Aulia, Adzkia, Reyhan, dan Devano yang selalu memberikan semangat, dukungan, canda tawa, serta bertanya kapan lulus.

3. Bapak Prof. Andi Setiawan, Ph.D., selaku Pembimbing I yang telah sabar membimbing, dan selalu memberikan motivasi saya baik selama perkuliahan, penelitian dan penulisan skripsi.

4. Ibu Dr. Eng. Ni Luh Gede Ratna Juliasih, S.Si., M.Si, selaku Pembimbing II yang selalu memberikan bimbingan dan motivasi baik selama perkuliahan, penelitian, maupun sampai penyelesain skripsi ini.

5. Bapak Prof. John Hendri, Ph.D., selaku Pembahas yang telah memberikan masukan, dukungan, dan kritik yang bersifat positif dan membangun.

6. Bapak Mulyono, Ph.D., selaku Ketua Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

7. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung.

8. Bapak dan Ibu Dosen Jurusan Kimia atas seluruh ilmu, bimbingan, perhatian, dan motivasi selama perkuliahan. Serta seluruh sivitas akademik Universitas Lampung yang telah membantu dalam mengurus administrasi selama perkuliahan.

9. Suami terrsayang, Agung Permadi manusia hebat yang selalu sabar menemani dari awal penelitian hinga dititik saat ini, selalu memberikan motivasi yang tidak pernah berhenti, dan selalu mendengarkan keluh kesah penulis dalam menyelesaikan skripsi.

10. Putraku tersayang, Melviano Delvin Arsalan yang selalu kuat menemani saya selama penelitian dan tidak pernah mengeluh saat dalam kandungan serta selalu mengerti keadaan dan kondisi saya. Semoga kamu selalu diberi kesehatan dan kebahagian dalam hidupmu. Dan tumbuh besar menjadi anak yang shaleh, pintar, dan lembut hati.

11. Mbak Rosyidatul Lutfiah, S.Si, M.Si. yang selalu sabar, memberikan motivasi, memberikan pengalaman, dan semangat kepada saya dalam menyelesaikan

skripsi. Terima kasih atas ilmu yang mbak berikan dari awal hingga sampai dititik saat ini.

12. Kak Fendi Setiawan, S.Si., M.Si., dan M. Rizky Simanulang, S.Si, atas ilmu, bantuan, kebersamaan, dan canda tawa selama saya melakukan penelitian hingga saya dapat menyelesaikan skripsi ini.

13. Abang Antonio Sinaga, S.T yang selalu memberikan motivasi, bantuan, dan waktu untuk menemani dan mendengarkan keluh kesah, serta memberikan semangat dari awal perkuliahan di tanah rantau.

14. Teman-teman "Bukan Kupu-Kupu Malam" (Nadia Safitri, S.Si dan Dahliani Silvia Sianipar, S.Si) atas canda, tawa, bantuan, dan semangat, serta bertukar motivasi dan emosi. Semangat mencari cuan teman-teman.

15. Teman senasib penghuni "Buka Pake Apa" (Naura, Vega, Puput, Tasya, dan Angri) kita bukan hanya sekedar teman, tetapi melainkan kita saudara. Terimakasih atas canda, tawa, keluh kesah, dukungan, motivasi, dan semangat selama ini serta selalu menjadi rumah kedua saya di saat berada dititik lelah. Semoga kita dapat dipertemukan kembali pada lain waktu.

16. Remizar Alpaddli, S.Si, Cucu Wijayanti, S.Si, Tiara Eka Novrianti, S.Si, Maria Fajariana Kurniasih, S.Si, Mona Elizabeth Tambunan, S.Si, dan Fina Palinda, S.Si atas kebersamaan, keceriaan, dan kesedihannya selama perkuliahan.

17. Penghuni LTSIT (Kipang, Cici, Aisyah, Siti, Nur, Lanang, Caca, Nurhuda, Gabrel, Chasya, dan Nafila) atas bantuan, kebersamaan, dan kerjasamanya selama penulis menyelesaikan penelitian.

18. Seluruh Kimia 2016 yang sudah menjadi keluarga selama ini. Kimia 2016, satu jiwa solid.

19. Semua pihak yang telah membantu menyelesaikan skripsi ini. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan mereka.

Penulis menyadari terdapat kekurangan dari skripsi ini baik dalam isi maupun cara penyajian. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan di masa mendatang. Semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis dan pembaca. Aamiin.

Bandar Lampung, 07 Juni 2023

Penulis,

Mifta Rahma Widiyanti

DAFTAR ISI

Halaman

DAFTAR ISI i

DAFTAR TABEL iii

DAFTAR GAMBAR iv

I. PENDAHULUAN 1
- 1.1 Latar Belakang 1
- 1.2 Tujuan Penelitian 3
- 1.3 Manfaat Penelitian 3

II. TINJAUAN PUSTAKA 4
- 2.1 Fungi 4
- 2.2 Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut 5
- 2.3 Senyawa Metabolit Sekunder 5
- 2.4 Spons 6
- 2.5 Bakteri 8
  - *2.5.1 Pseudomonas aeruginosa* 9
  - 2.5.2 *Staphylococcus aureus* 10
- 2.6 Senyawa Antibakteri 11
- 2.7 Kultivasi 11
- 2.8 *Solid State Fermentation* (SSF) 12
- 2.9 Ekstraksi 13
- 2.10 Partisi 14
- 2.11 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 15
- 2.12 Uji Bioautografi 17
- 2.13 *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS) 18

III. METODE PENELITIAN 21
3.1 Waktu dan Tempat 21
3.2 Alat dan Bahan 21
3.3 Prosedur Penelitian 22
3.3.1 Peremajaan dan Identifikasi Isolat Fungi 22
3.3.2 Kultivasi dan Ekstraksi Fungi 22
3.3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 23
3.3.4 Uji Bioautografi 23
3.3.5 Ekstraksi EtOAc dan Partisi 24
3.3.6 Karakterisasi Senyawa 24
3.4 Diagram Alir 25

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN 26
4.1 Isolat Fungi 26
4.2 Kultivasi dan Ekstraksi Fungi 29
4.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 31
4.4 Uji Bioautografi 34
4.5 Ekstraksi EtOAc dan Partisi 35
4.6 Karakterisasi Senyawa 38

V. KESIMPULAN DAN SARAN 40
5. 1 Kesimpulan 40
5. 2 Saran 40

DAFTAR PUSTAKA 41

LAMPIRAN 52

DAFTAR TABEL

Tabel Halaman

1. Pengamatan Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) 32

DAFTAR GAMBAR

Gambar Halaman

1. Struktur Spons (Reece *et al.*, 2014) 6
2. Senyawa Bioaktif Aspergione A (a) dan Clonostachysins A (b) dari fungi *derived* spons 7
3. *Pseudomonas aeruginosa* (Pasamba *et al.*, 2007) 9
4. *Staphylococcus aureus* (Lenda, 2014) 10
5. Isolat Fungi (a) 18A02RF (b) 18A06RF (c) 18B16RF (d) 18B19RF (e) 18D33RF 27
6. Morfologi Fungi (a) 18A02RF (b) 18A06RF (c) 18B16RF (d) 18B19RF (e) 18D33RF dengan perbesaran 400x 28
7. Kultivasi (a) 18A02RF (b) 18A06RF (c) 18B16RF (d) 18B19RF (e) 18D33RF pada media beras 30
8. Hasil Ekstraksi etil asetat pada isolat fungi (a) 18A02RF (b) 18A06RF (c) 18B16RF (d) 18B19RF (e) 18D33RF 31
9. Hasil Uji KLT Visualisasi UV 254 nm 33
10. Hasil Uji KLT (a) Pereaksi Dragendroff (b) Pereaksi Serium Sulfat pada fungi 18A06RF 33
11. Hasil Uji Bioautografi pada bakteri (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Staphylococcus auereus* 34
12. Kultivasi fungi 18A06RF menggunakan media beras 35
13. Hasil Penambahan EtOAc 36
14. Ekstrak kasar fungi 18A06RF setelah evaporasi 37
15. Hasil pemekatan partisi fraksi EtOAc 37

16. Kromatogram fraksi 18A06RF 38

17. Spektrum dengan puncak waktu retensi 16.52 39

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada dekade terakhir ini, fenomena resistensi bakteri terhadap antibiotik menjadi masalah utama yang mengancam kesehatan manusia secara global. *World Health Organization* (2020) menyatakan hingga 30 Desember 2020 bahwa terdapat 80.773.003 kasus yang diakibatkan oleh resistensi bakteri dan virus yang terdapat di seluruh dunia. Pada kasus ini, antibiotik merupakan obat yang hampir pasti diresepkan pada pasien. Namun, sebelum terdapat kasus pandemi COVID-19 penggunaan antibiotik diberikan secara berlebihan pada pasien perawatan rumah sakit (Langford *et al.*, 2020). Analisis diatas membuktikan bahwa penggunaan antibiotic secara berlebihan tidak terbukti memperbaiki luaran pasien (Van Staa *et al.*, 2020). Hal tersebut merupakan masalah serius untuk ditanggulangi. Kecemasan yang muncul dalam penanganan penyakit infeksi akibat resistensi antibiotik mendorong para ilmuwan dalam melakukan penelitian untuk eksplorasi senyawa antibiotik yang baru.

Laut merupakan bagian terluas dari bumi yang menjadikannya sebagai habitat jutaan spesies. Lautan Indonesia merupakan wilayah Indopasifik dan sebagai salah satu titik penyebaran keanekaragaman biota laut terbesar. Keanekaragaman hayati perairan laut khususnya invertebrata laut dari terumbu karang telah menjadi sumber yang sangat menarik untuk produk kimia bahan alam karena mereka menghasilkan metabolit dengan aktivitas biologis yang berbeda. Keanekaragaman hayati perairan laut Indonesia memberi peluang untuk memanfaatkan biota laut menjadi target untuk terus mencari senyawa bioaktif (Sabdono *et al.*, 2008). Salah satu komponen penyusun terumbu karang yang menghasilkan senyawa bioaktif adalah spons.

Kajian akhir-akhir ini telah dilaporkan hasil pencarian senyawa bioaktif dari fungi yang berasal dari sumber baru seperti fungi yang berasal dari spons. Spons memiliki komponen bioaktif yang belum banyak dimanfaatkan oleh masyarakat dan memiliki potensi bioaktif yang lebih tinggi dibandingkan tanaman-tanaman darat. Senyawa bioaktif spons berupa senyawa metabolit sekunder yang berguna untuk mempertahankan diri. Setiap jenis spons memiliki metabolit sekunder yang memiliki sifat bioaktif (Murniasih, 2003). Namun, hingga saat ini potensi spons belum di eksplorasi secara optimal. Telah dilakukan penelitian oleh Zhang *et al.* (2017) terhadap spons jenis *A. oroides* yang menemukan bahwa spons memiliki banyak aktivitas seperti toksisitas terhadap sel kanker payudara dan aktivitas antibakteri.

Spons umumnya dapat bertahan hidup di perairan laut yang miskin nutrisi karena adanya asosiasi dengan organisme lain khususnya bakteri (Abubakar *et al.*, 2011). Bakteri dalam bentuk asosiasi dengan spons dapat memberikan kontribusi untuk pertahanan inangnya dengan ekskresi antibiotik dan substansi bioaktif lainnya. Namun *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) melaporkan bahwa telah meninggal 2.700 pasien yang diakibatkan oleh bakteri seperti *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* pada tahun 2017. Indonesia juga tercatat 24% dari kasus infeksi yang diakibatkan oleh resistensi bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* (Severin *et al.*, 2008). Berdasarkan uraian diatas mengindikasikan penurunan efektivitas antibiotik terhadap bakteri patogen yang mengakibatkan meningkatnya kebutuhan antibiotik jenis baru.

Para peneliti pada akhir-akhir ini melakukan pendekatan menggunakan teknik *Solid State Fermentation* (SSF) dalam kultivasi fungi untuk mencari senyawa bioaktif. *Solid State Fermentation* merupakan salah satu teknik alternatif kultivasi dalam pencarian senyawa bioaktif karena pada teknik ini relatif mudah dan mampu menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang spesifik. Seperti yang telah dilakukan oleh Setiawan *et al.* (2021), teknik SSF menghasilkan senyawa yang diindikasikan memiliki kemiripan dengan senyawa analog Branimycin B yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri resisten klinis *S. aureus*.

Beberapa penelitian yang sudah dilakukan, didapatkan informasi kajian mengenai pencarian senyawa bioaktif sebagai antibakteri, tetapi masih sangat terbatas. Hal ini disebabkan oleh adanya keterbatasan ketersediaan spons di alam dan kemiripan senyawa bioaktif dari fungi yang berasosiasi dengan biota laut. Di sisi lain, dalam pencarian senyawa bioaktif menggunakan mikroorganisme sering kali terkendala oleh hilangnya aktivitas yang dihasilkan oleh mikroorganisme tersebut. Oleh karena itu, dalam penelitian ini dilakukan kajian terkait karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari fungi yang berasosiasi dengan biota laut. Kajian ini sangat penting sebagai langkah awal baru dalam pencarian senyawa baru.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian adalah sebagai berikut:

1. Mengidentifikasi fungi yang berasosiasi dengan biota laut yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Melakukan karakterisasi senyawa metabolit sekunder dari fungi yang berasosiasi dengan biota laut menggunakan *Liquid Chromatography – Mass Spectroscopy* (LC-MS).

1.3 Manfaat Penelitian

1. Sebagai langkah awal penemuan kandidat senyawa metabolit sekunder dari fungi yang berasosiasi dengan biota laut.
2. Sebagai refrensi untuk penelitian yang berkaitan dengan pengujian fungi yang berasosiasi dengan biota laut.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Fungi

Fungi adalah salah satu penyusun keanekaragaman hayati. Jumlah spesies fungi laut jauh lebih sedikit yang terdapat di alam. Meskipun fungi laut lebih sedikit, fungi laut memiliki peran penting dalam ekosistem laut. Fungi laut merupakan organisme saprofitik yang menguraikan bahan-bahan organik dan mengatur siklus nutrient di laut. Fungi laut dapat menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antikanker. Hingga tahun 2004 lebih dari 500 bahan bioaktif yang telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi dari fungi laut (Bugni *et al.*, 2004).

Fungi memperbanyak diri dengan cara memproduksi spora. Identifikasi pada fungi dapat dilakukan melalui pendekatan makro-mikroskopis dan molekular untuk mengetahui jenis fungi (Sibero *et al.*, 2017). Karakterisasi fungi berdasarkan makroskopik dapat diketahui melaui bentuk, hifa, warna, dan kondisi. Sedangkan karakterisasi mikroskopis dapat dilakukan dengan menggunakan metode *slide culture* (Nord *et al.*, 2019). Keanekaragaman fungi dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti ketersediaan substrat, kompetisi, temperatur, dan salinitas. Keanekaragaman fungi sangat dipengaruhi oleh substrat karena substrat merupakan medium bagi proses kolonisasi fungi. Sedangkan temperatur mempengaruhi distribusi fungi di dunia (Jones, 2000).

Fungi merupakan salah satu sumber yang memiliki potensi sebagai senyawa bioaktif yang sangat besar. Pendekatan perlu dirancang secara efisien untuk mengakses keragaman senyawa dalam pengembangan obat-obatan baru untuk mengatasi kesulitan terhadapat pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen yang resisten (Butler *et al.*, 2014). Dalam upaya menghadapi masalah tersebut, maka dilakukan fungi yang berasosiasi dengan biota laut untuk

memberikan keuntungan biologis dalam mengontrol produksi metabolit sekunder (Bugni *et al.*, 2004).

2.2 Fungi yang Berasosiasi dengan Biota Laut

Fungi penghasil senyawa bioaktif sebagian besar merupakan fungi yang hidup berasosiasi dengan biota laut contohnya sponge dan alga. Sintesis senyawa bioaktif kemungkinan disebabkan oleh senyawa-senyawa antifungal yang dihasilkan oleh inang yang menyebabkan fungi menghasilkan senyawa bioaktif tertentu yang digunakan untuk bertahan hidup dalam tubuh inang (Raghukumar *et al.*, 2012). Pada ekosistem laut, fungi dapat ditemukan dalam kolam air, sedimen, berasosiasi dengan biota laut, dan sisaan bahan-bahan organik yang mengalami pelapukan (Jones, 2000).

Fungi bersifat simbiosis mutualisme dengan sponge, dimana sponge merupakan tempat hidup berbagai macam mikroba. Mikroba dapat melindungi spons dari predator, serta membantu untuk membawa makanan dari luar untuk spons (Peay *et al.*, 2008). Mikroorganisme yang berasosiasi dengan spons dapat menjadi salah satu alternatif untuk menghasilkan berbagai senyawa bioaktif dalam jumlah besar melalui pengkulturan mikrova (Abubakar *et al.*, 2011).

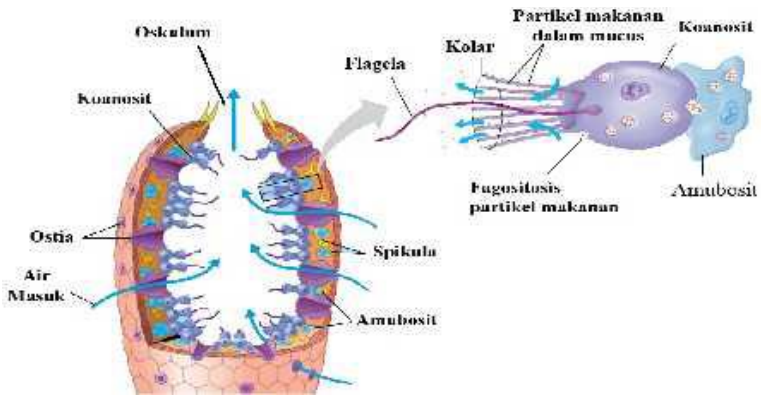
2.3 Senyawa Metabolit Sekunder

Metabolit dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu metabolit sekunder dan metabolit primer. Metabolit sekunder adalah senyawa organik yang disintesis oleh tumbuhan dan sumber senyawa obat (Saifudin, 2014). Metabolit sekunder tidak dapat digunakan untuk pertumbuhan dan dapat dibentuk dari metabolit primer pada kondisi stress. Metabolit sekunder memiliki manfaat sebagai antikanker, antiinflamasi, antimikroba, dan antivirus (Gunawan *et al.*, 2016).

Metabolit sekunder dapat berperan dalam memperbaiki kehidupan mikroba penghasil ketika berkompetisi dengan spesies lain (Tabarez, 2005). Metabolit sekunder dibentuk oleh nutrisi, penurunan kecepatan pertumbuhan, *feedback control*, inaktivitas enzim, dan induksi enzim. Keterbatasan nutrisi dan penurunan kecepatan pertumbuhan akan menghasilkan sinyal yang mempunya efek regulasi sehinggi menyebabkan diferensiasi kimia (metabolit sekunder) dan diferensiasi morfologi (morfogenesis) (Demain, 1998). Senyawa metabolit sekunder yang berasal dari spons terbukti mengandung senyawa aktif sebagai *lead compound* dalam pengembatan obat antibiotik, antikanker, dan antivirus. Hal ini dapat membuktikan bahwa spons sangat potensial dalam pengembangan industri farmasi (Murniasih, 2003). Sebagian besar senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan dari spons merupakan golongan alkaloid, terpenoid, dan steroid.

2.4 Spons

Spons merupakan sumber yang kaya senyawa metabolit dengan berbagai bioaktivitas dan struktural (Faltin *et al.*, 2010). Spons mendapatkan makanan dengan cara menghisap serta menyaring air yang melewati permukaan tubuhnya. Menurut Bergquist (1978), spons dapat memompakan air dengan rata-rata 10 kali volume tubuhnya dalam waktu 1 menit. Spons memiliki sifat *filter feeder* yang mampu menyebabkan sifat paling efisien jika dibandingkan dengan hewan laut lainnya.

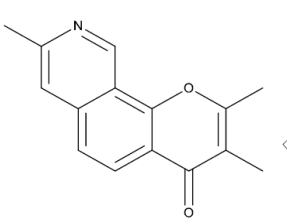


Gambar 1. Struktur Spons (Reece *et al.*, 2014)

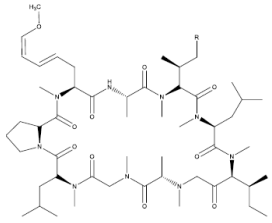
Fungi yang berasal dari spons merupakan salah satu sumber terkaya dari banyak metabolit sekunder yang unik secara struktural dan aktif secara biologis di antara sumber laut. Menariknya, spons terus menjadi salah satu sumber yang paling penting untuk isolasi fungi (Höller *et al.*, 2002, Bugni and Ireland, 2004).

Akhir-akhir ini kajian mengenai fungi *derived* spons sangat menarik, karena spons merupakan salah satu sumber senyawa bioaktif yang telah diketahui memiliki beragam aktivitas. Dasar pencarian senyawa bioaktif dari fungi *derived* spons disebabkan telah dilaporkan senyawa Jaspaklinolide L yang memiliki struktur mirip dengan metabolit yang dihasilkan oleh bakteri (Proksch *et al.*, 2002). Oleh karena itu, sangat menarik untuk mempelajari serta mencari senyawa yang berasal dari mikroorganisme yang terdapat pada spons.

Salah satu yang berhasil dilaporkan oleh Lin *et al.* (2003) senyawa Aspergione A seperti terlihat pada **Gambar. 2(a)** memiliki senyawa baru dari turunan chromon trisiklik yang berhasil diisolasi dari fungi *Aspergillus versicolor* dari spons laut *Xestospongia exigua* yang berasal dari Indonesia. Sedangkan salah satu senyawa peptide yang berhasil diisolasi, yaitu senyawa Clonostachysins A yang terlihat pada **Gambar. 2(b)** diperoleh dari spons laut yang berasal dari fungi *Clonostachys rogersoniana* strain HJK9. Stereokimia absolut ditentukan oleh metode Marfey (Adachi *et al.*, 2005).



(a)
Aspergione A (Lin *et al.*, 2003)



(b)
Senyawa Clonostachysins A (Adachi *et al.*, 2005)

Gambar 2. Senyawa Bioaktif Aspergione A **(a)** dan Clonostachysins A **(b)** dari fungi *derived* spons

2.5 Bakteri

Bakteri adalah kelompok organisme yang tidak memiliki membrane inti sel. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di gurun pasir, salju atau es, hingga es. Bakteri yang keberadaannya banyak sekali ini, memungkinkan untuk menjadi salah satu penyebab penyakit pada manusia (Sari *et al.*, 2011), tetapi sebagian besar spesies bakteri tidak berbahaya dan sering bermanfaat. Berdasarkan kemampuan menimbulkan penyakit ada dua jenis, yaitu bakteri patogen dan apatogen. Bakteri yang menyebabkan penyakit pada manusia adalah bakteri patogen (Darmadi, 2008). Bakteri patogen yang menyebabkan penyakit infeksi pada manusia contohnya adalah *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Sedangkan bakteri apatogen adalah bakteri yang tidak berpotensi menimbulkan penyakit, bahkan ada yang menguntungkan bagi manusia (Fardiaz, 2002).

Menurut Koes Irianto (2006), faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah:

a. Sumber energi, yang diperlukan untuk reaksi-reaksi sintesis yang membutuhkan energy dalam pertumbuhan dan restorasi, pemeliharaan keseimbangan cairan, gerak, dan sebagainya.

b. Sumber karbon

c. Sumber nitrogen

d. Sumber garam-garam anorganik, khususnya folat dan sulfat sebagai anion dan potasium, sodium magnesium, kalsium, besi, mangan sebagai kation.

e. Bakteri-bakteri tertentu membutuhkan faktor-faktor tumbuh tambahan yang disebut juga sebagai vitamin bakteri yang dibutuhkan dalam jumlah sedikit untuk sintesis metabolik esensial.

2.5.2 Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif yang berbentuk batang dan yang memiliki ukuran lebar sebesar 0,5 hingga 0,8 μm dengan panjang 1,5 hingga 3,0 μm. Bakteri ini memiliki ciri-ciri berbintik abu serta memiliki flagel dan dapat tumbuh pada air dan tanah. Pseudomonas di alam berbentuk dalam biofilm dan melekat pada beberapa permukaan atau substrat, atau dalam planktonic. Sebagai organisme uniseluler, aktif berenang menggunakan flagelnya.

Gambar 3. *Pseudomonas aeruginosa* (Pasamba *et al.*, 2007)

Pseudomonas aeruginosa adalah patogen oportunistik yang berarti memiliki kemampuan melawan pertahanan inang melalui proses infeksi. Bakteri ini tidak dapat menginfeksi jaringan, namun hampir tidak ada jaringan yang tidak dapat terinfeksi jika pertahanan jaringan tidak dapat menahan serangan bakteri melaluli proses yang disebut resistensi. Infeksi *Pseudomonas aeruginosa* adalah masalah serius pada pasien yang dirawat di rumah sakit dengan berbagai penyakit seperti kanker, fibrosis kistik, dan luka bakar. Dibandingkan dengan patogen lain, *P. aeruginosa* sangat sulit untuk diatasi karena menunjukkan resistensi intrinsic yang tinggi terhadap berbagai macam antibiotik. Obat antipseudomonal yang sering digunakan dalam rumah sakit seperti ciprofloxacin sebagai agen antimikroba (Brazas *et al.*, 2005).

2.5.3 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif dengan bentuk bulat memiliki ukuran diameter 0,5-1,5 µm, kemungkinan memiliki kapsul berupa polisakarida. *Staphylococcus aureus* dapat tumbuh dengan suhu 6,5-46°C dan pada pH 4,2-9,3. Koloni bakteri *Staphylococcus aureus* tumbuh dalam waktu 24 jam dan membentk pigmen *lipochrom* yang menyebabkan koloni tampak berwarna kuning keemasan dan kuning jeruk (Dewi, 2013).

Gambar 4. *Staphylococcus aureus* (Lenda, 2014)

Menurut Ferianto (2012) klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut:

Divisi : *Protophyta*
Kelas : *Schizomycetes*
Ordo : *Eubacteriales*
Famili : *Micrococccceae*
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah salah satu bakteri patogen penting yang berkaitan dengan virulensi toksin, invasif, dan ketahanan terhadap antibiotik (Rahmi *et al.*, 2015). *Staphylococcus aureus* juga merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi tersering di dunia. Tingkat keparahan infeksinya pun bervariasi, mulai dari infeksi minor di kulit (furunkulosis dan impetigo), infeksi traktus urinarius, infeksi traktus

respiratorius, sampai infeksi mata dan *Central Nervous System* (CNS) (Septiani *et al.*, 2017).

Menurut Herlina *et al*. (2015) menyatakan bahwa bakteri S. *aureus* dapat menyebabkan terjadinya berbagai jenis infeksi mulai dari infeksi kulit ringan, keracunan makanan sampai dengan infeksi sistemik. Infeksi yang terjadi misalnya keracunan makanan karena *Staphylococcus*, salah satu jenis faktor virulensi yaitu *Staphylococcus enterotoxin*. Gejala keracunan makanan ikuti oleh diare (Karimela *et al.*, 2017).

2.6 Senyawa Antibakteri

Senyawa antibakteri adalah senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme dalam konsentrasi kecil yang mampu menghambat bahkan membunuh proses kehidupan mikroorgnisme. Antibakteri termasuk kedalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Suatu zat aktif yang dapat dikatakan memiliki aktivitas sebagai antibakteri apabila dalam konsentrasi yang rendah mampu memberi daya hambat terhadap bakteri (Pratiwi, 2019).

Menurut Makvandi (2020) telah ditemukan struktur dan aktivitas antimikroba sebanyak 272 senyawa yang berasal dari fungi laut yang terdata dari tahun 1998 hingga 2019. Resistensi antimikroba dapat ditemukan di berbagai negara. Hal ini menyebabkan WHO pada 2017 merilis daftar prioitas patogen resisten antibiotik yang secara global telah menjadi ancaman terbesar bagi kesehatan manusia.

2.7 Kultivasi

Senyawa-senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh fungi dapat diperoleh dengan cara teknik kultivasi pada media cair dan padat. Pada penelitian ini lebih difokuskan pada kultivasi media padat. Kultivasi media padat didefinisikan sebagai kultivasi yang melibatkan padatan tanpa adanya air, tetapi substrat harus memiliki

kelembaban yang cukup untuk mendukung pertumbuhan dan metabolisme mikroorganisme (Leifa *et al.*, 2001).

Kultivasi merupakan suatu metode yang digunakan untuk menumbuhkan isolat dalam media buatan diluar habitat aslinya. Kultivasi ini sendiri berfungsi untuk memperbanyak jumlah mikroba dengan cara membiarkan mikroba tersebut memperbanyak diri dalam media biakan *in vitro* di laboratorium (Bakhtra *et al.*, 2020). Media kultur dan nutrisi dari lingkungan yang berbeda mampu untuk merangsang pertumbuhan antara lain termasuk cahaya (Tisch and Schmoll, 2010) pH, suhu, dan ketersediaan oksigen.

Media yang bervariasi seperti sumber karbon, nitrogen, fosfor, dan garam anorganik atau kandungan logam (Iwai and Omura, 1982). Media yang bervariasi tersebut mendukung dalam menghasilkan metabolit sekunder yang terkait dengan jenis interaksi (secara seksual, penghambatan pertumbuhan atau stimulasi), seperti pertahanan atau perebutan makanan. Namun, setiap parameter yang terdapat pada ko-kultur harus disesuaikan dengan pola perkembangan serta fisiologi jamur. Hal ini penting untuk optimalisasi aktivitas metabolisme selama pengembangan biomassa (Znidarsic and Pavko, 2001).

Nurul (2019) telah melakukan kultur fungi dari sumber inang spons laut *Callyspongia sp.* menggunakan media *Dextrose Agar* (SDA) dan beras dengan waktu inkubasi selama 3 hari. Dan Nuraini (2020) juga telah melakukan pengkulturan dari inang spons laut menggunakan *Trypthic Soy Broth* (TSB), *Malt Extract* (ME), dan beras dengan waktu inkubasi selama 7-14 hari.

2.8 *Solid State Fermentation* (SSF)

Solid State Fermentation (SSF) adalah teknik pertumbuhan mikroba tanpa fase air yang mengalir bebas. SSF merupakan alternatif dari fermentasi terendam untuk meningkatkan produk fermentasi (Tsuchiya *et al.*, 1994). *Solid State Fermentation* (SSF) merupakan metode fermentasi yang digunakan oleh beberapa industri seperti

farmasi, makanan, tekstil, dan lain-lain untuk menghasilkan metabolit mikroorganisme menggunakan *solid support* sebagai pengganti media cair. Metode ini cocok untuk golongan fungi berfilamen. Keunggulan dari teknik SSF ini adalah konsentrasi produk yang diperoleh lebih tinggi akan tetapi hanya membutuhkan energi yang relatif rendah. Substrat yang digunakan mengandung komponen penting seperti C dan N (Indriani *et al.*, 201). Kandungan air yang terkandung di dalamnya diserap oleh susbstrat dalam matriks padat dan lebih mempermudah pertumbuhan mikroogranisme (Robinson *et al.*, 2001). Syarat utama dalam melakukan proses ini adalah oksigen yang dialirkan ke dalam medium (Zhang, 2003).

Fungi dapat tumbuh dengan baik pada media padat karena menggunakan hifa yang tmbuh untuk menyebarkan pertumbuhan koloni ke tempat yang mengandung banyak makanan (*nutrient*) (Prosser and Though, 1991). Pada hifa bagian ujung merupakan pusat dari aktivitas metabolisme terutama untuk memastikan tempat yang memiliki banyak makanan untuk penyebaran koloni.

2.9 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa yang diinginkan dari suatu sampel menggunakan pelarut yang sesuai, pada metode ini didasarkan oleh perbedaan pendistribusian zat terlarut antara dua pelarut atau lebih yang tidak saling bercampur. Isolasi senyawa metabolit sekunder yang berasal dari fungi dilakukan untuk mendapatkan senyawa metabolit sekunder yang diharapkan berpotensi terhadap antibakteri sehingga dapat memberikan manfaat bagi kehidupan manusia (Seidel, 2006).

Untuk menarik senyawa bioaktif dari organisme invertebrata di lingkungan laut diperlukan tahapan ekstraksi yang sesuai. Ekstrak kasar spons diketahui terdiri dari campuran kompleks dari berbagai metabolit, termasuk alkaloid, terpenoid, peptide, dan kuinon (Varijakzhan *et al.*, 2021). Metode ekstraksi menggunakan pelarut maserasi melibatkan sampe direndam dalam pelarut dan diaduk dari waktu ke

waktu. Pelarut yang digunakan dalam teknik ini terdiri dari pelarut tinggal atau campuran pelarut dengan berbagai macam polaritas. Msialnya, methanol, etanol, triklorometana, aseton, dan air. Berdasarkan kesamaan dan *intermisciblity* (*like discolves likes*), pelarut dengan nilai polaritas mendekati polaritas zat terlarut cenderung berkinerja lebih baik dan sebaliknya. Etanol dan methanol adalah pelarut universal yang dapat digunakan untuk ekstraksi (Zhang *et al.*, 2018).

Prinsip pada metode maserasi ini didasarkan pada perendaman sampel menggunakan pelarut organik sehingga terjadi pemecahan dinding dan membrane sel akibat perbedaan tekanan pada bagian dalam dan luar sel sehingga kandungan metabolit sekunder yang terkandung di dalam sitoplasma teralrut pada pelarut organik (Yeon Jul *et al.*, 2014).

Pemilihan prosedur ekstraksi untuk metabolit mikroba harus mempertimbangkan jumlah senyawa metabolit yang diproduksi oleh mikroba sangat rendah dan menghasilkan campuran senyawa yang kompleks. Pelarut yang digunakan atau pelarut organik misalnya etil asetat (EtOAc), metanol (MeOH), dan sebagainya untuk ekstraksi senyawa metabolit mikroba (Seidel, 2006). Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut etil asetat (EtOAc).

2.10 Partisi

Partisi (ekstraksi cair-cair) merupakan pemisahan senyawa kimia yang terkandung dalam 2 fase pelarut yang tidak saling bercampur. Fase yang digunakan biasanya fase air dan fase lainnya merupakan pelarut organik seperti *n*-heksana, etil asetat, dietil eter, atau kloroform, sehingga menyebabkan kedua fase tersebut tidak bercampur yang disebabkan perbedaan massa jenis pada masing-masing pelarut. Satu komponen dari campuran akan memiliki kelarutan dalam kedua lapisan tersebut (dapat disebut fase) dan setelah beberapa waktu dicapai keseimbangan biasanya dipersingkat oleh pencampuran kedua fase tersebut dalam corong pisah (Najib, 2018). Senyawa-senyawa yang bersifat polar pada corong pisah akan

ditemukan di dalam fase air, sedangkan senyawa-senyawa yang bersifat hidrofobik akan masuk pada pelarut organik (Tobo, 2001).

Untuk mencapai proses pratisi yang baik, pelarut yang digunakan harus memenuhi kriteria, yaitu memilki kemampuan yang tinggi untuk melarutkan komponen zat terlarut di dalam campuran, perbedaan berat jenis antara ekstrak dan rafinat yang lebih besar, pelarut dan larutan yang akan diektraksi tidak mudah campur, tidak mudah bereaksi dengan zat yang akan diekstraksi, tidak merusak alat secara korosi, tidak mudah terbakar, tidak beracunm dan harganya realtif murah (Martunus dan Helwani, 2005).

2.11 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik identifikasi yang cepat, sensitif, dan murah yang digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, memverifikasi identitas dan kemurnian senyawa, memantau kemajuan dalam reaksi, menentukan komposisi pelarut untuk pemisahan preparatif, dan menganalisis fraksi yang diperoleh dari kromatografi kolom. Fase stasioner berupa plat alumunium dan plat kaca yang sering digunakan dalam KLT. Plat kaca dikenal sebagai penyangga yang kuat, kaku, transparan, dan memiliki ketahanan kimia serta stabilitas panas yang baik. Plat kaca memiliki kelemahan yaitu adanya kerapuhan plat kaca yang membuatnya rentan terhadap kerusakan sehingga plat alumunium foil lebih diunggulkan sebagai fase diam dalam KLT. Dibandingkan dengan plat kaca, plat alumunium foil memiliki karakteristik tipis, ringan, dan dapat dipotong dengan mudah. Selain itu, plat alumunium foil memiliki lapisan adsorben yang kuat dan cocok digunakan dengan eluen yang mengandung konsentrasi air yang tinggi. Namun, perlu diperhatikan bahwa plat alumunium tidak memiliki daya tahan yang sama terhadap bahan kimia seperti kaca, terutama terhadap pereaksi yang mengandung asam kuat dan ammonia pekat (Cai, 2014).

Penentuan fasa gerak berperan penting dalam sistem KLT. Sebagai pelarut terdiri dari campuran beberapa komponen, biasanya hingga lima komponen. Terlepas dari jumlah komponen, sistem pelarut yang dipersiapkan harus homogeny tanpa adanya kekeruhan. Pemilihan sistem pelarut melibatkan tiga kriteria utama: kelarutan, kemurnian, dan resolusi. Tahap awal dalam memilih pelarut adalah menilai kelarutannyad alam sampel. Fase gerak yang dipilih seharusnya memiliki daya larut maksimal bagi sampel, mempertimbangkan keseimbangan antara afinitas sampel terhadap pelarut dan fase diam agar pemisahan dapat tercapai (Cai, 2014). Pada penggunaan fasa diam silika, senyawa yang lebih polar memiliki interaksi yang lebih kuat dengan silika sehingga akan menghasilkan nilai R_f yang kecil, sedangkan senyawa yang kurang polar akan bergerak ke arah atas mengikuti prinsip kapilritas dan akan menghasilkan nilai R_f yang lebih besar (Bele *et al.*, 2011).

Interpretasi komponen pada plat KLT yang telah dielusi menggunakan fase gerak dapat dilakukan dengan penambahan pereaksi. Pereaksi ini menghasilkan perubahan warna visual pada daerah tempat unsur-unsur tersebut berada. Penggunaan pereaksi ini membantu mengenali senyawa-senyawa khusus yang mungkin tidak mempunyai warna atau ciri visual yang jelas dalam keadaan normal. Beberapa contoh pereaksi yang umum digunakan dalam KLT meliputi serium (IV) sulfat, *Dragendorff*, dan ninhidrin. Perekasi serium (IV) sukfat umumnya digunakan sebagai pereaksi oksidimetri dalam pengujian senyawa organik yang dapat dioksidasi (Prashanth and Basaviah, 2014) dan secara khusus juga efektif untuk mendeteksi alkaloid. Uji positif menghasilkan noda berwarna hitam dengan latar belakang berwarna kuning-putih. Perekasi *Dragendorff* digunakan untuk pengujian senyawa alkaloid (gugus N tersier). Uji positif menghasilkan noda berwarna oranye (Raal *et al.*, 2020). Pereaksi ninhidrin digunakan untuk mwnunjukkan keberadaan asama amino atau amina (gugus N primer atau sekunder). Uji positif menghasilkan noda berwarna ungu atau kecoklatan (Meyers and Meyers, 2008).

Data yang diperoleh dari KLT adalah nilai R_f yang berguna untuk identifikasi senyawa. Nilai R_f untuk senyawa murni dapat dibandingkan dengan nilai Rf dari senyawa standar. Nilai Rf dapat didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh

senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal. Oleh karena itu, bilangan R_f selalu lebih kecil dari 1,0. Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah pada lapisan tipis menggunakan harga Rf (Bresnick, 2004).

2.12 Uji Bioautografi

Uji bioautografi merupakan metode sederhana yang bersifat untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antiviral (Pratiwi, 2008). Metode ini adalah metode alternatif untuk mendeteksi zat aktif, mencari antibakteri, kontrol kualitas antimikroba, dan mendeteksi golongan senyawa (Kusumaningtyas, 2008).

Menurut Choma *et al.* (2010), metode bioautografi dibedakan menjadi tiga kelompok yaitu:

Bioautografi Kontak

Prinsip kerja dari metode ini adalah plat kromatografi diletakkan pada permukaan agar yang telah diinokulasi dengan mikroba dan diuji selama beberapa menit atau jam sehingga proses difusi dapat terjadi kemudian plat kromatogram diambil dan media agar diinkubasi. Daerah hambatan yang ditunjukan dengan adanya spot antimikroba yang menempel pada permukaan media agar.

Bioautografi Imersi atau Bioautografi Agar *Overlay*

Pada metode ini, plat kromatogram dicelup pada medium agar lalu setelah agar memadat ditambahkan mikroorganisme uji dan diinkubasi. Metode ini merupakan metode kombinasi dari bioautografi kontak dan langsung karena senyawa antimikroba ditransfer dari kromatogram ke media agar seperti dalam metode kontak, tetapi lapisan agar tetap pada permukaan kromatogram selama diinkubasi dan visualisai seperti pada bioautografi langsung.

Bioautografi Langsung

Bioautografi langsung merupakan metode bioautografi yang paling banyak digunakan dari semua metode bioautografi. Prinsip dari metode ini adalah plat KLT dicelupkan pada suspensi mikroorganisme kemudian diinkubasi. Visualisasi dari zona ini biasanya dilakukan dengan menggunakan reagen *dehydrogenase* untuk deteksi aktivitas, yang paling umum adalah garam tetrazolium. *Dehydrogenase* mikroorganisme mengkonversi garam tetrazolium menjadi berwarna, sehingga terlihat spot krim-putih dengan latar belakang ungu pada permukaan plat KLT yang menunjukan keberadaan agen antibakteri.

2.13 *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS)

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan spesifisitas deteksi spektrometri massa. Hasil analisis data LC-MS/MS akan didapatkan kromatogram berupa alur tinggi peak dan juga didapatkan bobot molekul dari senyawa yang terdapat dalam ekstrak sehingga dapat diketahui jumlah kandungan senyawa yang dikandung setiap sampel.

MS bekerja dengan mengionisasi senyawa untuk menghasilkan molekul bermuatan atau fragmen molekul dan mengukur rasio massa terhadap muatannya. Dalam prosedur MS, sampel disuntikkan ke instrument MS dan mengalami ionisasi. Komponen sampel terionisasi dan membentuk partikel bermuatan (ion). Ion-ion dipisahkan menurut rasio massa terhadap muatannya dalam suatu alat penganalisa oleh medan elektromagnetik. Ion dideteksi dan sinyal ion diproses menjadi spektrum massa (Glish and Vachet, 2003).

Keberhasilan teknik LC-MS ditunjukkandengan kemampuannya untuk memberikan data tiga dimensi. Pertama, senyawa dipisahkan berdasarkan waktu oleh LC. Ion yang dihasilkan dalam sumber ionisasi kemudian dipisahkan menurut

rasio m/z dalm penganalisa massa MS. Terakhir, detektor MS mengukur kelimpahan setiap ion. Dibandingkan dengan detektor LC konvensional, seperti ultraviolet-spektrofotometri tampak (UV-vis) atau fluoresensi, detektor MS memungkinkan identifikasi yang jauh lebih andal dari senyawa yang terelusi dari LC. LC-MS dapat mengurangi risiko identifikasi positif palsu dan analit yang sulit diidentifikasi dapat berhasil ditentukan dalam matriks yang rumit pada tingkat rendah (Kruve *et al.*, 2015).

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). 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).

Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS adalah sebagai berikut:

1. Spesifitas

   Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor.

2. Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis

   Penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatile (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da) dan mampu mengukur analit yang sangat polar.

3. Fleksibilitas

   Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat.

4. Kaya informasi

   Sejumlah data kuantitatif maupun kualitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan oleh seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter (Vogeser *et al.*, 2008).

Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisis massa (*mass analyzer*) yang menseleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa (Ardrey, 2003).

Mangurana *et al* (2019) telah melakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak n-heksana spons laut *C. aerizusa*. Analisis spektrum LC-MS mengungkapkan dengan jenis spons yang sama memiliki kandungan senyawa yang berbeda. Berdasarkan hasil berat molekul senyawa yang paling banyak ditemukan pada ekstrak n-heksana spons *C. aerizusa* yang diambil di stasiun I dibandingkan dengan ekstrak n-heksana *C. aerizusa* yang di ambil pada stasiun II.

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Desember 2022 – Maret 2023 di Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium Terpadu dan Sentra Inovasi dan Teknologi (LTSIT) Universitas Lampung Kota Bandar Lampung. Analisis *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS) dilakukan di Laboratorium Forensik Badan Reserse Polri Sentul, Bogor.

3.2 Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kapas, kasa, karet gelang, alat-alat gelas diantaranya: tabung reaksi, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer 100 ml dan 250 mL (Pyrex), gelas kimia (Pyrex), botol vial, botol kaca 200 mL, cawan petri, plastik *wrap*, *tissue*, jarum ose, pinset, *cover glass*, nerasa analitik *Wigen Houser*, *autoclave* Tomy SX-700, *rotary evaporator* Buchii/R210, lampu UV *Kohler/*SN402006, inkubator *Memmert Germany/*INC-02, mikroskop *axio Zeiss imager* A1, oven *Precision*, Laminar *Air Flow* (ESCO) *Incubator* Memmert-Germany/INC-02, plat KLT Silica gel 60 W, mikropipet, labu *evaporator* 25 mL dan 100 mL (Pyrex), spidol, plat kaca alumunium silica gel DC kiesegel 60 F_{254}, lampu UV Kohler/SN402006, dan *Liquid Chromatography-Mass Spechtrometry* (LC-MS) ACQUITY UPLC® H-Class System (Waters, Beverly, MA, USA).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Malt Extract Agar* (MEA) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), *Nutrient Agar* (NA) (Merck, Ltd), *Trypthic Soy Broth* (TSB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), etanol (EtOH), etil asetat

teknis, air laut buatan, akuades, agar swallow, beras hibrida Mapan P-05, pereaksi Dragendorff, etil asetat (EtOAc), pereaksi serium sulfat, n-Heksana (n-Hex) teknis, Metanol (MeOH) teknis, *metilen blue*, dan isopropanol teknis.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Peremajaan dan Identifikasi Isolat Fungi

Isolat fungi yang digunakan yaitu deposit dari Unit Pelaksanaan Teknis Laboratorium dan Sentra Inovasi dan Teknologi (UPT-LTSIT), Universitas Lampung. Peremajaan isolat fungi dilakukan dengan penyiapan beberapa alat seperti *petri dish* dan jarum ose. Alat-alat tersebut disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121^{o}C tekanan 1,2 atm. Selanjutnya, 5 strain fungi dengan kode 18A02RF, 18A06RF, 18B16RF, 18B19RF dan 18D33RF diambil dari deposit dan masing-masing digoreskan ke media agar (Lampiran 2) lalu diinkubasi pada suhu 30^{o}C selama 7 hari untuk dilakukan peremajaan di media TSB kemudian dilakukan identifikasi morfologi fungi menggunakan metode *cover slip* 45^{o}. Setelah dilakukan penumbuhan selama 3 hari di media agar, selanjutnya dilakukan identifikasi morfologi menggunakan mikroskop axio Zeiss imager A1, lalu dilakukan pengamatan miselia di bawah mikroskop dengan penambahan *metilen blue*.

3.3.2 Kultivasi dan Ekstraksi Fungi

Masing-masing isolat fungi dikultivasi mengikuti metode Tang *et al.*, (2022) dengan beberapa modifikasi. Secara sederhana metode yang dilakukan sebagai berikut; media beras 55 gram dalam 100 mL air laut buatan (Lampiran 1) dimasukkan ke dalam botol 200 mL. Media disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada 120^{o}C tekanan 1,2 atm selama 2 jam. Selanjutnya, inokulum fungi ditambahkan pada media beras dan dikultivasi hingga hari ke-7 dalam keadaan statik.

Hasil kultivasi isolat fungi selanjutnya diekstrak dengan menggunakan EtOAc. Selanjutnya, hasil larutan ditampung dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* hingga didapat ekstrak kasar. Setelah didapatkan ekstrak kental kemudian dilakukan uji KLT untuk mengetahui komponen dari masing-masing ekstrak.

3.3.3 Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Uji pendahuluan kromatografi lapis tipis ekstrak sampel dilakukan dengan menggunakan *silica* gel 60 W dan fase gerak variasi perbandingan beberapa pelarut. Uji KLT dilakukan menggunakan variasi pelarut etil asetat (EtOAc), n-heksana, dan isopropanol (IPA) sebagai fase gerak. Selanjutnya untuk mengetahui kandungan senyawa organik digunakan pereaksi serium sulfat yang ditandai adanya noda berwarna coklat kehitaman. Pereaksi *Dragendroff* bertujuan untuk mengetahui kandungan alkaloid dengan gugus (N-tersier) dengan ditandai adanya noda berwarna jingga (orange) pada hasil kromatogram KLT. Untuk mengetahui kandungan asam amino (NH_2) dalam sampel, maka digunakan pereaksi ninhidrin. Pereaksi ini akan menunjukkan noda berwarna ungu khas sampai kecoklatan atau kekuningan. Selanjutnya plat KLT yang telah dipanaskan, diamati dan dihitung nilai Rf pada masing-masing sampel untuk mengetahui tingkat kepolaran masing-masing komponen.

3.3.4 Uji Bioautografi

Uji TLC *Contact bioautography* dilakukan dengan: disiapkan sampel hasil dari ekstraksi sebanyak 50 mg/mL dan ditotolkan sebanyak 20 mg/µL selanjutnya plat SiO_2 diberi tanda *bottom spot* (0,3 cm dari bawah) dan *upper spot* (3 cm dari *bottom spot*), selain itu pemilihan pelarut dilakukan secara *trial error* hingga diperoleh pemisahan yang baik. Preparasi bakteri *Staphyloccus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*, sebanyak 100 µL inokulum 0,5 Mc Farland disebar secara septis pada media NA, kemudian dibiarkan selama 15 menit di dalam *Laminar Air Flow*. Plat

SiO_2 yang telah dielusi dengan n-heksana : EtOAc (7:3) dplat diletakan diatas permukaan media agar yang telah ditambahkan ke setiap suspensi bakteri, kemudian dibiarkan selama satu jam di dalam kulkas untuk mengefektikan proses difusi sampel. Plat SiO_2 diambil dari permukaan agar menggunakan pinset steril dan diinkubasi selama 18 jam. Area inhibisi berupa zona bening ditandai dan dibandingkan dengan plat pembanding yang telah direaksikan dengan pereaksi spesifik dengan kondisi *solvent* yang sama dengan plat uji.

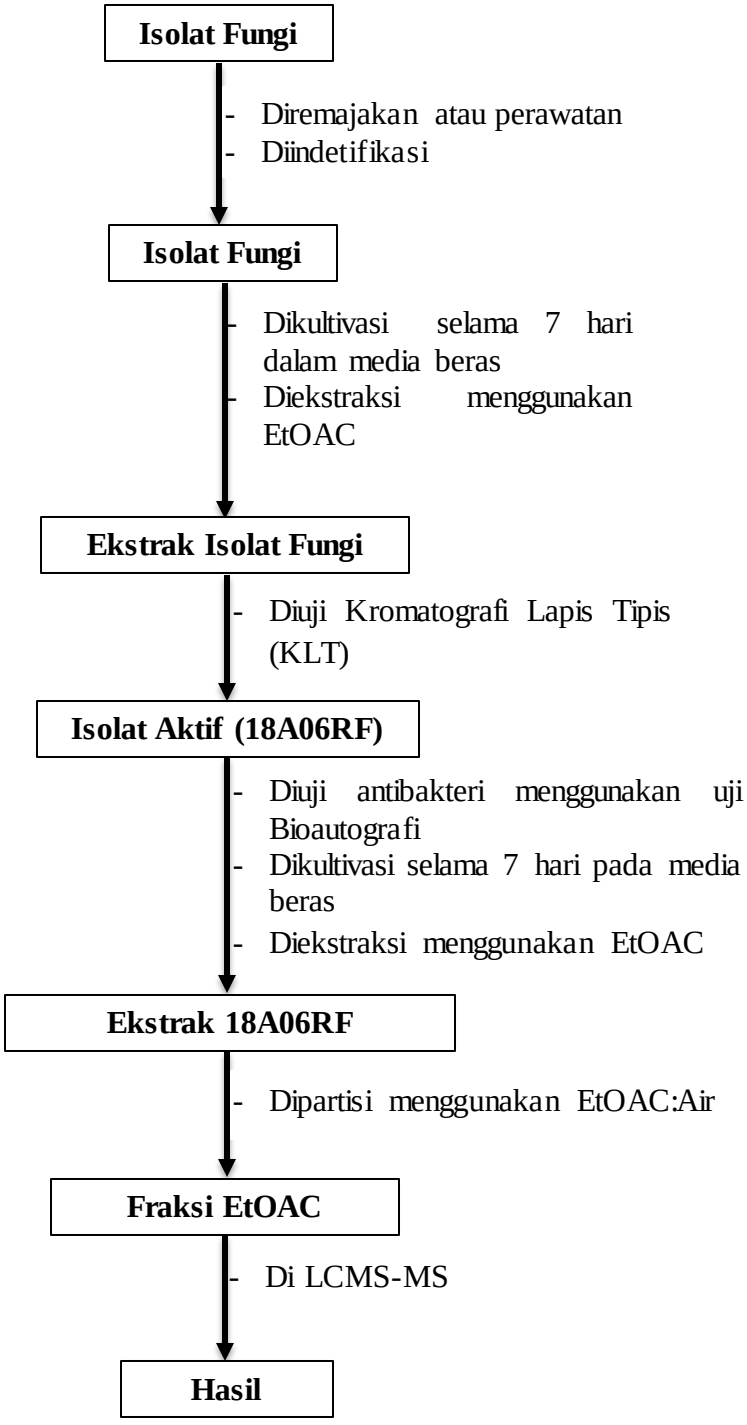
3.3.5 Ekstraksi EtOAc dan Partisi

Isolat fungi 18A06RF selanjutnya diekstrak dengan menggunakan EtOAc (Tang *et al*., 2022), kemudian hasil yang diperoleh dari ekstrak etil asetat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40^{o}C dengan tekanan 95 mbar. Partisi selanjutnya diilakukan dengan menggunakan n-heksana dan air (1:1) dengan dua kali pengulangan ekstraksi.

3.3.6 Karakterisasi Senyawa

Karakterisasi senyawa hasil partisi isolat murni 18A06Rf dianalisis dengan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS). Fraksi aktif dilarutkan dengan menggunakan metanol dan dianalisis menggunakan LC-MS, yang dilengkapi dengan ACQUITY sistem UHPLC (*waters),* kolom ACQUITY UPLC HSS C18 (1,8 µm 2,1 x 100 mm (*waters*), dan Xevo G2-S Qtof Mass Spectro (*waters*).

3.4 Diagram Alir



V. KESIMPULAN DAN SARAN

5. 1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa:

1. Telah berhasil didapatkan fungi yang memiliki bioaktivitas melalui proses kultivasi dengan menggunakan teknik *Solid State Fermentation* (SSF).

2. Hasil uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menunjukkan terdapat 2 isolat fungi yaitu 18A06RF dan 18B16RF yang mengandung senyawa alkaloid, sedangkan pada isolat fungi yang lain terdapat kandungan protein dan senyawa organik lain.

3. Hasil uji bioautografi isolat yang dilakukan terhadap fungi 18A06RF menunjukkan bahwa ekstrak kasar fungi 18A06RF bersifat sebagai antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan tidak bersifat antibakteri *Staphylococcus auereus*.

4. Hasil analisis menggunakan *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy* (LC-MS) menunjukkan bahwa fraksi 18A06RF memiliki puncak dominan pada waktu retensi 16.52 dengan rumus formula molekul $C_{48}H_{88}N_{13}O_{11}$.

5. 2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disarankan penelitian lebih lanjut untuk memaksimalkan karakterisasi senyawa perlu dilakukan pemurnian lebih lanjut dan dilakukan identifikasi fungi secara filogenetik.

DAFTAR PUSTAKA

Abdelmohsen, U.D., Pimentel-Elardo S.M., Hanora A., and Radwan, M. 2010. Isolation, Phylogenetic Analysis and Anti-Infective Activity Screening of Marine Sponge-Associated Actinomycetes. *Mar Drugs*. 8(3): 399–412.

Abubakar, H., Wahyudi, A. T., and Yuhana, M. 2011. Skrining Bakteri yang Berasosiasi dengan Spons *Jaspis* sp. Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba. *Jurnal Ilmu Kelautan* 16(1): 35-40.

Adachi, K., Kanoh, K., Wisespongp, P., Nishijima, M., and Shizuri, Y. 2005. Clonostachysins A and B New Anti-dinoflagellate Cyclec Peptides from Marine Derived Fungus. *Journal of Antibiotics*. 58(2) : 145-150.

Anita Kusuma, D. 2022. *Formulasi dan Uji Antibakteri Sabun Cair Ekstrak Daun Nipah (Nypa Fruticans) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus*. (Disertasi). Universitas Al-Irsyad. Cilacap.

Ardrey, R. E. 2003. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: an Introduction Vol. 2*. John Wiley & Sons.

Asmi, N. 2018. *Analisis KLT Bioautografi Metabolit Sekunder Actinomycetes KK-2.1 dari Rhizosfer Kumis Kucing (Orthosiphon stamineus) Sebagai Kandidat Penghasil Antibakteri*. (Skripsi). Universitas Hasanuddin. Makassar.

Bakhtra, D. D. A., Eriadi, A., and Putri, S. R. 2020. Skrining Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Ekstrak Etil Asetat Jamur Endofit dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*.). *Jurnal Farmasi Higea*. 12: 99-108.

Bele, A. A., Khale, A., Archana, M., and Bele, A. 2011. An Overview on Thin Layer Chromatography. *International Journal of Pharmaceutival Sciences and Research*. 2(2): 256-267.

Bergquist, P. R. 1978. *Sponges*. University of California Press.

Brazas, M. D., and Hancock, R. E. 2005. Ciprofloxacin Induction of a Susceptibility Determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49(8): 3222-3227.

Bresnick, S. 2004. *Intisari Kimia Organik*. Hipokrates. Jakarta.

Brooks, G. L., J.S. Butel., and S.A Morse. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran Ed. 23*. Salemba Medika. Jakarta.

Bugni, T. S., and Ireland, C. M. 2004. Marine-Derived Fungi: A Chemically and Biologically Diverse Group of Microorganisms. *Natural Product Reports*. 21(1) : 143-163.

Butler, M.S., Robertso, A.A., and Cooper, M.A. 2014. Natural Product and Natural Product Derived Drugs in Clinical Trials. *Nat. Prod. Rep*. 31 : 1612–1661.

Cai, L. 2014. Thin Layer Chromatography. *Curent Protocols in Essential Laboratory Techniques*. 6.3.1-6.3.18.

Choma, I. M. 2011. Bioautography Detection in Thin Layer Chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1218(19).

Darmadi, S. 2008. *Infeksi Nosokomial Problematika dan Pengendaliannya*. Salemba Medika. Jakarta.

Demain, A.L. 1998. Induction of Microbial Secondary Metabolism. *International Microblo*. 1 : 259-264.

Dewi, A. K. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji *Sensitivitas Staphylococcus aureus* Terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *J. Sain Veteriner* 31(2): 138-150.

Dudley, N. S. 2010. Arguments for Protected Areas: Multiple Benefits for Conservation and Use. Routledge. ISBN 978-1-136-54292-3. "Species diversity by ocean basin". NOAA Coral Reef Conservation Program. 9 May 2014. Archived from the original on 12 May 2014.

Faltin Traeger, O., Johnson, K. W., and Mayer, C. 2010. Issuer Credit Quality and the Price of Asset Backed Securities. *American Economic Review*. 100(2) : 501-505.

Fardiaz, S. 2002. *Mikrobiologi Pangan 1*. Gramedia Pustaka. Jakarta.

Ferianto, A. 2012. *Pola Resistensi Staphylococcus aureus yang Diisolasi dari Mastitis pada Sapi Perah di Wilayah Kerja KUD Argopuro Krucil Probolinggo Terhadap Antibiotika*. (Disertasi). Universitas Airlangga. Surabaya.

Frank, M., Ferhat, C.Ö., Werner, E.G., Müller, A.H., Matthias U.K., Wenhan, L., Zhen, L., and Peter, P. 2019. Cryptic Secondary Metabolites from the Spons-Associated Fungus *Aspergillus ochraceu*s. *Mar. Drugs*. 17 : 99-112.

Glish, G. L., and Vachet, R. W. 2003. The Basics of Mass Spectrometry in the Twenty-First Century. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2(2): 140-150.

Gunawan, G., Chikmawati, T., Sobir, S., and Sulistijorini, S. 2016. Fitokimia genus Baccaurea spp. *Review Bioeksperimen* 2: 96-110.

Handarini, Suryata, E.P., and Irma, H. 2018. Potensi Medium Air Cucian Beras Agar Sebagai Medium Pertumbuhan *Aspergillus niger*. 6(1): 17-26.

Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. M., and Taylor, M. W. 2012. Genomic Insights Into the Marine Sponge Microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 10(9) : 641–654.

Herlina, N., Afiati, F., Cahyo, A. D., Herdiyani, P. D., Qurotunnada, Q., and Tappa, B. 2015. Isolation and Identification of *Staphylococcus aureus* from Subclinical Infection Dairy Cattle in Tasikmalaya, West Java. *Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(3): 413-417.

Indriani, D. O., Syamsudin, L. N. I., Wardhani, A. K., and Wardani, A. K. 2015. Inertase dari *Aspergillus niger* dengan Metode Solid State Fermentation dan Aplikasi di Industri Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 3(4): 1405-1411.

Iwai, Y., and Omura, S. 1982. Culture Conditions for Screening of New Antibiotics. *The Journal of Antibiotics*. 35 : 123-141.

Jones, E. G. 2000. Marine Fungi: Some Factors Influencing Biodiversity. *Fungal Diversity*. 4 : 53-73.

Karimela, E. J., Ijong, F. G., and Dien, H. A. 2017. Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang di Isolasi dari Ikan Asap Pinekuhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *J. Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia* 20(1): 188-198.

Khopkar, S. M. 2008. Konsep Dasar Kimia Analitik. *UI Press*. Jakarta.

Koes, Irianto. 20006. *Mikrobiologi*. Yrama Widya. Bandung.

Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., and Leito, I. 2015. Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-mass Spectrometry Methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*. 870(1): 29-44.

K*usumaningtyas*, E., Astuti E., dan Darmono. 2008. Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan Agar *Overlay* dalam Penentuan Senyawa Anti Kapang. *J. Ilmu Kefarmasian Indonesia* 6(2): 75-79.

Langford B., So M., Raybardhan S., Leung V., Westwood D., and MacFadden D.R. 2020. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*, 26(12): 1622.

Leifa, F., Pandey, A., and Soccol, C. R. 2001. Production of Flammulina Velutipes on Coffee Husk and Coffee Spent-Ground. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44 : 205-212.

Lima, R. D., and Borba, C. M. 2001. Viability, Morphological Characteristics and Dimorphic Ability of Fungi Preserved by Different Methods. *Revista Iberoamericana de Micología*. 18(4) : 191-196.

Lin, W., Brauers, G., Ebel, R., Wray, V., Berg, A., Sudarsono, and P. Proksch. 2003. Novel Chromone Derivatives from the Fungus *Aspergillus* Versicolor Isolated from the Marine Spons *Xestospongia exigua*. *J. Nat. Prod*. 66(1) : 57-61.

Makvandi, P., Wang, C. Y., Zare, E. N., Borzacchiello, A., Niu, L. N., and Tay, F. R. 2020. Metal-Based Nanomaterials in Biomedical Applications: Antimicrobial Activity and Cytotoxicity Aspects. *Advanced Functional Materials*. 30(22) : 1910021.

Mangurana, W. O. I., Yusnaini, Y., and Sahidin, S. 2019. Analisis LC-MS/MS (*Liquid Crhomatogaph 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): 131-141.

Manoharachary C., dan Nagaraju D. 2016. Endrophytic Hyphomycetous Fungi Associated with Some Medicinal Plants from Telangana state, India. *Indian Phytopathlogoy*, 69: 169-172.

Martunus, and Helwani, Z. 2004. Ekstraksi Senyawa Aromatik dari Heavy Gas Oil HCO) dengan Pelarut Dietilen Glikol (DEG). *J. Si. Tek*. Vol. 4(2):34-64.

Meyers, C. L. F., and Meyers, D. J. 2008. Thin Layer Chromatography. *Currebt Protocols in Nucleice Acid Chemistry*. 34(1): A-3D.

Murniasih, T. 2003. Metabolit Sekunder dari Spons Sebagai Bahan Obat-Obatan. *Oseana*. 28(3): 27-33.

Murti, P.D., and Radjasa, O. K. 2012. Antibacterial Activity of Bacterial Symbiont of Soft. *J. Coast Develpopment*. 15(3): 297–302.

Najib, A. 2018. *Ekstraksi Senyawa Bahan Alam*. Deepublish. Yogyakarta.

Nuraini, F. 2020. *Bioaktifitas Senyawa Metabolit Sekunder Fungi Terhadap Pseudomonas aeruginosa*. (Skripsi). Jurusan Kimia Universitas Lampung. Lampung.

Nurul, A. 2019. *Isolasi Jamur dari Spon Laut Callyspongia sp. dan Uji Aktivitas Antimikroba*. (Disertasi). Universitas Andalas. Makassar.

Prashanth, K.N., and Basaviah, K. 2014. Quantitative Spectophotometric Determination of Propranolol Hydrochloride in Pharmaceuticals using Cerium (IV) sulphate as Oxidimetric Pereaksit. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section A-Physical Sciences. (84)1: 27-35*

Pasamba, E.M., Demigillo, R.M., and Lee, A.C. 2007. Antibiograms of pink pigmented facultative methylotrophic bacterial isolates from various sources. *Philipp Science*. 44: 47-56.

Pat O'Reilly. 2011. *Fascinated by fungi*. First Nature. London. UK.

Peay, K. G., Kennedy, P. G., and Bruns, T. D. 2008. Fungal Community Ecology: a Hybrid Beast with a Molecular Master. *Bioscience*. 58(9): 799-810.

Pratiwi, P., Fathoni, A., Efendi, O., and Agusta, A. 2019. Antioxidant, Antibacterial Activity and GC-MS Analysis of Extract of Giant Forest Ant Dinomyrmex gigas (Latreille, 1802). *J. Biodjati*. 4(2): 263-277.

Pratiwi, S.T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga Medical Series. Jakarta.

Proksch, P., Edrada, R. A., and Ebel, R. 2002. Drugs from the Seas-Current Status and Microbiological Implications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 59(2-3): 125-34.

Prosser J.L., and Though AJ. 1991. Growth Mechanisms and Grow the Kinetics of Filamentous Microorganism. *Crit. Rev. Biotechnol*. 10: 253-274.

Putri, W. S., Warditiani, N. K., and Larasanty, L. P. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*). *Jurnal Farmasi Udayana*. Des. 2013. ISSN 2622-4607.

Raal, A., Meos, A., Hinrikus, T., heinamaki, J., Romane, E., Gudiene,V., Jakstas, V., Koshovyi, O., Kovaleva, A., Fursenco, C., Chiru, T., and Nguyen, H. T. 2020. Dragendroff's Pereaksit: Historical Perspectives and Current Status of A Versatile Pereaksit Introduced Over 150 Years Ago at the University of Dorpat, Tartu, Estonia. *Pharmazie*. 75(7): 299-306.

Raghukumar, C. Ed. 2012. *Biology of Marine Fungi*. Springer Science & Business Media.

Rahmi, Y., Darmawi, D., Abrar, M., Jamin, F., Fakhrurrazi, F., and Fahrimal, Y. 2015. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Preputium dan Vagina Kuda (*Equus callus*) (Identification of *Staphylococcus aureus* in Preputium and Vagina of Horses (*Equus caballus*)). *J. Medika Veterinaria*. 9: 154-158.

Robinson, T., Singh D., and Nigam, P. 2001. Solid-State Fermentation: a Promisingmicrobial Technology for Secondary Metabolite Production. *Appl Microbiol Biotech*. 55(3): 284-9.

Sabdono, A., and Radjasa, O. K. 2008. Microbial symbionts in marine sponges: Marine natural product factory. *J. Coast Dev*. 11(2): 57–61.

Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Deepublish. Yogyakarta.

Sari, R., Anita, C., Radji, M., and Malik, A. 2011. Bacteriocin Screening of Lactic Acid Bacteria Strains from Local Isolates of Genus Streptococcus and Weissella. *Indonesian J. Pharm Sci*. 9: 116-22.

Seidel, V. 2006. *Initial and bulk extraction Natural products isolation*. Springer, pp. 27-41.

Septiani, S., Dewi, E. N., and Wijayanti, I. 2017 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lamun (*Cymodocea rotundata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Antibacterial Activities of Seagrass Extracts (*Cymodocea rotundat*a) Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*). *Saintek Perikanan: Indonesian J. of Fisheries Science and Technology*. 13(1): 1-6.

Severin, J. A., Lestari, E. S., and Kuntaman, K. 2008. Antimicrobial Resistance in Indonesia, Prevalence and Prevention Study Group Unusually High Prevalence of Panton-Valentine Leukocidin Genes Among Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* Strains Carried in the Indonesian Population. *J Clin Microbiol*. 46: 1989- 95.

Shilmy, S. P. 2017. *Air Cucian Beras (Oryza sativa L.) Sebagai Media Agar Alternatif Pengganti PDA (Potato Dextrose Agar) Terhadap Pertumbuhan Jamur Candida albicans*. (Skripsi). Politeknik Surabaya. Surabaya.

Sibero, M. T., Aninditia, S., Olvi, C., Handung, C., Ocky, K. R., Agus, S., and Agus T. 2017. Isolation, Identification and Screening Antibacterial Activity from Marine Spons-Associated Fungi Against Multidrug Resistant (MDR) *Escherichia coli*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 55: 012-028.

Tabarez, M. R. 2005. *Discovery of the New Antimicrobial Compound 7-O-Malonyl Macrolactin*. (Disertasi). Universitas Carolo-Wilhelmina.

Tang, R., Kimishima, A., Ishida, R., Setiawan, A., and Arai, M. 2022. Similiarity Selective Cytotoxicity of Epidithiodiketopiperazine DC1149B, Produced by Marine-Derived *Trichoderma lixii* on the Cancer Cells Adapted. *J. Nat. Med*. 74: 153-158.

Tisch, D., and Schmoll, M. 2010. Light Regulation of Metabolic Pathways in Fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 85: 1259-1277.

Tobo, F. 2001. *Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I*. UNHAS. Makassar.

Tsuchiya, K., Nagashima, T., Yamamoto, Y., Gomi, K., Kitamoto, K., Kumagai, C., and Tamura, G. 1994. High Level Secretion of Calf Chymosin Using a Glucoamylase-Prochymosin Fusion Gene in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(5): 895-899.

Van Staa T.P. , Palin V., Li Yan., Welfare W., Felton T.W., and Dark, P. 2020. The Effectiveness of Frequent Antibiotic Use in Reducing the Risk of Infection-Related Hospital Admissions: Results from Two Large Population-Based Bohorts. *BMC Med*. 18: 40.

Varijakzhan, D., Loh, J. Y., Yap, W. S., Yusoff, K., Seboussi, R., Lim, S. H. E., Lai, K. S., and Chong, C. M. 2021. Bioactive Compounds from Marine Sponges: Fundamentals and Applications. *Marine* Drugs. 19(5): 256.

Vogeser, M., and Seger, C. 2008. A Decade of HPLC–MS/MS in the Routine Clinical Laboratory-Goals for Further Developments. *Clinical Biochemistry*. 41(9): 649-662.

Yasir, Y., Yuniati, Y., Paramita, S., Zubaidah, M., Mu'ti, A., and Danial, D. 2017. Analisis Bioautografi dengan Kromatografi Lapis Tipis pada Ekstrak Etanol Daun *Caesalpinia sumatrana roxb* Terhadap Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial. *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 1(7): 359-366.

Yeon-Ju, L., Jeong-Woo, L., Dong-Geun, L., Hyi-Seung, L., Jong, S.K., and Jien, Y. 2014. Cytotoxic Sesterpenoids Isolated from the Marine Spons *Scalarispongia sp*. *J. Molecular Science*. 11: 20045-20053.

Zhang, X., Mo, H., Zhang, J. A., and Li, Z. 2003. A Solid-State Bioreactor Coupled with Forced Aeration and Pressure Oscillation. *Biotechnology Letters*, 25(5): 417-420.

Zhang, H., Dong, M., Chen, J., and Wang Hong. 2017. Bioactive Secondary Metabolites from the Marine Sponge Genus Agelas. *Mar. Drugs*. 15(11): 351.

Zhang, Q. W., Lin, L. G., and Ye, W. C. 2018. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products: A Comprehensive Review. *Chinese Medicine*. United Kingdom. 13(1).

Znidarsic, P., and Pavko, A. 2001. The Morphology of Filamentous Fungi in Submerged Cultivations as a Bioprocess Parameter. *Food Terchnol Biotechnol.* 39: 237-252