

# Monograf

*by* Rollando S. Farm

---

**Submission date:** 17-Sep-2019 07:53PM (UTC-0700)

**Submission ID:** 1174862623

**File name:** Draf\_Monograf.docx (6.25M)

**Word count:** 14826

**Character count:** 93689

SENYAWA ANTIBAKTERI DARI FUNGI ENDOFIT

## **BABI**

### **PENDAHULUAN**

Dewasa ini jumlah penggunaan antibiotik dunia lebih dari 40.000 ton per tahun yaitu dalam industri kesehatan, pertanian, pakan peternakan, biokimia, pangan, genetika, dan biologi molekuler serta ada kecenderungan meningkat, Jumlah antibiotik yang banyak dan masing-masing memiliki sifat intrinsik yang berbeda akan menciptakan resistensi pada mikroba target sehingga antibiotik dapat memiliki efek terapi yang lemah bila diaplikasikan (Margino, 2008). Resistensi antibiotika merupakan permasalahan penting dalam bidang kesehatan.

Resistensi kuman terhadap antibiotik dapat menyulitkan dalam proses pengobatan penyakit; misalnya berkembang bakteri *Salmonella kentucky* dan *Salmonella typhimurium*. yang resisten terhadap sefalosporins (Mohamed dkk., 2014); bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap *methicillin* (Iwamoto dkk., 2013) atau resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik *gentamicin*, *tobramycin* dan *amikacin* (Ren dkk., 2012). Oleh karena itu, diperlukan cara untuk memperoleh antibiotik melalui eksplorasi bahan alam, sintesis kimia, dan penemuan mikroba penghasil antibiotik.

Menurut Dewoto (2001); Indonesia memiliki lebih kurang 30.000 spesies tumbuhan dan 5463 spesies merupakan tumbuhan berkhasiat obat yang dapat dijadikan sumber isolat jamur endofit, Salah satu tumbuhan berkhasiat obat yang

memiliki banyak manfaat misalnya tumbuhan jinten (*Coleus amboinicus* Lour). Hnllatti dan Bhattacharjee (2011) menyatakan rumbuhan jinten dapat digunakan sebagai obat infeksi saluran kemih, gangguan pencernaan, malaria, batuk, asma dan demam. Tanaman ini mengandung senyawa-senyawa yang berkhasiat antara lain karvakol, timol, eugenol (monoterpenoid), karyopilen (seskiterpen bisiklik), dan flavonoid (kuersetin, apigenin, luteolin, salvigenin, dan genwanin) (Narayanan dan Saktivel, 2011).

Mikroba endofit adalah organisme hidup yang berukuran mikroskopis yang hidup di dalam jaringan tanaman (Tanaka dkk., 1999). Fungi endofit merupakan fungi yang hidup secara internal dan berasosiasi di dalam jaringan tumbuhan tanpa menimbulkan gejala penyakit pada tumbuhan mangnya, Fungi endofit mempunyai hubungan mutualistik dengan tanaman inangnya yaitu proteksi terhadap herbivora, serangga dan patogen (Siegel dkk., 1990). Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya alkaloid, terpenoid, fenolik, dan sebagainya (Tall dan Zou, 2001).

Fungi endofit menghasilkan senyawa bioaktif misalnya senyawa antioksidan, antikanker, antibakteri, antivirus, antifungi dan sebagainya (Strobel, 2003). Fungi endofit dapat mampu menghasilkan senyawa yang sama dengan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan mangnya, walaupun hal ini jarang terjadi. Sebagai contoh adalah fungi endofit *Diaporthe phaseolorum* yang menghasilkan senyawa antibakteri, yaitu asam 3-hidroksi-propanoat yang dapat juga dihasilkan pada daun tumbuhan

inangnya yaitu *Lagunacularia racemosa* (Sebastianes dkk., 2012). Senyawa piperin yang aktif terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dihasilkan oleh fungi endofit *Periconia sp.* dan tumbuhan *Piper longum* Lour. sebagai tumbuhan inang (Verma dkk., 2011). Senyawa yang dihasilkan fungi endofit umumnya berbeda dengan senyawa yang dihasilkan oleh tumbuhan inangnya (Strobel dkk., 2004).

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **1. Tinjauan tentang tanaman jinten (*Coleus amboinicus* Leur.)**

##### a. Morfologi

Tanaman jinten merupakan herba tahunan. tanaman ini berbentuk perdu dengan batang tebal, lunak dan bercabang-cabang yang tingginya mencapai 1 meter. Batangnya beruas-ruas dan mas yang menyentuh tanah akan keluar akar. Dan ini tunggal dan tehal berdaging, letak berhadapan bertangkai bentuk budar telur ujung membulat dan tepinya bergerigi. Tulang daun nampak menonjol seperti jala, permukaannya berambut tebal, seperti beledu berwarna putih dengan panjang 5-7 cm, dan lebar 4-6 cm dan warnanya hijau muda, daunnya berbau harum jika dirangsang. Perbungaannya majemuk berupa tandan dengan panjang 20 cm keluar dari ujung percabangan, dan ketiak daun dengan warna merah keunguan. Bijinya keras gepeng dan berwarna coklat muda dikenal sebagai bangun-bangun, daun hati-hati, tramun, acerang, mahja merang dan iwak (Dalimartha, 2006).

##### b. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman jinten menurut Syamsuhidayat dan Hutapea (1999) adalah:

Divisi : Spermatophyta  
Sub Divisi : Angiospermae  
Kelas : Dicotyledonae  
Bangsa : Solanales  
Suku : Labiales  
Marga : *Coleus*  
Jenis : *Coleus amboinicus* Lour.

Sinonim: *C. aromaticus* BENTH. *Plectranthus aromaticus* ROXB (Heyne, 1987).

Gambar 1. Tanaman Jinten. (*Coleus (Labiata) Lour.*)  
Keterangan: Koleksi kebun obat Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma

a. Kandungan kimia daun jinten

Daun jinten mengandung banyak senyawa kimia antara lain golongan alkaloid, gula dan karbohidrat, glikosida, protein, asam amino, steroid, saponin, flavonoid, kuinon, tanin, senyawaan fenolik, dan terpenoid (Patel dkk., 2010).

Vijayafen (20B) meneliti bahwa daun jinten secara spesifik mengandung asam organik (asam klorogenat, asam kafeat, asam rosminat), polifenol, tanin, flavon dan flavonol. Asam organik merupakan cairan tanpa warna yang larut dalam air atau zat padat dengan titik leleh yang nisbi rendah, contohnya: asam maleat, asam klorogenat, asam kafeae, asam rosminat, asam asetat, asam benzoat, asam askorbat, asam formiat (Harborne, 1998).

Minyak atsiri merupakan minyak dari tanaman yang komponennya secara umum mudah menguap sehingga banyak yang merujuk sebagai minyak terbang. Minyak atsiri tersusun dari jalur biosintesis metabolit sekunder yaitu jalur asetat-mevalonat untuk golongan terpenoid dan jalur sikimat-fenilpropan untuk golongan aromatik (Dewick, 2011). Minyak atsiri daun jinten mengandung senyawa p-cimen, metil kavikol, timol, karvakol, o-kubeben,  $\alpha$ -karyopilen, trans-a-bergamot, n-bumulen,  $\gamma$ -gurjujen, e-kalakoren, karyopilen oksida,  $\alpha$ -korokalen,  $\beta$ -karyopilen; metil eugenol, terpinen,  $\alpha$ -sineol,  $\beta$ -pinen,  $\alpha$ -pinen (Joshi dkk., 2011; Selvakumar dkk., 2012).

Senyawa fenolik adalah senyawa aromatis dengan substituen gugus hidroksi, ada 2 bentuk senyawa fenolik yaitu monomer dan polimer. Dalam tumbuhan, senyawa fenolik banyak terdapat dalam bentuk polifenol. Polifenol merupakan metabolit sekunder tanaman tertentu dan merupakan metabolit sekunder tanaman tertentu dan merupakan penyusun golongan fenilpropanoid, kumarin, flavonoid; isoflavonoid, lignin, dan tanin. Daun jinten memiliki



senyawa polifenol meliputi asam kafeat, eriodiktiol, asam rosmarinat, asam kumarat, luteolin, krisoeriol dan kuersetin (El-hawary dkk., 2012).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang terdiri dari 15 atom karbon, terbagi atas 2 cincin benzen (C6) terikat pada rantai propana (C3) sehingga membentuk struktur C6~C3-C6. Senyawa flavonoid dapat menghasilkan 3 struktur senyawa yaitu flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid. Senyawa flavonoid pada daun jinten adalah flavon salvigenin, 6-metoksigenlwanin, kuersetin, krisoeriol, luteolin dan apigenin flavanon eriodisitol dan flavanol taksifolin (Nisak, 2013).

#### b. Efek farmakologi

Daun jinten secara tradisional sering digunakan sebagai obat sariawan, demam, asma, batuk, sakit kepala, reumatik, apendisitis dan perut kembung (Dalimartha, 2006). Uji aktivitas antioksidan in vitro terhadap superoksida menunjukkan bahwa ekstrak air daun jinten memiliki daya antioksidan yang sedang dengan nilai EC<sub>50</sub> sebesar 73,9 µg/ml (Kumaran dan Krunakaran 2007). Pemberian ekstrak air daun jinten pada tikus jantan dengan dosis 100 mg/kg berat badan selama 30 hari memiliki efek hepatoprotektif yang baik terhadap kerusakan hati akibat dosis tinggi (Vijayafeffi dkk., 2013).

Minyak atsiri daun jinten dilaporkan mempunyai daya antifungi yang tinggi terhadap *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus*, *Candida versatilis*, *Fusarium oxysporum*; *Penicillium sp.*; *Saccharomyces cerevisiae*

(Murthy dkk., 2009) dan daya antibakteri yang tinggi terhadap *Klebsiella pneumoniae* (Goncalves dkk., 2012). Ekstrak etanol dan air daun jinten mempengaruhi aktifitas diuretik dengan pemberian dosis 500 µg/kg dengan terbukti meningkatkan total volume urin dan konsentrasi elektrolit (Choudhery, 2009). Pemberian ekstrak air daun jinten secara oral dengan dosis 0,5 dan 1,0 g/kg berat badan selama 30 hari terbukti memiliki aktifitas antiurolitik melawan bakteri kalsium oksalat pada tikus albino betina (Ghosh dkk., 2000).

## 2. Tinjauan tentang mikroba endofit

Mikroba endofit adalah mikroba yang hidup di dalam jaringan tanaman pada periode tertentu dan mampu hidup dengan membentuk koloni dalam jaringan tanaman tanpa membahayakan inangnya (simbiosis mutualisme atau simbiosis komensalisme). Setiap tanaman tingkat tinggi dapat mengandung beberapa mikroba endofit yang mampu menghasilkan senyawa biologi atau metabolit sekunder yang diduga sebagai akibat koevolusi atau transfer genetik (*genetic recombination*) dari tanaman inangnya ke dalam mikroba endofit (Higginbotham dkk., 2013~ Stepniewska dan Kuzniar, 2013).

Kemampuan mikroba endofit memproduksi senyawa metabolit sekunder sesuai dengan tanaman inangnya merupakan peluang yang sangat besar dan dapat diandalkan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroba endofit yang diisolasi dari tanaman inangnya tersebut (Arnold dan Lutzoni, 2007). Tanaman

yang tumbuh di bumi mengandung satu atau lebih mikroba endofit yang terdiri dari bakteri dan jamur, sehingga apabila mikroba endofit yang diisolasi dari suatu tanaman obat dapat menghasilkan metabolit sekunder sama dengan tanaman aslinya atau bahkan dalam jumlah yang lebih tinggi, maka kita tidak perlu menebaag tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Higginbotham dkk., 20B) ..

Fungi endofit telah banyak berhasil diisolasi dari tanaman inangnya, dan telah dibiakkan dalam media perbenihan yang sesuai. Demikian pula metabolit sekunder yang diproduksi oleh mikroba endofit tersebut telah berhasil diisolasi dan dimurnikan serta telah dielusidasi struktur molekulnya, Sebagai contoh

fonsecinone A dan (R)-3-hydroxylmnanoll.itrile adalah antifungi dan antibakteri yang diisolasi dari fungi endofit *Aspergillus sp.* pada tumbuhan *Melaleuca leucadendron* yang efektif menghambat fungi fitopatogenik (*Gibberella saubineut*; *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* dan *Alternaria solani*) dengan rentang MIC sebesar 6.25-50 µM dan bakteri patogenik (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus*) dengan rentang WE sebesar 25-100 µg (Xiao dkk., 2014).

*Camptothecin* adalah senyawa inhibitor topoisomerase I yang dihasilkan oleh tumbuhan *Camptotheca acuminata*. Senyawa ini ternyata dapat diisolasi dari *Fusarium solani*, fungi endofit yang tumbuh pada tumbuhan *Camptotheca acuminata* (Pirttlii dan Frankl 2011). Khawaran dkk. (2009) menemukan senyawa

antibiotik *javonictn* dari fungi endofit *Chiondium sp.* yang juga dihasilkan oleh tumbuhan inangnya *Azadirachta indica*. Ratnaweera dkk. (2014) mengisolasi asam helvolae dari kultur fungi endofit *Xylaria sp.* yang terdapat pada *Anoectochilus setaceus*. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antibiotik dengan nilai **ME** sebesar  $2 \times 10^{-4}$  mg/ml, terhadap *Bacillus subtilis* dan nilai **WE** sebesar  $4 \times 10^{-4}$  mg/ml terhadap *Staphylococcus aureus*. *Cryptocandin* adalah antifungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporopsis quercina* yang berhasil di isolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berhasil sebagai antijamur yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton spp.* (Strobel, 2003)

## 1. Tinjauan tentang bakteri uji

Bakteri dapat digolongkan dalam dua golongan besar berdasarkan susunan dinding selnya yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Susunan dinding sel mempengaruhi kemampuan dalam menahan zat warna pertama dalam pewarnaan Gram. Bakteri Gram positif berwarna ungu karena mampu menahan zat warna kristal violet sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena menahan zat warna keduanya yaitu *safrantn* (Goldman dan Green, 2008).

### a. *Staphylococcus aureus*

*Saureus* merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk bulat dengan diameter  $0,8-1,0 \mu\text{m}$  dan tersusun bergerombol tidak beraturan, kadang-kadang seperti untaian bUM menggantung, tidak dapat bergerak dan tergolong bakteri aerob

sampai anaerob fakultatif, *S. aureus* merupakan mikroorganisme yang normal ada di kulit, hidung, tenggorokan dan saluran pencernaan manusia. Bakteri ini banyak dijumpai pada selaput hidung, kulit dan kantung rambut (Krieg dkk., 2011).

*Saureus* menghasilkan enzim katalase. Hal ini yang membedakannya dengan "*Streptococcus*" Bakteri ini merupakan kelompok bakteri yang dapat meragi karbohidrat (antara lain manitol) dan menghasilkan asam laktat sehingga dapat diidentifikasi salah satunya dengan media *Mannitol Salt Agar* dan tumbuh dengan cepat pada suhu 37°C. *S aureus* dapat bertahan pada kondisi kering, panas pada suhu 50°C selama 30 menit dan dalam larutan NaCl 9 %. Koloni yang terbentuk pada media sederhana padat berbentuk bulat dengan diameter 1-2 mm, warna putih hingga kuning emas, tepi utuh, kenaikan permukaan melengkung dan tekstur halus, basah dan *opaque* (peacock, 2006).

Menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition* volume empat (Krieg dkk, 2011) klasifikasi *S aureus* adalah sebagai berikut;

Kerajaan : Monera  
Divisi : Firmicutes  
Kelas : Firmibacteria  
Bangsa : Eubacteriales  
Suku : Micrococcaceae  
Marga : *Staphylococcus*

Jenis : *Staphylococcus aureus*

*Saureus* mengeluarkan enterotoksin pada makanan yang berprotein tinggi, Enterotoksin ini bersifat termostabil, tahan terhadap aktivitas pemecahan oleh enzim-eneim pencernaan dan relatif tahan terhadap pengeringan, Patogenitas *S,aureus* merupakan efek gabungan dad berbagai macam metabolit yang dihasilkannya. Setiap jaringan atau organ. tubuh dapat diinfeksi oleh *Staphylococcus* dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda yang khas yaitu peradangan setempat nekrosis dan pembentukan abses. *Surureus* ada lan patogen utama pada manusia karena mersyebabkan keracunan makanan dan infeksi kulit, Infeksi lokal pada kulit dapat berupa jerawat, infeksi folikel rambut amu. abses Jika *Staphylococcus* menyebar dan terjadi bakteremia, maka dapat terjadi endokarditis, osteomielitis, meningitis atau infeksi paru-paru (Brooks dkk., 2007).

b. *Escherichia coli*

*Ecoli* merupakan golongan bakteri Gram negatif yang termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini berbentuk batang dengan susunan sel tunggal, ukuran panjang sel sekitar 2 um dan diameter 0,5 um, Hidup pada suhu 20-40 °C dan suhu optimumnya 37 OC. *Ecolt* merupakan bakteri patogen yang banyak ditemukan pada usus besar manusia dan berfungsi dalam pembusukan sisa makanan (Holt, 1994). Snal biokimia. *Ecob* antara lain dapat

memfermentasi beberapa karbohid:rat seperti laktosa, sukrosa dan manitol, menghasilkan indol dan bersifat motil (Gillespie dan Hawkey; 20(6)).

*Ecoli* dapat menyebabkan diare karena menghasilkan enteroksin yang dikenai dengan nama Entero Toksigenik *Escherichia coli* (ETEC) dan mempunyai kemampuan masuk epitel usus yang disebut Entero Invasif *Escherichia coli* (EIEC). Bila bakteri ini berada dalam jaringan pam, saluran empedu, saluran kencing, peritoneum dan selaput otak akan bersifat patogenik .. Bakteri ini diekskresikan dalam feses dan dapat menyebabkan kontaminasi lingkungan termasuk tanah (Brooks dkk., 2007). Oleh karena itu bakteri ini digunakan sebagai salah satu indikator kebersihan air terutama untuk air minum (Gleeson dan Gray" 2002)..

Menunn *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition* volume empat (Krieg d14:."2011), klasifikasi *Ecoli* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Monera
Divisi	: Schizomycota
Kelas	: Schizomycetes
Bangsa	: Eubacteriales
Suku	: Enterobacteriaceae
Marga	: <i>Escherichia</i>
Jenis	: <i>Escherichia coli</i>

c. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* adalah bakteri Gram positif aerobik berbentuk batang dan dapat membentuk endospore. Genus *Bacillus* mayoritas bersifat mesofil dengan suhu pertumbuhan optimum pada 30-40 °C) beberapa bersifat termofil (suhu optimum 65°C) dan sisanya merupakan *psychrophile* sejati (mampu tumbuh pada suhu 0 °C), *Bsubtilis* dapat tumbuh pada pH asam sampai basa yaitu sekitar pH 2-11 (Todar, 2006).

*Bsubtilis* memiliki struktur dinding sel yang kaku. Dinding sel tersusun atas peptidoglikan polimer gula dan asam amino. Peptidoglikan yang ditemukan pada bakteri dikenal sebagai murein. Murein tersusun atas asam teikoat, lipoteikoat, dan protein. Dinding sel digunakan sebagai barrier antara lingkungan dan sel bakteri, Dinding sel bertanggung jawab untuk membenmk sel bakteri dan melindungi sel dari tekanan yang tinggi (Graumann, 2012)-

Menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition* volume empat (Krieg dkk, 2011), klasifikasi *B.subtilis* adalah sebagai berikut;

- Kerajaan : Monera.
- Divisi : Firmicutes
- Kelas : Bacilli
- Bangsa : Bacillales
- Suku : Bacillaceae
- Marga : *Bacillus*



Jenis : *Bacillus subtilis*

d. *Salmonella thypi*

*Salmonella thypi* termasuk bakteri Gram negatif, berbentuk batang dan bersifat patogenik. *S.thypi* mempunyai dua membran (outer dan inner membran), periplasma dan rantai lipopolisakarida yang tersusun atas e-d-galaktosil, o-d-manosil dan rhamosil yang tersusun secara beringkang dan mempunyai residu 3,6-dideoksiheksosa (Contreras dkk., 1997).

*S.thypi* mempunyai sistem pengaturan yang kompleks, sebagaimana dapat memediasi respon untuk perubahan lingkungan eksternal. Faktor sigma, yang merupakan regulator umum yang terdiri dari RNA polimerase yang spesifik. Beberapa faktor sigma langsung mengalami transkripsi untuk memproduksi protein apabila ada perubahan lingkungan yang ekstrem, RNA polimerase S diproduksi sebagai respon adanya perubahan pH dan temperatur sekaligus juga meregulasi ekspresi dari 50 protein dalam proses virulensi plasmid (Contreras dkk. 1997).

Menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition* volume empat (Krieg dkk., 2011), klasifikasi *S.thypi* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Monera  
Divisi : Proteobacteria  
Kelas : Gamma Proteobacteria  
Bangsa : Enterobacteriales

Suku : Enterobacteriaceae

Marga : *Salmonella*

Jenis : *Salmonella thypi*

e. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang pendek dengan ukuran lebar 0,5-0,8 μm dengan panjang 1,5-3,0 μm, dan mempunyai flagela untuk bergerak, *P.aeruginosa* mempunyai 2 tipe pigmen yaitu .pyoverdin atau pigmen fluoresensi yang berwarna hijau dan pyocyanin yang berwarna biru (Todar, 2006).

Bakteri ini umumnya ditemukan dalam biofilm, menyerang permukaan atau substrat dalam bentuk planktonik. *P.aeruginosa* adalah bakteri aerob oMmgatyang tumbuh optima] pada suhu 37 °C dan dapat beradaptasi pada suhu tinggi (42 °C), resisten terhadap beberapa jenis antibiotik, garam kadar tinggi dan antiseptik, *P.aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik yang banyak ditemukan pada pasien dengan komplikasi pasien *cystic fibrosis* (Haldan dkk., 2014) pasien kanker; dan luka bakar (pace dkk, 2(05),

Memn *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edmon* volume empat (Krieg dkk., 2011), klasifikasi *P.aerugtnosa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Monera

Divisi : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria  
Bangsa ::Pseudomonadales  
Suku : Pseudomonadaceae  
Marga : *Pseudomonas*  
Jenis : *Pseudomonas aeruginosa*

f *Streptococcus mutans*

*Streptococcus mutans* merupakan bakteri Gram positif; non-mosil, dan bersifat anaerob (Kayser dan Bienz 201m). Bakteri ini tennasuk dalam kelompok *Streptococcus* hemolitik alfa ataa disebut juga *Streptococcus viridians* karena dapat menimbulkan hemolisis se] darah merah yang berakibat pemudaran warna hijau kecoklatan disekitar koloni, Pemudaran wama hijau disebabkan pembentukan produk hemoglobin. (Hadioetomo, E990). Dinding sel bakteri terdiri darj protein, karbohidrat, dan peptidoglikan. Bakteri ini tumbuh dengan baik pada suhu 37°C (Bonang dan Kceswardouo, 1982).

Bakteri *S. mutans* menjadi penyebab utama dalam karies gigi (Bonang dan Koeswardono 1982). Bakteri *Smsuans* mensekresi glukosiltransferase ekserasel, yang disebut dekstransukrase, yang mengubah sukrosa membentuk polimer glukosa tidak larut (glukan). Glnkan melekat erat pada permukaan gigi dan pada bakteri, sehingga *Smutans* menempel kuat pada permokaan gigi, Selama menempel pada permukaan gigi, *Srnutans* melakukan fermentasi fruktosa yang sudan didegradasi dari sukrosa membentuk asam laktat. Asam

laktat ini menyebabkan demineralisasi dan pembusukan gigi sehingga menjadi karies gigi (Kayser dan Bienz, 20 [1]).

Menurut Garrity dkk.. (2007) kffiasifikasi *Strnutans* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Monera  
Divisi : Firmicutes  
Kelas : Bacili  
Bangsa : Lactobacilalles  
Suku : Streptococcaceae  
Marga : *Streptococcus*  
Jenis : *Streptococcus mutons*

## 2. Tinjauan tentang fermentasi

Fermentasi merupakan proses pengembangbiakan mikroorganisme dalam skala besar, produk yang diperoleh adalah metabolit sekunder seperti antibiotik, vitamin dan lain-lain (El-Mansi dkk. 2012) Stanbury dkk., ([.999) menyatakan bahwa ferrnentasi dapat menghasilkan biomassa (sel-selmikroba), enzim (amilase dan protease), metabolit primer mikroba (polisakarida, protein, dan asans nukleat, metabohn primer mikroba (antilbiotik dan vitamin), biokonversi (konversi asam asetat dan etanol), Faktoe-faktor yang perlu diperhatikan dalam proses fermentasi adalah kecepatan aerasi, jumlah karbon dan nutrisi lain yang disesuaikan

komposisinya dengan mikroba dan produk yang diinginkan. toksin, perubahan pH selama fermentasi, busa yang timbul (McNeil dan Harvey. 2008).

Teknik fermentasi ada 3 model yaitu *batch culture*, *fed batch culture*, dan *continous culture* (Kulandaivelu dan Janarthanan, 2012). Sistem *batch* adalah sistem yang paling sederhana dan sering digunakan dilaboratorium untuk mendapatkan produk sel atau metabolitnya. Fermentasi sistem *batch* adalah sistem tertutup, artinya semua nutrisi yang diperlukan oleh mikroba selama pertumbuhan dan pembentukan produk berada didalam satu fermentor. Tidak ada penambahan bahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung. Keuntungan sistem ini adalah mudah, sederhana dan kecil kemungkinan adanya kontaminasi. Kerugiannya adalah kultur mikroba menua, yaitu tidak ada perbaruan pertumbuhan mikroba, pembentukan metabolit toksik yang bercampur dengan produk, konsentrasi substrat terbatas, dan sukar diaplikasikan dalam skala besar (Stanbury dkk., 1999; Kulandaivelu dan Janarthanan, 2012).

Sistem *fed batch* tidak tertutup seperti halnya sistem *batch*. Selama fermentasi, substrat, nutrisi, *inducer*, dapat ditambahkan dalam fermentor. Sistem *fed batch* dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu sistem dengan volume tetap dan sistem dengan volume berubah. Sistem dengan volume tetap berarti setiap ada penambahan medium baru kedalam fermentor, ada medium lama, produk, atau sel yang dikeluarkan sebanyak medium baru yang ditambahkan dalam fermentor. Sistem dengan volume berubah, kedalam fermentor ditambah medium baru tetapi

tidak ada medium lama yang dikeluarkan dari dalam fermentor (Stanbury dkk., 1999; Kulandaivelu dan Jansrathanan, 2012),

Sistem *cominuous* adalah sistem *batch* yang fase eksponensialnya diperpanjang, dengan menjaga fluktuasi nutrisi dan jumlah biomassa. Mikroba diberi nutrisi atau medium segar, Sementara itu sejumlah sel atau medium dikeluarkan dari sistem dengan kecepatan yang sama, Hal ini menjamin tingkat kestabilan dan faktor-faktor seperti volume kultur, biomassa, konsentrasi produk dan substrat pH suhu dan oksigen terlarut (Stanbury dkk. 1999; Kulandaivelu dan Janartbanan, 2012). Keuntungan dalam sistem ini adalah mempunyai produktivitas dan kecepatan pertumbuhan dapat dioptimalkan, proses dalam waktu yang lama dapat dijalankan, dapat digunakan mode sel amobil, faktor fisis dan lingkungan mudah dianalisis. Kerugiannya adalah resiko kontaminasi besar, produk yang belum optimal terbentuk, mudah terjadi perubahan mutasi pada mikroba (McNeil dan Harvey; 2008).

### 3. Tinjauan tentang antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menekan pertumbuhan atau reproduksi bahkan membunuh bakteri, Antibakteri terbagi atas dua berdasarkan mekanismenya, yaitu bakteriostatika yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisida yang bersifat membunuh bakteri (Guilfoile dan Alcarno, 2007). Antibakteri dapat memiliki aktivitas bakteriostatika menjadi aktivitas bakterisida

apabila kadarnya ditingkatkan melebihi kadar hamoar minimal (KHM) (Setiabudy dan Gall, 1995).

Target mekanisme antibakteri adalah sebagai berikut:

a. Perusakan dinding sel

Struktur sel dirusak dengan menghambat pada saat pembentukan atau setelah proses pembentukan dinding sel, Seperti antibiotika penisilin yang menghambat pembentukan dinding sel dengan cara menghambat pembentukan mukopeptida yang diperlukan untuk sintesis dinding sel mikroba (Setiabudy dan Gan 1995).

b. Perubahan permeabilitas sel

Kerusakan pada membran sitoplasma akan menghambat pertumbuhan sel, karena membran sitoplasma berfungsi mempertahankan bagian-bagian tertentu dalam sel serta mengatur aktivitas difusi bahan-bahan penting, dan membenmk integritas komponen seluler (Kayser dan Bienz, 2011b)

c. Penghambatan kerja enzim

Penghambatan enzim akan menyebabkan aktivitas selular tidak berjalan normal, Seperti sulfonamid yang bekerja dengan bersaing dengan PABA, sehingga dapat menghalangi sintesis asam folat yang merupakan asam amino esensial yang berfungsi dalam sintesis purin dan pirimidin (Kayser dan Bienz, 2011).

d. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

DNA dan RNA yang mempunyai peran yang sangat penting sebagai bahan baku pembentuk sel bakteri, Penghambatan DNA dan RNA akan mengakibatkan kerusakan pada sel (Brooks dkk., 2007).

e. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Suatu sel hidup tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu antibakteri dapat mengubah keadaan ini dengan mendenaturasi protein dan asam nukleat sehingga merusak sel secara permanen (Kayser dan Bienz, 2001).

4., **Tinjauan** tentang uji aktivitas antibakteri

Aktivitas antibakteri senyawa dapat diuji dengan menggunakan metode dilusi dan difusi,

a. Metode dilusi

Metode ini adalah metode untuk menguji daya antibakteri berdasarkan penghambatan pertumbuhan mikroorganisme pada media cair setelah diberi zat antimikroba atau pada media padat yang dicairkan setelah dicampur dengan zat antimikroba dengan pengamatan pada dilusi cair dilihat kekeruhannya dan pada dilusi padat dengan pengamatan pada konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Biasanya metode ini digunakan untuk zat antimikroba yang dapat larut sempurna (Denyer dkk., 2011).



#### h. Metode difusi

Metode ini adalah suatu metode untuk menguji daya antimikroba berdasarkan berdifusinya zat antimikroba dalam media padat dengan pengamatan pada daerah pertumbuhan. Biasanya metode ini digunakan untuk menguji zat antimikroba yang larut dan tidak larut. Metode difusi berdasarkan pencadangnya terdiri atas metode difusi dengan sumbu, metode difusi dengan silinder/cakram dan metode dengan parit (Denyer dkk., 2011).

*Disk Diffusion* (Kirby-Bauer *test*) dilakukan dengan cara meletakkan piringan (*disk*) yang mengandung senyawa antimikroba pada permukaan media terinokulasi mikroba uji. Selama inkubasi, senyawa antimikroba tersebut akan berdifusi ke dalam media agar. Kecepatan difusi melewati media agar tidak secepat ekstraksi senyawa antimikroba dari *disk*. Oleh karena itu, konsentrasi senyawa antimikroba terbesar adalah yang paling dekat dengan *disk* dan berkurang secara logaritmik dengan bertambahnya jarak dari *disk* (Hudziki, 2009). Efektifitas senyawa antimikroba ditandai dengan adanya zona hambat yang terbentuk disekeliling *disk* setelah inkubasi. Semakin luas zona hambatnya semakin sensitif senyawa tersebut (Tortora dkk., 2010).

Metode difusi dilakukan dengan melubangi media yang telah diinokulasi dengan perforator dan zat uji diletakkan didalamnya. Metode difusi parit adalah metode dengan membuat parit sepanjang diameter media padat dan zat uji diletakkan pada parit tersebut kemudian diinokulasi dengan bakteri pada bagian

kiri dan kanan parit, metode ini digunakan untuk sediaan uji dalam bentuk krim atau salep (Denyer dkk., 2011).

## 7. Tinjauan tentang kromatografi

Kromatografi lapis tipis (KLT) merupakan salah satu bentuk kromatografi planar, Berbeda dengan kromatografi kolom yang mana fase diamnya diisikan atau dikemas di dalamnya, pada kromatografi lapis tipis, fase diamnya merupakan lapisan yang seragam (*uniform*) pada permukaan bidang datar yang berfungsi sebagai penyangga lapisan tersebut, Meskipun tampak berbeda dengan kromatografi kolom, kromatografi planar ini dapat dikatakan sebagai bentuk terbuka dari kromatografi kolom (Gandjar dan Rohman, 2007).

Kromatografi lapis tipis merupakan suatu teknik pemisahan yang menggunakan fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*), Fase diam pada KLT dapat berupa serbuk halus yang berfungsi sebagai permukaan penjerab atau berfungsi sebagai penyangga untuk lapisan zat cair. Pada penggunaannya, silika gel (asam silika) alumina (aluminium oksida) selulosa, dan kieselgur (tanah diatom) biasa digunakan sebagai fase diamnya, Pemilihan fase gerak pada KLT dapat didasarkan pada pustaka yang ada atau dari hasil percobaan dengan variasi tingkat kepolaran (Harwood dan Moody, 1989; Heftmann, 2004)" Pada umumnya, kromatografi lapis tipis secara luas digunakan untuk dua tujuan, pertama sebagai metode untuk mencapai hasil kualitatif, kuantitatif, dan preparatif;

kedua digunakan untuk menentukan kondisi yang sesuai untuk pemisahan pada kromatografi kolom ataupun kromatografi cair kinerja tinggi (Gandjar dan Rohman, 20(7)).

Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk analisis kualitatif terhadap suani senyawa. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai  $R_f$ . Nilai  $R_f$  (*Retardation factor*) merupakan nilai diperoleh dengan membandingkan jarak yang ditempuh oleh bercak senyawa yang diidentifikasi dengan jarak yang ditempuh oleh pelarut (jarak pengembang). Dua senyawa dikatakan identik apabila mempunyai nilai  $R_f$  yang sama jika diukur pada kondisi KLT yang sama (Heftmana, 2004).

KLT preparatif adalah metode pemisahan menggunakan fase diam yang tebal (ketebalan sampai 1 mm) (Kowalska dan Sherma, 2006). Penotolan cuplikan dilakukan dengan melarutkan cuplikan dalam sedikit pelarut, Cuplikan ditotolkan berupa pita dengan jarak sesempit mungkin karena pemisahan tergantung pada lebar pita. Penotolan dapat dilakukan dengan pipet tetapi lebih baik dengan penotol otomatis. Pelarut yang baik untuk melarutkan cuplikan adalah pelarut yang menguap, Pengembangan plat KLT preparatif dilakukan dalam bejana kaca yang dapat menampung beberapa plat. Bejana dijaga tetap jenuh dengan pelarut pengembang dengan bantuan kertas saring yang ditetakkan berdiri disekeliling permukaan bagian dalam bejana (Hostettmann dkk., 1998).

Plat KLT Preparatif yang telah dielusi, pita yang kedudukannya telah diketahui dikerok dari plat Selanjutnya senyawa harus diekstraksi dari adsorben dengan pelarut yang sesuai (5 ml pelarut untuk 1 gram adsorben), Harus diperhatikan bahwa makin lama senyawa kontak dengan adsorben, maka makin besar kemungkinan senyawa tersebut mengalami peruraian. Selanjutnya ekstrak yang diperoleh disaring menggunakan corong atau menggunakan membran (Hosteumann dkk., 1998).

## 8. Tinjauan tentang identifikasi senyawa aktif

### a. Spektrofotometri inframerah (IR)

Spektrofotometri inframerah merupakan salah satu jenis spektroskopi yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis ikatan yang terdapat dalam suatu senyawa. Hila radiasi elektromagnetik yang berkisar antara 400  $\text{cm}^{-1}$  dan 4.000  $\text{cm}^{-1}$  (2.500 dan 20.000  $\text{nm}^{-1}$ ) dilewatkan pada suatu sampel dan diserap oleh

ikatan-ikatan molekul di dalam sampel masing-molekul tersebut dapat mengalami peregangan ataupun penekukan ikatan (Winny, 20(9)). Semua ikatan kimia mempunyai panjang gelombang radiasi yang berbeda-beda untuk menghaslkan ikatan yang meregang ataupun menekuk, Bila frekuensi energi elektromagnetik inframerah yang dilewatkan pada suatu molekul sama dengan frekuensi meregang atau menekuk ikatan, maka energi tersebut akan diserap oleh molekul tersebut, Serapan inilah yang kemudian dapat direkam oleh

detektor dan diubah menjadi pita serapan pada bilangan gelombang tertentu yang akan mencerminkan gugus fungsional suatu senyawa (Atkins dkk., 2003).

#### b. Spektroskopi massa

Spektroskopi massa merupakan salah satu jenis spektroskopi yang digunakan untuk menentukan massa dan juga berat molekul suatu senyawa. Untuk mendapatkan informasi yang mungkin mengenai struktur suatu senyawa, dapat dilakukan dengan mengukur massa dari fragmen-fragmen yang terbentuk ketika molekul mengalami pemecahan (Hoffmann dan Stroobant, 2013). Pada saat sebuah molekul organik ditabrak dengan elektron berenergi tinggi, menyebabkan terjadinya pelepasan sebuah elektron dari molekul tersebut, sehingga terbentuk suatu ion molekul. Ion yang dihasilkan tersebut bersifat tak stabil dan akan pecah menjadi fragmen tertentu, baik dalam bentuk radikal bebas maupun ion. Dalam sebuah spektrometri massa yang khas, fragmen yang bermuatan positif ini akan dideteksi dan dilaporkan dalam bentuk spektra massa. Spektra massa adalah alir kelimpahan (jumlah relatif fragmen bermuatan positif berlainan) versus nisbah massa/muatan ( $m/e$  atau  $m/z$ ) dari fragmen-fragmen yang ada (Becker, 2008).

Kromatografi gas merupakan suatu metode yang dapat digunakan untuk memisahkan dan mendeteksi senyawa-senyawa yang mudah menguap dalam suatu campuran. Prinsip pemisahannya didasarkan pada sifat-sifat yang mudah menguap (stabil terhadap panas) bermigrasi melalui kolom yang mengandung

fase diam dengan suatu kecepatan yang tergantung pada rasio distribusinya (Gandjar dan Rohman, 2007).

Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) merupakan salah satu metode fisikokimia berdasarkan pada teknik kromatografi di mana fase gerakanya berupa cairan dan fase diam dapat dalam bentuk cair atau padat. Titik beratnya adalah untuk analisis senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi, yang tidak bisa dianalisis dengan metode kromatografi gas, Senyawa yang dapat dianalisis dengan KCKT mulai dari senyawa ion anorganik sampai senyawa organik makromolekul (Gandjar dan Rohman 2007).

Metode kromatografi gas dan KCKT dapat digabungkan dengan spektroskopi massa (GC-MS/KCKT-MS), secara prinsip akan terjadi proses pemisahan oleh kromatografi gas atau KCKT terlebih dahulu yang dilanjutkan proses identifikasi oleh spektroskopi massa, GC-MS dan KCKT-MS merupakan metode yang peka dan spesifik dalam penentuan hampir semua jenis analit dengan batas deteksi yang rendah, dan memberikan informasi penting berupa spektra Massa dari suatu senyawa organik (McLafferty, 1993; Gandjar dan Rohman, 2007; Krajdik, 2008).

c. Spektrometri resonansi magnetik inti (NMR)

Sesuai dengan namanya, NMR (*Nuclear Magnetic Resonances*, spektroskopi NMR berhubungan dengan sifat magnet dari inti atom.

Spektrometri NMR pada dasarnya merupakan spektrometri absorpsi, sebagaimana spektrometri infra merah maupun ultraviolet. Pada kondisi yang sesuai, suatu sampel dapat mengabsorpsi radiasi elektromagnetik daerah frekuensi radio, pada frekuensi yang tergantung pada sifat-sifat sampel. Suatu plot dari frekuensi puncak-puncak absorpsi versus intensitas puncak memberikan suatu spektrum NMR (Kemp, 1975; Mohan, 2004).

Spektroskopi NMR proton (<sup>1</sup>H-NMR) merupakan sarana untuk menentukan struktur senyawa organik dengan mengukur momen magnet atom hidrogen. Pada kebanyakan senyawa atom hidrogen terikat pada gugus yang berlainan (seperti -CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>3</sub>-, -CHO, -N, -CHOH-) dan spektrum NMR proton merupakan rekaman sejumlah atom hidrogen yang berada dalam lingkungan yang berlainan (Winny, 2009),

Spektroskopi NMR dapat digunakan sebagai alat sidik jari dan juga memberikan keterangan tentang jumlah setiap tipe hidrogen. Spektroskopi NMR juga memberikan keterangan tentang sifat lingkungan dari setiap atom hidrogen tersebut. Kegunaan yang besar dari resonansi magnet inti adalah karena tidak setiap proton dalam molekul beresonansi pada frekuensi yang identik sama, ini disebabkan oleh kenyataan bahwa berbagai proton dalam molekul dikelilingi elektron dan menunjukkan sedikit perbedaan lingkungan elektronik dari 1 proton ke proton lainnya. Proton-proton dilindungi oleh elektron-elektron disekelilingnya (Atldersoll, 2004; Pavia dick, 2014).

Spektrum NMR tidak hanya dapat membedakan beberapa banyak proton yang berbeda dalam molekul, tetapi juga mengungkapkan berapa banyak setiap tipe proton berbeda yang terkandung dalam molekulnya. Pada spektrometri NMR integrasi sangat penting. Harga integrasi menunjukkan daerah atau luas puncak dari tiap-tiap proton. Sedangkan luas daerah atau luas puncak tersebut sesuai dengan jumlah proton. Dengan demikian perbandingan harga integrasi proton sama dengan perbandingan jumlah proton dalam molekul (Vlm.nny, 2009),

Spektroskopi NMR karbon ( $^{13}\text{C}$ -NMR) adalah aplikasi spektroskopi NMR khusus atom karbon,  $^{13}\text{C}$ -NMR analog dengan  $^1\text{H}$ -NMR dan memungkinkan identifikasi atom karbon dalam molekul organik.  $^{13}\text{C}$ -NMR adalah instrumen penting untuk elucidasi struktur kimia dalam bidang kimia organik,  $^{13}\text{C}$ -NMR hanya mendeteksi isotop  $^{13}\text{C}$  yang keberadaannya di alam hanya 1,1%. karena isotop utama  $^{12}\text{C}$  tidak terdeteksi oleh NMR (Breitmaier dan Voelter, 1987).

Pergeseran kimia  $^{13}\text{C}$  antara 0 sampai dengan 230 ppm yang terbagi atas  $\text{sp}^3$  antara 0--60; alkohol 60-80 ppm  $\text{sp}$  antara 70-80 ppm,  $\text{sp}^2$  antara 100- 160 ppm, gugus karbonil dari gugus karboksilat, ester, lakton, amida, anhidrida, antara 160-180 ppm sedangkan aldehid antara 180-200 ppm dan keton antara 190-230 ppm. Bentuk sinyal dari gugus metil ( $\text{CH}_3$ ) berbentuk kuartet, metilen ( $\text{CH}_2$ ) berbentuk triplet; metin berbentuk doublet sedangkan karbon kuaterner berbentuk singlet (Santoni; 2009).



DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) dapat membedakan signal karbon metil, metilen, metin dan karbon quarterner, Karbon metil dan metin menunjuk ke atas, karbon metilen ke bawah dan karbon quarterner hilang, Spektroskopi NMR DEPT memiliki 3 sub-spektrum yang berbeda: 45 MHz, 90 MHz dan 135 MHz. Pada DEPT-45 akan menunjukkan seluruh puncak atom karbon yang mengemban proton (hidrogen), Pada DEPT-90 puncak yang ditunjukkan hanya untuk atom karbon gugus metin (CH). Sementara pada DEPT-135 karbon metin dan metil memberikan puncak keatas (*positive peaks*) sedangkan karbon metilen puncakanya mengarah kebawah (Pavia dkk, 2014).

#### 9'. Tinjauan tentang penambatan molekul

Penambatan molekul (*molecular docking*) adalah metode komputasi yang bertujuan meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada uji *in-vitro* (Motiejunas dan Wade, 2001). Molekul ligan ditambatkan pada situs aktif atau situsambat dari suatu protein yang sedang diam (stank) di dalam penambatan molekul, dengan menyertakan molekul ko-faktor dan /atau H<sub>2</sub>O di dalamnya, Data diperoleh mengenai posisi dan orientasi molekul ligan dalam situs aktif atau situsambat tersebut. Dari data ini, dapat disimpulkan gugus-gugus fungsional ligan yang penting untuk interaksinya, sehingga tidak boleh dihilangkan, dan gugus-gugus fungsionalnya yang dapat ditingkatkan

kekuatan interaksinya, Informasi ini menjadi petunjuk untuk modifikasi ligan tersebut. Dengan adanya petunjuk tersebut modifikasi ligan dan uji in-vitro turunan-turunannya dapat berlangsung secara efisien.

Interaksi ligan dengan protein di atas terjadi hanya apabila terdapat kecocokan (fit) bentuk dan volume di antara molekul ligan dan situs aktif atau situsambat protein tersebut (Motiejunas dan Wade, 2007). Selain itu, gugus-gugus fungsional pada molekul ligan itu harus berada pada posisi yang memadai dari asam-asam amino yang menjadi pasangannya pada situs aktif atau situsambat tersebut (Schneider dan Baringhaus 2008). Kecocokan di antara molekul ligan dan situs aktif atau situsambat proteinnya adalah demikian spesifik, bagaikan kecocokan lubang kunci dengan anak kuncinya (*lock-and-key*; (Motiejunas dan Wade, 2007). Situs aktif atau situsambat mendesak (menginduksi) perubahan konformasi ligan (Chen dan Foloppe, 2003).

Sejumlah energi yang dinikmati energi *Gibbs* penambatan ( $\Delta G_{bind}$ ) akan dibebaskan bersamaan perubahan konformasi ikatan (Schneider dan Baringhaus 2008). Pada penambatan energi terendah yang dibebaskan oleh ligan dianggap sebagai  $\Delta G_{bind}$ . Pada saat kecocokan interaksi tercapai, maka konformasi yang diadopsi oleh molekul ligan dinamakan konformasi bioaktif (Schneider dan Baringhaus, 2008). Rangkaian posisi gugus fungsional yang penting dari ligan pada konformasi bioaktif itu dinamakan farmakofor (Alvarez dan Shoichet, 2005)

## **BAB III**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Hasil Identifikasi Fungi Endofit Kode DJ2**

Fungi endofit kode D12 yang diisolasi dari daun jinten (*Coleus amboinicus* Lour.) memiliki karakteristik yaitu koloni fungi berwarna putih (Gambar 3A) dan setelah berumur lebih dari dua minggu akan berwarna eoklat kehitaman (Gambar 3B). Identifikasi morfologi fungi yang dilakukan di Laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, dapat dilihat di Lampiran I.

Identifikasi menunjukkan bahwa fungi endofit kode D12 termasuk genus *Rhizoctonia sp.* Genus *Rhizoctonia sp.* memiliki ciri-ciri, yaitu: miselium yang memadat dan panjang, spora terdapat didalam hifa, tidak mempunyai dinding yang tegas (gambar 4A), tersusun atas pigmen hifa yang berwarna gelap, dan memproduksi sklerotia dengan bentuk seragam, percabangan hifa membentuk sudut mendekati siku-siku (Gambar 4B). Ciri-ciri tersebut sesuai dengan yang dipaparkan oleh Sharma (1989) dan Garcia dkk.,(2006) yang menunjukkan fungi genus *Rhizoctonia sp.*

Gambar 3. Morfologi *Rhizoctonia* sp. (A)Umur, 10 Had (B)Umur 20 Hari

Gamba,' 4. Morfologi *Rhizoctonia* sp. (A) Miselium (B) Percabangan Hifa

Genus *Rhizoctonia* sp. umumnya ditemukan pada tanah hutan/gambut, bersimbiosis dengan akar tanaman, bersifat patogen pada akar tanaman, dan mencegah pembusukan pada buah (Garcia dkk., 2006). Fungi dari genus *Rhizoctonia* sp. yang telah diteliti dan mempunyai aktivitas, yaitu *Rhizoctonia* sp. Cy064 yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Helicobacter pylori*, fungi ini menghasilkan senyawa benzofenon yang baru yaitu asam rhizoktonik, monometilsulokrin, ergosterol, 3B,5a.,6p-trihidroksiergosta-7,22-dien (Ma dkk., 2004).

*Rhizoatonia solam* dan *Rhizoctoma cerealts* merupakana fungi dari genus *Rhizoctonia sp.* yang bersifat patogen dan bertanggungjawab terhadap proses pembusukan pada buah tomat, batang tanaman tebu dan padi, dan akar tanaman gandum (Hamada dkk., 2011; Pane dkk., 2011; Bartz dkk., 2013; Akhter dkk., 2014.). Diperhikan penelitian lebih lanjut unmk mengidentifikasi spesies dari fungi endofit genus *Rhizoctonta sp.* sehmgga dapat mengungkapkan hubungsn spesies fungi terhadap potensi antibakteri,

#### **B. Basil Pmduksi Metabolit Sekunder Fungi Endofit Kode DJ2**

Produksi metabolit sekunder fungi endofit kode DJ2 menggunakan media cair *Potato Dextrose Broth* (PDB). Fermeruasi dilakukan dengan sistem tertutup (*batch*) dan fungi yang digunakan darn media padat *Potato Dextrose Agar* (FDA) yang telah berusia 7 hari.

Media PDB digunakan untuk memperpendek fase lag pada pertumbuhan fungi. Media PDB memiliki komposisi yang mirip dengan media PDA, perbedaanya pada PDe. tidak ada agar. Fungi D12 diharapkan dapat beradaptasi lebih cepat dengan perubahan lingkungan karena sudah beradaptasi sebelumnya pada media PDA Fase lag yang lebih pendek memungkinkan fungi untuk lebih cepat memasuki fase logaritmik, sehingga diharapkan lebih cepat terjadi pembentukan metabolit sekunder pada fase stasioner. Selain itu, kandungan yang sama pada kedua media akan menjamin proses fermentasi menghasilkan produk yang sama dengan yang dihasilkan pada media PDA.

Fermentasi pada penelitian ini dilakukan selama 14 hari. karena selama 14 hari tersebut diperkirakan fase stasioner telah tercapai. Nisak (2013) melalui uji antibakteri dengan metode *disc diffusion* pada ekstrak etil asetat fungi endofit kode DJ2, melaporkan bahwa ekstrak dari waktu fermentasi selama 14 hari memberikan zona hambat bakteri dibandingkan dengan ekstrak dari waktu fermentasi selama 10 hari. Fase stasioner ditandai dengan perubahan warna pada media PDB, meningkatnya viskositas dari media, dan volume miselium pada fermentor tidak bertambah. Fungi genus *Rhizoctonia sp.* setelah fermentasi didalam media PDB selama 14 hari berwarna kuning pucat, tekstur media kental dan bila dibandingkan dengan hari ke-7, miselium tidak berbentuk bulat (gambar 5).

Gambar 5. Kultur Fungi *Rhizoctonia sp.* (A) Hari ke-7 (B) Hari ke-14

Media PDB yang digunakan dalam proses fermentasi dapat lebih efektif untuk meningkatkan biomassa sel fungi dan metabolit sekunder dibandingkan fermentasi dalam media padat. Media PDB dapat dilakukan proses agitasi yang berperan untuk menjaga homogenitas nutrisi dalam media sehingga absorpsi nutrisi oleh fungi menjadi optimal. Setelah mencapai waktu 14 hari, maka dilakukan pemisahan antara

miselium dan media menggunakan teknik penyaringan kemudian dilakukan proses ekstraksi media.

### C. Hasil Pengambilan Metabolit Sekunder

Media PDB yang telah dipisahkan dari miselium diekstraksi dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah, Prinsip dari metode partisi cair-cair adalah proses pemisahan zat terlarut dalam 2 macam zat pelarut yang tidak saling bercampur atau dengan kata lain perbandingan konsentrasi zat terlarut dalam pelarut organik dan pelarut air.

Etil asetat digunakan sebagai cairan penyarian partisi dilakukan dengan menggunakan perbandingan antara etil asetat dan media PDB sebesar 1:3 dengan 3 kali replikasi. Etil asetat dikeringkan dengan cara didiamkan dalam lemari asam, Ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat (gambar 6) dan rendemen ekstrak etil asetat dapat dilihat pada Lampiran 2.

Gambar 6. Ekstrak Etil Asetat

Etil asetat adalah mempunyai indeks polaritas 4,4 (semi polar) sehingga etil asetat dapat melarutkan senyawa-senyawa yang relatif kurang polar, Senyawa antibiotik

yang telah diisolasi dari fungi endofit umumnya bersifat semi polar seperti senyawa terpenoid, flavonoid, alifatik, alkaloid, steroid, peptida, dan fenol (Yu dkk., 2010). Oleh karena itu, penggunaan etil asetat sebagai pelarut diharapkan dapat melarutkan senyawa yang terdapat dalam media fermentasi.

Ekstrak etil asetat yang dihasilkan dari proses fermentasi pada volume media 1000 ml, sebesar  $117 \pm 7,94$  µg. Jumlah ekstrak etil asetat yang dihasilkan akan meningkat 2 sampai 3 kali apabila volume media ditingkatkan (Gambar 7). Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak yang dihasilkan akan meningkat jumlahnya sebanding dengan media yang diberikan dalam proses fermentasi. Jumlah media yang diberikan akan berbanding lurus terhadap nutrisi di dalam media. Nutrisi sangat diperlukan oleh fungi sebagai bahan dasar untuk proses pertumbuhan dan biosintesis metabolit sekunder (Stanbury dkk., 1999).



Gambar 7. Rendemen Ekstrak Etil Asetat



#### D. Hasil Fraksinasi Senyawa Aktif Ekstrak Etil Asetat secara KLT Preparatif

Fraksinasi dilakukan setelah dilakukan uji optimasi pemisahan senyawa menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial, Kromatogram hasil elusi (gambar 8) menunjukkan bahwa terjadi pemisahan spot dari ekstrak etil asetat pada  $R_f$  58 dan  $R_f$  80. Hasil elusi tersebut dijadikan dasar untuk dilakukan fraksinasi menggunakan metode KLTP dengan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial,

#### Gambar 8. Kromatogram KLT Ekstrak Etil Asetat

ditunjukkan gambar:

Kromatogram di bawah sinar UV (A), sinar UV (t), (8). Fase diam silika gel FZ54, fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial, dan pengembangan gambar,

Kromatogram yang diperoleh kemudian disemprot dengan 6 jenis percaes} semprot yaitu: vanilin asam sulfat, 4-DNPH, anisaldehyd-asam sultat dragendorf,

FeCh, dan sermmn sulfat dengan perlakuan khusus setiap pereksi semprot. Pereaksi semprot digunakan unruk mendeteksi senyawa yang tidak terdeteksi dibawah sinar UV2S4 dan UV36G.

Hasil pada Gambar 9 menanjukan bahwa terdapat bercak kromatogram yang hanya terdeteksi menggunakan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat pada hRf 50, 55, 60 dan 77 yang berwarna ungu pada sinar tampak dan UV254. Bercak berwarna ungu menunjukan bercak pada *hRf* 50, 55,60 dan 80 merupakan turunan fenolik (Wagner dan Bladt, 1996). Pereaksi ini akars mengabstraksi H+ sampe] sehingga terbentuk ikatan rangkap terkonjugasi semakin lama reaksi berlangsung maka semakin panjang ikatan terbenlnk, Pereaksi anisaldehyd-asam sulfet dapat digunakan sebagai pereksi semprot untuk mendeteksi bercak pada plat KLTP sebelum dilakukan penggolongan dan pemisahan frskai

● II d r

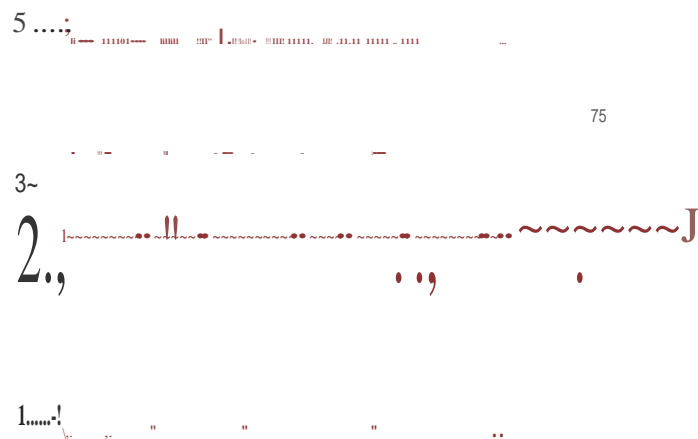
Gambar 9. Kromatogram KLT Eksn-ak Etil As.etat

Keterangan gambar:

Kromatogram di bawah sinar tampak (A). UV254 (B). UV365 (C).  
(a) pereaksi FeCl<sub>3</sub>, (b) Dragendorff, (c) 4-DNPH, (d) Serimn Sulfat,  
(e) Anisaldehyd-Asam Sulfat, (t) Vanilin Asam Sulfat, Fase diam  
silika gel F<sub>254</sub>, fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1)  
dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial, dan  
pengembangan 8 cm.

Fraksinasi ekstrak etil asetat menggunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP), prinsip pemisahan senyawa dengan metode KLTP adalah interaksi antara senyawa dengan fase diam dan fase gerak, Fase diam yang digunakan adalah

*silica gel* [60 PF254] dan fase gerak adalah n-beksan : etil asetat : metanol (2:[6:1]) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial. Kromatogram yang terdeteksi dibawah sinar UV<sub>254</sub>; UV<sub>366</sub> dan deteksi dengan pereaksi anisaldehyd-asam sultat kemudian dikelompokan menjadi 5 fraksi seperti yang terlihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Profil Kromatogram KLT Preparatif Ekstrak Etil Asetat  
 Keterangan gambar:  
 Fase diam *silica gel* 60 PF254 dan fase gerak n-heksan : etil asetat : metana  
 (2:6:1) ditambah 1 tetes asam asetat glasial, Visualisasi pemisahan fraksi  
 secara KLT preparatif, yakni (A) kromatogram di bawah UV254, (B) UV366,  
 (C) Pereaksi Anisaldehyd-Asam Sulfat, (1) fraksi 1, (2) fraksi 2, (3)  
 fraksi 3, (4) fraksi 4, dan (5) fraksi 5.

Fraksi yang telah dikelompokkan kemudian dipisahkan secara hati-hati dengan cara dikerok dan serbuk simika disimpan pada temperatur yang khusus sesuai penggolongan fraksi. Serbuk silika diharuskan dengan kloroform : metanol (1:1) kemudian disaring dengan milipore dan diuapkan hingga kering, Fraksi ditimbang sehingga diperoleh rendemen fraksi dengan cara membandingkan bobot fraksi terhadap ekstrak etil asetat seperti pada Tabel 1. Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji.

Tabel 1. Rendemen dan Analisis

Fraksi	R <sub>f</sub>	Sinar Tampak	UV145	UV366	Anisaldehyd-Asam sulfat	Rendemen (% b/b)
1	0	Coklat	Meredam			2.28
2	40	Kuning	Meredam	Berpendar Him	Ungu	36.61
3	60					7.55
4	80			Berpendar Biru	Ungu	25.17
5	100	Kuning	Meredam	Berpendar Biru	Ungu	26.31

Keterangan: Berat ekstrak etil asetat = 874 mg

#### E. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi (Skrining Senyawa Aktif)

Fraksi yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode *disc diffusion* (Kirby-Bauer Test) terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, dan *Pseudomonas aeruginosa* untuk mengetahui fraksi yang aktif (Gambar 11; Lampiran 3).

*Staphylococcus aureus*

*Escherichia coli*

Gambar 11. Hasil Uji *Disc Diffusion* Fraksi terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Keterangan gambar:

- A = Fraksi 2
- B = Fraksi 4
- K - = Kontrol negatif (etanol absolut steril)
- K + = Kontrol positif (streptomisin 10 mg/ml.)
- F 12,5 µg = *Loading dose* fraksi sebesar 12,5 µg
- F 25 µg = *Loading dose* fraksi sebesar 25 µg
- F 50 µg = *Loading dose* fraksi sebesar 50 µg
- F 100 µg = *Loading dose* fraksi sebesar 100 µg
- F 200 µg = *Loading dose* fraksi sebesar 200 µg
- Diameter *disc* = 5 mm
- Konsentrasi bakteri =  $1,5 \times 10^8$  cfu/ml

Pengamatan menunjukkan bahwa fraksi 2, 4, dan fraksi 5 mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap bakteri uji dibandingkan dengan fraksi lainnya (Tabel U). Fraksi 2 dan 5 menghambat pertumbuhan semua strain bakteri uji (*E. coli*,

*S. aureus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *P. aeruginosa*). Fraksi 4 menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, dan *Staphylococcus aureus* tetapi tidak mempunyai aktivitas terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Berdasarkan keseluruhan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri uji, fraksi 2 mempunyai aktivitas yang lebih besar daripada fraksi 4 dan fraksi 5. Namun, bila ditinjau dalam sudut pandang skrining aktivitas antibakteri, maka ketiga fraksi tersebut mempunyai potensi untuk dilakukan uji aktivitas (secara mikrodilusi) dan isolasi senyawa aktif antibakteri.

Tabel II. Hasil Pengamatan Uji Daya Hambat Fraksi terhadap Bakteri Uji.

Fraksi	Dosis (µg)	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Kontroll	Kontroll
1	12,5	ND	7	ND	ND	ND		
	25	7,5	9	ND	NO	ND		
	100	11	6	7	ND	ND	21	ND
	200	10	15	ND	NO	17		
	12,5	18	210	19	11	12		
2	25	17	18	17	13	14	22	ND
	50	18	21	19	16	12		
	100	15	18	17	19	18		
			23	15	20	21		
			ND	ND	NO	ND		
3	25	ND	ND	ND	ND	ND		
	50	12		ND	ND	ND	21	ND
	100	8	17	ND	OSJ(fi)	ND		
	200	9		18	NO	ND		
4			ND	ND	11	ND		
	25	ND	7	9	10	ND	20	ND
	50	12	11	11	9	ND		
	100	13	10	13	10	ND		
	200	8	8	15	9	ND		

	12~5	ND	11	12	10	8		
	25	ND	13	13	11	12		
5	50	ND	15	10	12	13	22	ND
	100	ND	16	15	11	9		
	200	12	116	11	13	8		

Keterangan: ND = *not detected* (tidak terdeteksi adanya aktiviras)

Fraaksi 5 tidak digunakan dalam uji aktivitas (penentuan nilai KHM dan KBM) dan isolasi senyawa aktif antibakteri, karena fraksi 5 diduga senyawa kontaminan dari pelarut etil asetat teknis yang digunakan pada proses ekstraksi. Senyawa kontaminan yang diduga senyawa di-(2-ethylhexyl) phthalate, merupakan senyawa ester penyusun komponen plastik (*plasticizer*) yang telah berhasil diisolasi dan mempunyai aktivitas sebagai antikanker (Pufri dkk., 2014).

Isolat di-(2-ethylhexyl) phthalate kemudian digunakan untuk membuktikan fraksi 5 merupakan senyawa kontaminan, Hasil uji KLT dan KLTP (Lampiran 4) membuktikan bahwa bercak kromatogram fraksi 5 antara ekstrak etil asetat dan isolat di-(2-ethylhexyl) phthalate berada pada nilai Rf yang sama (*Rf* 0,10) pada UV<sub>254</sub> dan UV<sub>366</sub>. Di-(2-ethylhexyl) phthalate terbukti mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus*, *S. intermedius*, *K. pneumoniae*, *S. pyogenes*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*; *B. subtilis*, *B. megaterium*, *S. lutea*, *S. sonnei*, *S. shiga*, *S. dysenteriae* (Habib dan Karim, 2009; Zellagui dkk., 2012) ..

#### F. Basis Isolasi Senyawa Aktif Antibakteri

Optimasi fase gerak dilakukan terlebih dahulu untuk mencari fase gerak yang dapat memisahkan senyawa didalam fraksi aktif Hasil optimasi fase gerak



menggunakan metode KLT didapatkan bahwa fraksi 2 terdapat dua bercak kromatogram yang terpisah menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat (1 : 3) pada  $R_f$  15 (UV366) dan 50 (UV254, anisaldehyd-asam sulfat) (gambar 12).

Gambar 12. Profil KLT Fraksi 2 Basil Opnmasl

Keterangan gambar:

A = Profil KLT UV254

B = Profil KLT UV366

C = Anisaldehyd-asam sulfat

Fase diam = Silika gel F125

Fase gerak = Kloroform : etil asetat (1:3)

Jarak pengembangan = 8 cm

Optimasi fase gerak pada fraksi 4 didapatkan dua bercak kromatogram yang terpisah menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat (1:1) pada  $R_f$  15 dan 30 (UV366) dan tidak terdeteksi adanya bercak dibawah sinar UV254 dan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat (gambar 13).

Gambar 13. Profil KLT Fraksi 4 Basil Optimasi

Keterangan gambar:

A = Profil KLT UVi;-)

B = Profil KLT Uji;J)M

C = Anisaldehyd-asam sulfat

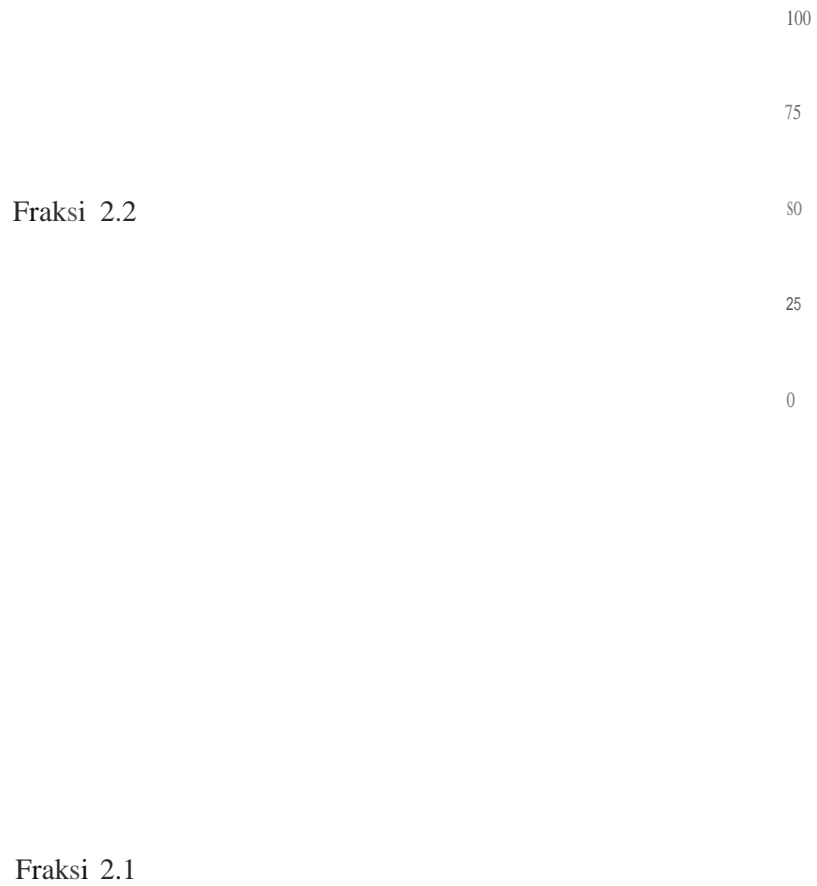
Fase diam = Silika gel F<sub>254</sub>

Fase gerak = Kloroform : etil asetat (1:1)

Jarak pengembangan = 8 cm

Fraksi 2 dan fraksi 4 dilakukan pemurnian untuk mengisolasi senyawa yang aktif sebagai antibakteri. Pemurnian dilakukan dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis preparatif (KLTP). Fase gerak yang diperoleh dan optimasi diaplikasikan pada metode KLTP pada masing-masing fraksi. Isolasi fraksi 2 dengan KLTP menghasilkan 2 bercak terpisah pada  $R_f$  30 (UV366) dan 50 (UV254) (Gambar 14).

Isolasi fraksi 4 menghasilkan 2 bercak terpisah pada *hR/25* (UV366) dan 55 (UV25~) (Gambar 15). Bercak kemudian dipisahkan, dilarutkan dengan kloroform:mctanol(1:1), saring milipore dan kristalisasi. Rendemen tiap fraksi dapat dilihat pada Tabel III.



Gambar 15. Prom KLTP Fraksi 2  
Keterangan gambar:

A = Profil KLT UV2~  
B = Profil KLT UV356  
Fase diam = Silika gel PFl~~  
Fase gerak = Kloroform : etil asetat (1:3)  
Jarak pengembangan = 15 em

Fraksi 4.2

Fraksi 4.1

Gambar 15. Prom KLTP Fraksi 4  
Keterangan gambar:

A = Profil KLT UV<sub>254</sub>  
 B = Profil KLT UV<sub>356</sub>  
 Fase diam = SHih gel PF:1:54  
 Fase gerak = Kloroform : etil asetat (1: 1)  
 Jarak pengembangan = 15 cm

Tabel In. Rendemen dan *h.Rf*Fraksi

Fraksi	<i>hR</i> /	Sinar Tampak	Rendemen (% b/b)
2	30	Berpendar biru	12,5
	50	Meredam	48,13
4	25	Berpendar Biru	
	55	Meredam	2,15

Keterangan : Berat fraksi 2 = 316 mg  
 Berat fraksi 4 = 218 mg

Senyawa utama dari fraksi 2 yaitu Iraksi 2,2 dan dari fraksi 4 yaitu fraksi 4.1 dilakukan uji kemurniannya menggunakan metode KLT dengan fase diam silika gel dan beberapa fase gerak dengan polaritas yang berbeda. Fraksi 2.2 diuji dengan fase gerak kloroform : n-heksan (2:3, v/v), metanol : n-heksan (2:5, v/v), n-heksan : etil asetat (3:2,v/v), wasbensi: etil asetat (2:E,v/v), metanol: klorofoem (L2,v/v), dan etil asetat ; meta-no] ( 5:2, TN) menghasilkan bercak tunggal dengan *hRf* masing-masing 20; 35 50; 60 61; dan 74 (Lampiran 5),

Fraksi 4.1 diuji dengan fase gerak etil asetat : wasbensia (4:1;v/v), etil asetat : kloroform (3: L<sub>v</sub>/v), etil asetat : meranol (5:1, v/v), n-heksan : metanol (3:2,v/v), dan n-heksan : etil asetat (2:5,v/v) menghasilkan bercak mnggal dengan *hRf* masing-

masing 20,25,55, 70, 80 (Lampiran 5). Hasil uji secara KLT, baik dari fraksi 2.2 dan fraksi 4.1 menunjukkan bercak tunggal yang konsisten pada masing-masing hRf sehingga dapat dikatakan bahwa fraksi 2.2 dan 4.1 telah relatif murni secara KLT.

Pemeriksaan titik lebur dilakukan untuk mengetahui kemurnian dari senyawa hasil isolasi. Serbuk isolat yang telah diuji menunjukkan bahwa, jarak lebur dari isolat 2.2 sebesar 175,21 - 175,90 °C. Hasil menunjukkan bahwa serbuk isolat 2.2 mempunyai jarak lebur sebesar 0,69 °C. Uji titik lebur pada isolat 4.1 menghasilkan jarak lebur sebesar 202,37 - 203,40 °C, hal tersebut menunjukkan bahwa jarak lebur isolat 4.1 sebesar 1,03 °C. Jarak titik lebur kedua isolat yang relatif pendek dengan jarak 1-2°C menandakan bahwa kedua isolat sudah relatif murni (Jasperse, 2014).

Tabel IV. Pemeriksaan Titik Lebur Isolat

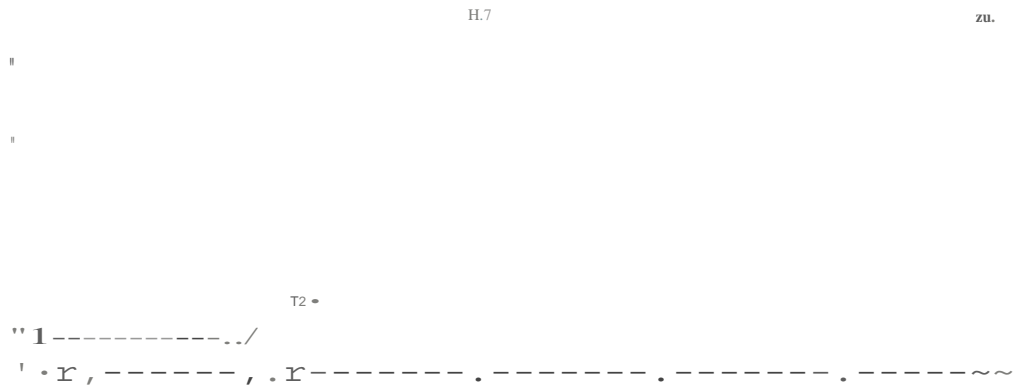
Isolat	Rerata jarak titik lebur		Standard deviation	
	<i>Start of melting</i> eq	<i>End of melting</i> eq	<i>Start of melting</i>	<i>End of melting</i>
2.2	175,21	175,90	0,40	0,41
4.1	202,37	203,40	1,22	0,63

Uji kemurnian dilanjutkan dengan metode kromatografi carr dengan menggunakan instrumen LC-MS. Kromatogram fraksi 2.2 memiliki *retention time* 2,2 menit (Gambar 16) dengan kemurnian 100%. Kromatogram fraksi 4.1 memiliki *retention time* 4,7 menit (Gambar 17) dengan kemurnian 94,35%. Persentase kemurnian isolat 4.1 diperoleh dengan membandingkan luas area *peak* RT 4,7 dengan total luas area *peak* RT 2,4 (*impurities*) dan *peak* RT 4,7. Hasil uji KLT. uji titik

lebur, dan kromatogram *liquid chromatography* dari fraksi 2.2 dan 4.1 dapat disimpulkan bahwa fraksi 2.2 dan 4.1 telah relatif murni secara KLT, titik lebur, dan secara *liquid chromatography* sehingga disebut isolat 2.2 dan 4.1.

,"  
 " "  
 " "  
 " "  
 " "

Gambar 16. Kromatogram Isolat 2.2



Gambar 17. Kromatogram Isolat 4.1

## G. Hasil Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan menggunakan metode mikrodilusi. Metode mikrodilusi merupakan pengembangan dari metode dilusi cair yang menggunakan jumlah media, bakteri uji, dan senyawa dalam ukuran kecil (mikroliter) serta menggunakan alat *microplate* 96 wells. Kekeruhan yang diamati merupakan nilai *optical density* hasil penghambatan *microplate* 96 wells menggunakan *microplate reader* yang diaplikasikan dalam nilai absorbensi.

Uji antibakteri bertujuan untuk mengetahui kemampuan isolat dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji, yaitu *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, dan *Salmonella typhi* dengan parameter KHM<sub>50</sub> dan KHM<sub>90</sub>; serta mengetahui nilai kadar bunuh minimum isolat dengan parameter ICBM.

Uji antibakteri secara garis besar menunjukkan bahwa isolat 2.2 lebih aktif daripada isolat 4.1. Hal tersebut ditunjukkan dengan menganalisis nilai KHM<sub>50</sub> dan KHM<sub>90</sub> dari isolat. Isolat 2.2 mempunyai nilai KHM<sub>50</sub> dan KHM<sub>90</sub> yang lebih kecil daripada isolat 4.1 (Tabel V). Misalnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis*, isolat 2.2 memerlukan konsentrasi 979 µg/mL dalam menghambat 90% pertumbuhan bakteri daripada isolat 4.1 yang memerlukan konsentrasi lebih tinggi yaitu 19,18 µg/mL.



Tabel V. Nilai KHM dan Nilai KBM Isolat 2.2 dan 4.1

BAKTERI	SENYAWA				KB.M (11w/mL)
	ISOLAT 2.2,		ISOLAT 4.1		
<i>B. subtilis</i>					40,00
<i>E. coli</i>					40,00
<i>P. aeruginosa</i>	1,27	9,38	40,00	1;33	14,70
<i>S. aureus</i>					40,00
<i>S. mutans</i>	0,31	7,25	10,00	0,24	9,40
<i>S. typhi</i>					20;00

Isolat 2.2 mempunyai kemampuan membunuh bakteri atau nilai kadar bunuh minimum yang lebih aktif daripada isolat 4.1 terhadap bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, *S. mutans*, dan *S. typhi*, tetapi mempunyai nilai konsentrasi KBM yang sama terhadap bakteri *P. aeruginosa*, dan *S. aureus* (tabel V). Misalnya dalam membunuh bakteri *B. subtilis* dan *E. coli* isolat 2.2 dapat membunuh 99,9% bakteri pada konsentrasi 20 µg/mL daripada isolat 4.1. yaitu memerlukan dosis yang lebih tinggi sebesar 40 µg/ml.,

Rasio KBM:KHM dapat digunakan sebagai tolok ukur penentuan sifat bakteristatik dan bakterisidal dari suatu senyawa, Bakteristatik digunakan untuk menyebut agen antibakteri yang mampu mencegah pertumbuhan bakteri, Bakterisidal merupakan konsentrasi minimum antibakteri yang mampu membunuh ~99,9% (3

logm) pertumbuhan bakteri setelah inkubasi selama 18-24 jam dalam media cair (NeeLS, 1999).

Senyawa bersifat bakterisidal jika memiliki rasio KBM:KHM  $\sim 4$ ) bersifat bakteriostatik jika memiliki rasio KBM:KHM  $\geq 6$  (Bartlett<sup>11</sup>) 2014) dan dikatakan toleran jika memiliki rasio KBM:KHM sebesar  $\geq 32$  (NeeLS, 1999).. Rasio KBM:KHM yang cukup besar memengaruhi sifat toleran dan bakteri uji terhadap agen antibakteri yang ditinjau.

Isolat 2.2 mempunyai sifat bakterisidal terhadap bakteri *B. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. mutans*, dan *S. typhi* dikarenakan rasio antara KBM dan KHM nilainya  $\sim 4$ , sedangkan isolat 2.2 bersifat bakteriostatik terhadap bakteri *P. aeruginosa* karena nilai rasio antara KBM dan KHM  $\sim 4$  (Tabel VI).. Isolat 4,,] bersifat bakteriostatik terhadap bakteri *E. coli* karena memiliki rasio KBM dan KHM sebesar  $2: 4$ , sedangkan bersifat bakterisidal terhadap bakteri *B. subtilis*, *P. aeruginosa*; *S. aureus*, *S. mutans*, dan *S. typhi* karena memiliki rasio KBM dan KHM sebesar  $< 4$  (Tabel V)].

Tabel VI. Penentuan Sifat Senyawa Antibakteri

H. Basil Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri

1. Analisis golongan isolat 2.2

Identifikasi golongan senyawa isolat menggunakan pereaksi semprot valilin asam sulfat, 2,4-DNPH, serium-asam sulfat, dragendorf, anisaldehyd-asam sulfat, FeCb dengan perlakuan khusus pada masing-masing pereaksi.

BAKTERI

<i>B.subtilis</i>						
<i>Ecol;</i>	6,62	20	3,02	9,19	40	4,35
<i>P.aeruginosa</i>	9,38	40	4,26	14,70	40	2,72
<i>Siaureus</i>	10,80	40	3,70	17,56	40	2,27
<i>Smutans</i>	7,25	10	1,38	9,40	20	2,12
<i>Styphi</i>	10,21	10	0,97	16,70	20	1,19

a      b      |      d      e      f

Gambar 18. Kromatogram KLT Isolat 2.2 di bawah sinar tampak

Keterangan gambar:

(a) Reaksi FeCl<sub>3</sub>, (b) 2,4-DNP, (c) Sulfat, (d) Vanillin-asam sulfat, (e) Dragendorff, (f) Anisaldehyd-Asam Sulfat. Fase diam silika gel. Fase gerak n-heksan : etil Asetat (1:3, v/v), dan pengembangan gambar.

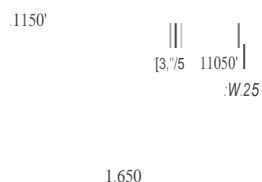
Hasil identifikasi menunjukkan isolat 2.2 terdeteksi menggunakan reaksi dragendorff dan anisaldehyd-asam sulfat, bercak tunggal menunjukkan warna coklat jingga dan ungu pada sinar tampak (gambar 18). Senyawa yang terdeteksi berwarna merah menggunakan reaksi dragendorff merupakan senyawa alkaloid, Nitrogen pada senyawa akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan K<sup>+</sup> yang merupakan ion logam dan menimbulkan warna merah bata (Wagner dan Bladt, 1996). Senyawa yang terdeteksi berwarna ungu pada sinar tampak menggunakan reaksi anisaldehyd-asam sulfat merupakan senyawa turunan fenolik. Reaksi ini akan mengabstraksi H<sup>+</sup> sampel sehingga terbentuk ikatan rangkap terkonjugasi (Wagner dan Bladt, 1996).

## 2. Elusidasi Struktur Isolat 2.2

### 3. Analisis Spektrum FT-IR

Spektrum infra merah isolat 2.2 menunjukkan pita yang melebar pada daerah 3303 cm<sup>-1</sup> yang mengindikasikan adanya gugus hidroksi -OH; vibrasi *stretching* lemah dengan intensitas rendah pada daerah 2150 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan gugus imina (HN=CH-) (Supratman, 2010), serapan kuat dengan bentuk pita tajam pada daerah 1650 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya gugus C=O (Stuart, 2004), serapan

lemah pada daerah 1375 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya gugus metil, Puncak lemah pada daerah sidik jari pada bilangan gelombang 1025 dan 1050 cm<sup>-1</sup> mengindikasikan adanya ikatan C-O dan menunjukkan adanya senyawa ester.



Gambar 19, Spektra IR Isolat 2.2

Tabel VII. Interpretasi Spektra IR Isolat 2.2

Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Wavelength (μm)	Bentuk, Intensitas	Interpretasi
1025	~9.8	Tajam, Lemah	C-O stretching
1050	~9.5	Tajam, Lemah	C-O stretching
1375	~7.3	Tajam, Lemah	Metil (C-H bending)
1650	~6.1	Tajam, Kuat	(C=O) stretching
2000-2200	~5.0-4.5	Melebar, Lemah	HC-NH (amina)
3303	~2.7	Melebar, Kuat	Hidroksi (-OH stretching)

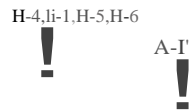
\* (Sastroamidjojo, 2001; Stuart, 2004; Supratman, 2010)

#### b. Analisis Spektrum <sup>1</sup>H-NMR

Spektrum <sup>1</sup>H-NMR digunakan untuk menunjukkan jumlah dan posisi H yang terdapat pada isolat.

mo

H-1' H-2' H-2'



Gambar 20, Spektta  $^1\text{H-NMR}$  Isolat 2.2-

Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  isolat 2.2 menunjukkan proton dengan 0 7.,85ppm (H-4 dan H-7,  $d, J = 7$ ) dan 7,84 ppm (B-5 dan H-6,  $d, J = 7$ ) merupakan proton-proton benzen disabstitusi dengan posisi orto HUm benzen orto substitusi dengan integrasi tota] 4 dimana terdiri dari 2 set hidrogen yang liuier (H-4 linier dengan H-7; H-5 linier H-6). Proton yang muncul pada 0 6,73 ppm (H-1') dengan pola splitting *doublet*, integrasi 2 dan *Coupling Counstan: (J)* 7,75 Hz menunjukkan adanya gugus metilen (-CH<sub>2</sub>-), proton metilen dengan geseran knnia lebih *downfiled* mengindikasikan bahwa gugus metilen tersehut mengikat atom yang lebih elektronegatif (atom oksigen),

Substituen elektronegatif psda karbon akan mereduksi perindungan diamagnetik didekat proton-proton yang terikat, karena akan mereduksi kerapatan elektron diseknar proton-proson tersebut Proton yang terikat pada karbon yang mengikat unsur elektronegatif, maka *chemical shift* dart proton tersebut akan naik dengan kenaikan elektronegativitas dad unsur yang diikat oleh atom karbon tersebut (Sastrohamidjojo, 2(01)).

Proton dengan  $\delta$  3,68 ppm (H-2a.) menunjukkan pola splitting *singlet* dengan integrasi 1 menunjukkan adanya proton yang terikat pada atom N primer (Macomber, 1998) dan mengadakan kopling dengan H-2'. Proton yang terikat pada atom N sejatinya tidak mengena] proton tetangganya sehingga keluar dengan splitting *singlet*, Proton yang muncul pada  $\delta$  2,16~2,17; 2,19; 2,21; dan 2,24 ppm (H-2'') dengan pola splitting *quintet* dan integrasi 1 menunjukkan bahwa proton ini merupakan proton metin (-CH-) yang mempunyai 4 proton tetangga, Proton tetangga dari proton H-2'' masing-masing merupakan proton metilen (-CH<sub>2</sub>-) atau proton metil (-CH<sub>3</sub>) dan metin (-CH-).

Proton dengan  $\delta$  5,20 ppm (H-1'') dengan integrasi 2 dan pola splitting *doublet* menunjukkan adanya gugus metilen (-CH<sub>2</sub>-) yang bertetangga dengan satu proton atau gugus metin (-CH). Proton yang muncul pada  $\delta$  1,92 ppm (H-1a'') dengan pola splitting *Singlet* dengan integrasi 1 merupakan ciri khas dari proton yang terikat atom oksigen yang mempunyai sifat elektronegatif atau proton gugus hidroksi (-OH) pada rantai samping. Kondisi yang lebih ekstrim terjadi pada serapan proton hidroksi dengan konsentrasi yang lebih tinggi serapan muncul pada daerah  $\delta$  0,5 - 3,0 ppm karena ikatan hidrogen antara gugus hidroksi atau -NH dengan pelarut yang digunakan pada analisis yaitu metanol dan D<sub>2</sub>O (Sastrohamidjojo, 2001; Supratman, 2010),.

Proton dengan  $\delta$  1,62 ppm (H-2) dengan pola splitting *singlet* dan integrasi 2 menunjukkan adanya gugus metilen (-CH<sub>2</sub>-), dimana proton dengan

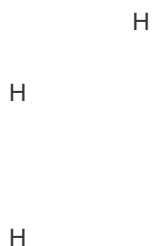
geseran kimia lebih *upfield* mengindikasikan bahwa gugus metilen terikat pada gugus karbonil (C=O), sedangkan proton yang lebih *downfield* mengindikasikan adanya gugus metilen yang mengikat atom N tersier (Jenie *et al.*, 2006). Proton yang muncul pada 0,129; 1,30; 1,32; dan 1,39 ppm (H-3") dengan pola splitting *quartet* dengan integrasi 2 menunjukkan adanya gugus metilen (-CH<sub>2</sub>-) yang bertetangga dengan 3 proton yaitu proton metin dan metilen atau proton metil.

Proton dengan 0,120; 1,21; dan 1,21 ppm (H-2·) dengan integrasi 1 dan pola splitting *triplet* menunjukkan adanya gugus metin (-CH=) yang bertetangga dengan dua proton yaitu gugus metilen. Gugus molekul yang mempunyai elektron  $\pi$  ( $\Phi$ ) menghasilkan medan magnet anisotropi sekunder. Gugus metin yang mempunyai elektron  $n$ , medan magnet yang dihasilkan oleh induksi perputaran elektron-elektron  $n$  mempunyai geometri sedemikian rupa hingga proton gugus metin terlindungi. Proton metin mempunyai resonansi pada medan yang lebih tinggi dari pada yang diperkirakan sehingga muncul pada daerah *upfield* (Sastrohamidjojo, 2007).

Proton pada daerah *upfield* dengan pola splitting *sextet* pada 0,111; 1,12; 1,13; 1,142; 1,149; dan 1,15 ppm (H-4") dengan integrasi 2 menunjukkan gugus metilen (-CH<sub>2</sub>-). Lima proton yang berdekatan dengan proton-proton sekunder, tiga disisi sebelah dan dua disamping lain, tidak ekuivalen, tetapi tetapan gabungan yaitu  $J_{ab}$  (5 hertz) dan  $J_{bc}$  (6 hertz) hampir sama. Proton pada daerah sangat *upfield* dengan 0,088; 0,90; dan 0,91 ppm (H-S") dengan integrasi 3 dan pola splitting



*triplet* menunjukan gugus metil ( $\text{CH}_3$ ) yang berdekatan dengan dua proton sekunder. Proton pada daerah *upfield* merupakan proton yang sangat terlindungi atau jauh dari atom elektronegatif



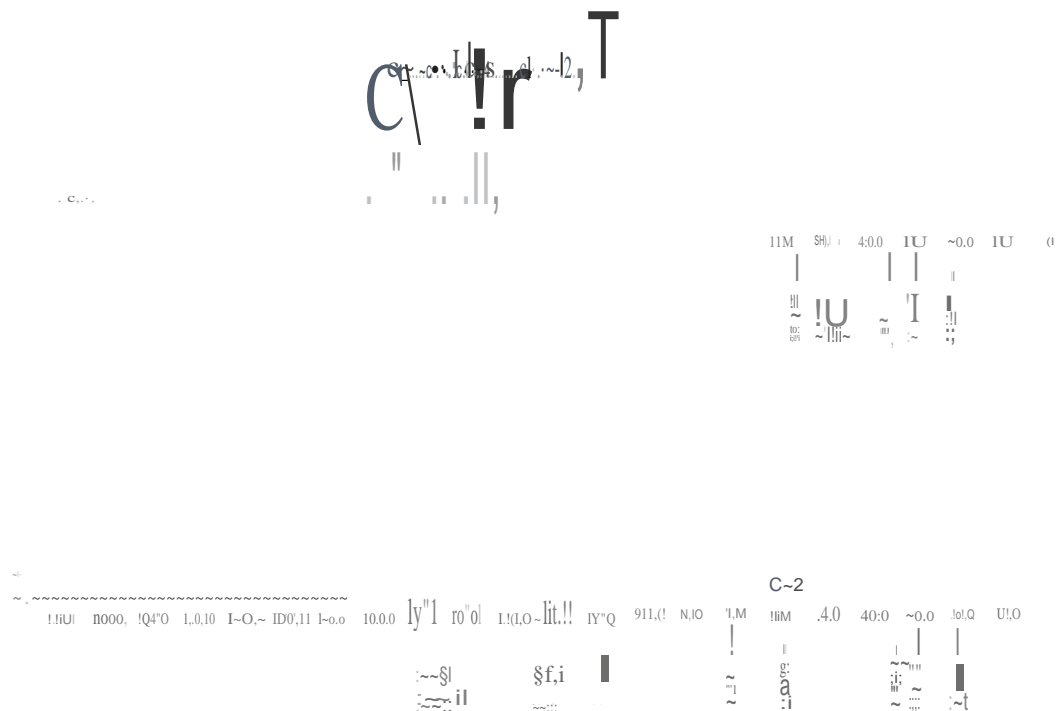
Gambar 21. Spektrum  $^1\text{H-NMR}$  Isolat 2.2

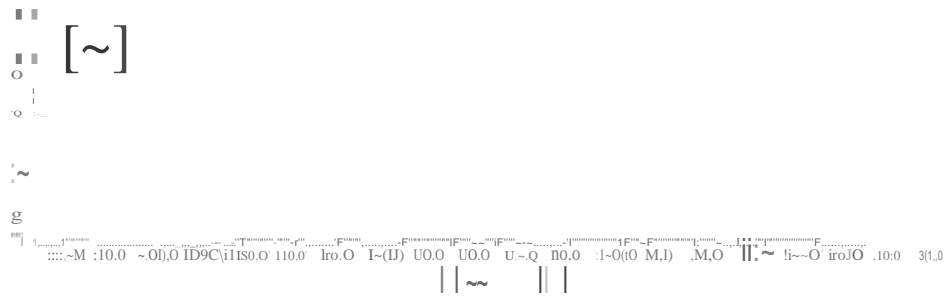
Tabel VIII. Data  $^1\text{H-NMR}$  Isolat 2.2

Chemical Shift (ppm)	Integration	Assignment	Multiplicity	Assignment
7,85 dan 7,84		H-4"	<i>doubled of doubled</i>	-CH=CH~ (aromatis)
6~73		H-1'	<i>doublet</i>	-CIU-
2)6' 2,11' 2,19;		H-2a'	<i>singlet</i>	=NH-
2,21; dan 2,24		H-2"	<i>quintet</i>	-CR-
2,0		H-1~1	<i>doublet</i>	
1,92		H~1a"	<i>singlet</i>	
1,29; 1,30' 1,32;		H-2	<i>singlet</i>	-CHi-
dan 1,39		H-3"	<i>quartet</i>	-CH2-
1,20" 1,21; dan		H-2'	<i>triplet</i>	-CH=
1,21				
1,11; 1,12; 1,13;			<i>sextet</i>	-CH2~
1,142; U49~ dan				
1,15				
0,88- 0,90; dan		H-3'''	<i>triplet</i>	
0,91				

### c. Analisis Spektrum $^{13}\text{C}$ -NMR dan DEPT

Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR dan DEPT digunakan untuk menunjukkan jumlah, jenis, dan posisi atom karbon yang terdapat pada isolat. Spektrum  $^{13}\text{C}$ -NMR (Gambar 22A) isolat 2.2 terdeteksi 15 signal resonansi karbon. Signal yang muncul pada daerah sangat *downfield* dengan  $\delta$  177,68 ppm (C-1) adalah karakteristik untuk resonansi karbon karbonil dengan ikatan rangkap terkonjugasi. Signal yang muncul pada daerah sangat *upfield* dengan  $\delta$  22,09 ppm (CS') merupakan karakteristik karbon metil. Pergeseran kimia pada spektroskopi  $^{13}\text{C}$ -NMR mirip dengan spektroskopi  $^1\text{H}$ -NMR, karbon metil dan TMS menyerap pada medan yang kuat (*upfield*) sementara karbon karboksil dan aldehida menyerap pada medan yang lemah (*downfield*) (Supratman, 2(10)).





Gambar 22. Spektrogram  $^{13}\text{C}$ -NMR(A)-DEPT-135(D), dan DEPT-90 (C) Isolat 2.2

Signal spektrum karbon yang muncul dengan 8 129 87; 130, 54; 132,56; 149,8; 137,34; dan 140,11 ppm (C-3, C-8, C-4, C-7, C-5, dan C-6) menunjukkan karakteristik karbon dari gugus benzena. Signal karbon dari gugus benzena akan keluar secepat berdekatan pada daerah yang cukup *downfield*. Hibridasi atom DC sangat penting untuk menentukan pergeseran kimia, atom karbon dari benzena yang merupakan atom karbon *sp* dan *sp<sup>2</sup>* akan menyerap secara bersamaan pada medan magnet yang lemah sehingga keluar pada daerah yang cukup *downfield* (Supratman, 21010).

Analisa DEPT&B5 menunjukkan terdapat lima karbon metilen (-CH<sub>2</sub>) dengan puncak negatif (Gambar 22B) yaitu pada 30,67; 35,08; 60,01; 72,04; dan 100,10 ppm (C-4", C-3", C-2, C-1" dan C-1'). Tiga karbon kuartener yang ditandai dengan puncak yang hilang (Gambar 22A dan 22B.) yaitu yang keluar pada daerah

yang sangat *downfield* di geseran kimia  $\delta$  177,68 ppm merupakan karbon dari gugus karbonil (C-1) dan pada  $\delta$  129,81 dan 130,54 ppm yang merupakan dua karbon pada gugus benzena pada posisi tersubstitusi (C-3 dan C-8). Sama halnya dengan karbon pada daerah yang sangat *upfield* pada  $\delta$  20,09 merupakan karakteristik karbon dari gugus metil (C-5). Spektrum DEPT-135 ( $\theta = 135^\circ$ ) memberikan sinyal negatif untuk gugus metilester (-CO<sub>2</sub>), sinyal positif untuk gugus metin dan metil, sedangkan tidak memberikan sinyal pada atom karbon kuartener (sinyal hilang) (Supratman, 2010).

Analisa DEPT-90 menunjukkan terdapat enam karbon metin (Gambar 22C) pada  $\delta$  115,99; 131,24; 134,81 dan 131,16 ppm (C-2, C-2', C-4, C-7, C-5, dan C-6). Sinyal karbon pada  $\delta$  20,09 ppm pada DEPT-135 yang diduga merupakan karbon dari gugus metil, pada DEPT-90 tidak muncul dan hal tersebut semakin menguatkan bahwa sinyal pada  $\delta$  20,09 ppm merupakan sinyal dari gugus metil. Spektrum DEPT-90 ( $\theta = 90^\circ$ ) memberikan sinyal positif untuk gugus metin, tetapi sinyal karbon dari karbon kuartener, metil dan metilen tidak muncul (Supratman, 2010),



Gambar 23. Perkiraan Struktur isolat 2.2

Tabel IX. Data spektra <sup>13</sup>C-NMR isolat 2.2

	Kode	Perkiraan gugus fungsi
	C-1	C=O
22,09	C-5"	-CH <sub>3</sub>
129,87; 130,54; 132,56; 140,98; 137,34; dan 140,11	C-3, C-4, C-7, C-5" dan C-6	-C=C- (aromatis)
30,61; 35,08; 60,01; 72,04 dan 100,10	C-2, C-2' dan C-2"	-CH <sub>2</sub> - (metilen)
1,27 dan 115,99	C-2'	-CH- (metin)

d. Analisis Spektrum Massa LC-MS

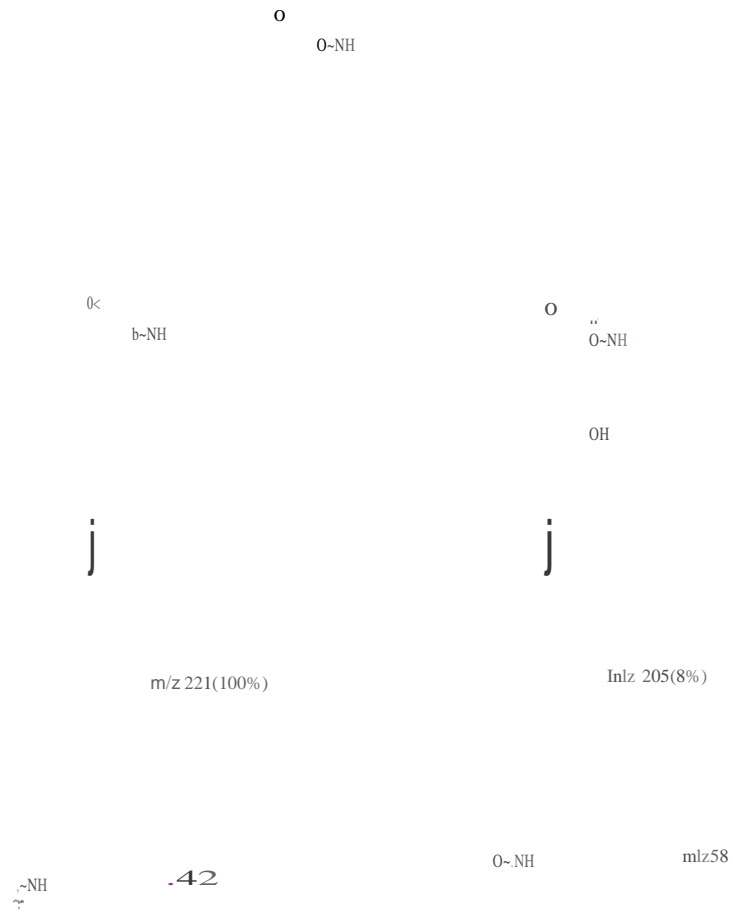
10

Gambar 24. Spektrum Massa Isolat 2.2 dengan Eluen Metanol : Air (90:10 v/v)

Identifikasi isolat 2.2 dengan metode LC-MS menunjukkan adanya 1 puncak dominant pada waktu retensi 2,2 menit (Gambar 16). Dari puncak tersebut selanjutnya dilakukan perekaman spektra massa menggunakan metode ESI-MS

(*Electrospray Ionization - Mass Spectrometry*) (Gambar 24). Spektrum massa isolat 2.2 menunjukkan adanya fragmen pada  $m/z$  221 dengan kelimpahan 100%, hal tersebut menggambarkan fragmen ion stabil yang terdeteksi dengan spektrometer massa. Fragmentasi isolat menunjukkan adanya fragmen  $m/z$ . 235 (37%), 253 (66%), 260 (61%), 263 (35%), 293 (47%) dan fragmen terkecil 137  $m/z$ .

Puncak  $m/z$  263 adalah sesuai dengan  $[M]^+$  dari isolat 2.2 yang mempunyai rumus molekul  $C_{13}H_{21}N_3$  dengan bobot molekul 263,33  $g/mol$ . Berdasarkan *peak* yang dihasilkan pada spektra tersebut, terlihat bahwa ion  $C_{13}H_{21}N_3^+$  mengalami beberapa pola fragmentasi. Pada pola fragmentasi yang pertama, dihasilkan ion  $C_{13}H_{17}O_3^+$  pada *peak* dengan  $m/z$  221 dengan kelimpahan 100% (gambar 25) dan ion  $C_2H_4N^+$  dengan  $m/z$  42. Fragmentasi berikutnya dihasilkan ion  $C_{13}H_{17}O_2^+$  pada *peak* dengan  $m/z$  205 dengan kelimpahan 8% (Gambar 24) dan ion  $C_2H_4O^+$  dengan  $m/z$  58. Pada jalur fragmentasi yang terakhir dihasilkan *peak* yang khusus dengan  $m/z$  76 yang merupakan karakteristik dari gugus benzena.



Gambar 25. Perkiraan Pola Fragmentasi. Isolat 2.2

Berdasarkan keempat analisa struktur molekul 2.2 yang telah dijabarkan diatas dapat diduga bahwa isolat 2.2 merupakan senyawa derivat alkaloid dari L-serin dan L-fenilelanin dengan rumus molekul  $C_{15}H_{21}N_3O_3$  dan rumus bangun seperti terlihat pada Gambar 26. Nama senyawa isolat 2.2 tersebut diperoleh dari program *ChemDraw Ultra 8.0*, yakni *2-iminoethyl 2-(2-(1-hydroxypentan-2-yl)phenyl) acetate*. Analisis lebih lanjut diperlukan untuk memastikan dan

menguatkan abstraksi rumus bangun isolat 2.2 dengan 2D-NMR seperti COSY (Correlated Spectroscopy); HMQC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity) dan HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity).

-O-NH

Gambar 26. Struktur Isolat 2.2  
*2-(1-ethyl-2-(1-hydroxypentyl)phenyl)acetate*

### I. Pembahasan Jalur Biosintesis Isolat 2.2

Struktur senyawa isolat 2.2 menunjukkan adanya gugus imina yang merupakan salah satu gugus pembentuk senyawa alkaloid, Gugus imina terbentuk secara biosintesis berasal dari asam amino L-serin yang mengalami dekarboksilasi oksidatif. Asam amino L-serin adalah prekursor asam giserin-L-fosfat menjadi 3-hidroksi-asam piruvat fosfat dengan katalisis enzim fosfogliserasat dehidrogenase. 3-hidroksi-asam piruvat fosfat dibentuk kembali oleh enzim transferase yaitu fosfogliserasat aminotransferase menjadi L-serin-3-fosfat yang merupakan senyawa intermediat L-serin, Intermediat L-serin-3-fosfat pada akhirnya dibentuk menjadi L-serin dengan katalisis enzim fosfogliserasat fosfatase (Luckner, 1990).

Gugus benzen aromatis isolat 2.2 berasal dari asam amino L-fenilalanin (juga shikimate) yang mengalami jalur reaksi yang kompleks sehingga membentuk asam



benzoat, Asam benzoat akan tereduksi dan kehilangan karbondioksida (CO<sub>2</sub>) sehingga membentuk benzen aromatik yang bersifat nukleofilik, Benzena yang sangat nukleofilik akan menyerang senyawa hidroksi pentanon dan dengan enzim dehidrogenase akan menjadi senyawa intermediet 2-Hidroksipentanon. Senyawa 2-fenilpentanol merupakan senyawa yang teraktifkan pada posisi orto benzena karena substituen hidroksi pentanol mengaktifkan posisi orto dan para, sehingga posisi orto bersifat nukleofilik, Senyawa 2-fenilpentanon yang teraktifkan pada posisi orto akan berinteraksi dengan asam formik asetat yang kemudian disertai reaksi dekarboksilasi (kehilangan CO<sub>2</sub>) untuk membentuk senyawa intermediet 2-hidroksi pentanal benzaldehid

L-Serin yang mempunyai gugus hidroksi akan menyerang gugus karbonil senyawa 2-hidroksipentanal benzaldehid pada posisi karbon alpha yang bermuatan elektropositif kemudian disertai kehilangan satu atom hidrogen dalam membentuk intermediet L-serin 2-hidroksi pentanal benzaldehid. Senyawa L-serin 2-hidroksi pentanal benzaldehid kemudian mengalami penambahan satu gugus hidroksi pada posisi atom N primer L-serin dengan katalis L-serin-N-metilmoksinase untuk membentuk senyawa golongan N-hidroksi-L-serin. Senyawa golongan N-hidroksi-L-serin pada akhirnya akan mengalami reaksi dekarboksilasi oksidatif sehingga kehilangan senyawa CO<sub>2</sub> untuk membentuk senyawa alkaloid imina yaitu isolat 2,2 (2-iminaethyl 2-(2-(1-hydroxypentan-2-yl) phenyl)acetate) (Luckner, 1990; Dewick, 2009). Disimpulkan bahwa kemungkinan jalur biosintesis alkaloid imina isolat 2,2

adalah berasal dari jalur shikimas (asam amino Lfenilalanin) dan jalur asetat (asam amino Lserin) (Lampiran [Q]).

## J. Pembahasan Pendekatan Aktivitas Isolat 2.2

### 1. Pendekatan Struktur Aktivitas

Mekanisme aktivitas antimikroba dari isolat 2.2 dapat dilakukan melalui pendekatan struktur-aktivitas dengan mencari senyawa yang secara struktur mempunyai gugus fungsi yang mirip dengan alkaloid imina. Isolat 2.2 memiliki kemiripan struktur dengan senyawa thiacetazone, kedua senyawa memiliki gugus benzen yang terintegrasi dengan gugus samping karbonil dan imina, Thiacetazone (*N*{4-[(ethanethioamidoimino).methyl]phenyl}acetamide) merupakan obat yang digunakan sebagai antimikobakteri untuk penyakit tuberkulosis, Thiacetazone mempunyai sifat bakteriostatik bahkan pada dosis yang sangat tinggi, sehingga sering digunakan sebagai obat kombinasi bersamaan dengan isoniazid pada pengobatan tuberkulosis level pertama. Thiacetazone digunakan sebagai obat pilihan pertama pada penyakit tuberkulosis yang sudah resisten terhadap obat pilihan utama seperti rifampisin dan isoniazid (Chintu dkk. •1993).

Gambar 27. Struktur Thiacetazone

Thiacetazone yang merupakan antimikobakteri yang bekerja dengan menghambat jalur biosintesis asam mikolik, Asam mikolik adalah asam lemak rantai panjang yang mempunyai penman yang penting sebagai penyusun dinding sel mikobakteri. Mikobakteri patogen membawa jenis asam mikolik yang mempunyai cmcm siklopropana, Ikatan rangkap di posisi tertentu pada prekursor asam mikolik, dibentuk dan dikatalisis oleh enzim asam mikolik siklopropana sintase (CMASs). Asam mikolik siklopropana merupakan faktor kunci dalam permeabilitas sel, imonomodulasi host, dan persistensi sel mikobakteri (Alahari dkk, 2007),

Penelitian Alahar] dkk.,(2007) melaporkan bahwa senyawa thiacetazone memiliki target enzim asam siklopropan mikolik sintase. Uji pada bakteri strain *Mycobacterium bovis* BeG dan *Mycobacterium marinum* menunjukkan bahwa terjadi penurunan produksi asam mikolik setelah diberi perlakuan thiacetazone" Analisis kombinasi metode kromatografi lapis tipis, spektrometri massa dan NMR menunjukkan pada bahwa terjadi penurunan proses siklopropanasi pada kedua sub-tipe alpha dan asam mikolat teroksigenasi pada asam mikolik terpurifikasi,

Penelitian mengenai jalur penghambatan senyawa thiacetazone juga telah diteliti oleh Grzegorzewicz dkk.,(2012),. Peneliti menguraikan proses biosintesis asam mikolat dan target aksi senyawa thiacetazone. Rantai **U**S dan  $C_{54}$  meromikolat dibiosintesis oleh FAS-II melalui penambahan beberapa unit malonat ke prekursor C16-C26 yang dihasilkan oleh FAS-I. Substrat awal FAS-II dan keto-asil-ACP dihasilkan dari proses kondensasi oleh protem M.Tuberkolosis FabH yang merupakan

produk asil-CoA dari FAS-I dengan malonil-AcP, Setelah proses reduksi oleh 3-  
keto-asil-AcP MalA reduktase, penghilangan gugus H<sub>2</sub>O (hidrasi) oleh (3R)-  
hidroksasil HadAB dan HadBC dehidratase, dan reduksi oleh enoil-CoA InhA  
reduktase, baik p-ketoasil-ACP KasA dan KasB sintase akan mengkatalisis proses  
kondensasi dan penambahan produk dari unit malonil-AcP, dengan demikian akan  
memulai proses pemanjangan rantai, Produk FAS-II mungkin mengalami proses  
elongasi dan modifikasi rantai asam fungsional meromikohk yang dikatalisis oleh  
Adolyllet-dependen metiltransferase, Thiacetazone mempunyai peran dalam  
menghambat proses dehidrasi, dengan cara menghambat aktivitas enzim (3R)-  
hidroksasil HadAB dan HadBC dehidratase sehingga trans-enoil-ACP tidak terbentuk  
yang mengakibatkan prekursor C<sub>16</sub>-AMP (meromikolat teraktivasi) tidak  
terbentuk dan pembentukan asam mikolik tidak terjadi,

Gambar 28. Jilin' Pen ghambatan Asem MikoUk oleh Thracetasone (G'l'igol'ze"rj.cz dkk., 2012).

## 2. Pendekatan Penambatan Molekul

Pendekatan aktivitas isolat 2.2 dilakukan dengan metode penambatan molekul (*molecular docking*) untuk mengetahui proses pendekatan aktivitas molekular isolat 2.2 terhadap enzim target pada bakteri tuberkolosis, Analisis pendekatan struktur aktivitas melalui kemiripan struktur pada senyawa thiacetazone dan pendekatan jalur pembentnkan asam mikolat menghasilkan beberapa target enzim yang menjadi tempat aksi senyawa thiacetazone yaitu (3R)-hidroksasil HadAB dan HadBC dehidratase (Grzegorzewicz dkk., 2(12) dan asam siklopropan mikelik simase (Alahari dkk., 2007). Situs resmi makromolekul yaitu <http://www.pdb.org> hanya menyediakan bentuk kristal dad asam siklopropan mikolik sintase yang telah dikompleks bersama dengan ligan dengan kode protein 3HEM (Barkan dick" 200,9). Selain itu, dengan tujuan untuk mengeksplorasi aktivitas isolat 22 dengan lebih luas

terhadap pembentukan asam mikolat, digunakan juga protein target yaitu enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase tuberkolosis (kode protein: 2WGE) (Lackner dkk., 2009). Enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase tuberkolosis memiliki andil yang besar dalam pembentukan asam mikolat, bila aktivitas enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase terhambat maka pembentukan asam mikolat juga akan terhambat,

Enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase dan asam mikolik siklopropan sintase telah dikristalisasi bersama dengan ligan utama yang telah mengalami proses pemetaan posisi interaksi dengan sisi aktif enzim. Enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase memiliki ligan utama yaitu senyawa tiolaktomisin yang merupakan inhibitor enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase. Tiolaktomisin berinteraksi dengan asam amino histidins 11A, sistein131A, dan histidin345A pada kantong aktif enzim (Lackner dkk., 2009). Enzim asam mikolik siklopropan sintase memiliki ligan utama senyawa N-oktil oktan-1-amin yang berinteraksi dengan asam amino giisin145A (Barkan dkk., 2009).

Optimasi dilakukan menggunakan aplikasi *VegaZZ* seperti yang disajikan pada Gambar 29 dan 30. Optimasi geometri sangat diperlukan dalam proses penambatan molekul, senyawa uji dioptimasi geometri agar diperoleh struktur yang stabil. Struktur yang stabil didapatkan dengan menghitung nilai tolakan dari setiap gugus yang memberikan audit yang penting dalam proses interaksi dengan asam amino pada protein target. Parameter nilai tolakan dari setiap gugus fungsi dihitung menggunakan perhitungan mekanik dan pola Gaussian.



Gambar 0. Gambar Tiga Dimensi dari Proses Optimisasi Thieacetosone

Validasi metode penempatan molekul dilakukan dengan membandingkan antara posisi ligan asli N-oktil oktanol-1-amin (3HEM) dan tiolaktomisin (2WGE) terhadap reseptor yang telah diuji secara eksperimental dengan posisi ligan yang sama (*ligand copy*). Iterasi yang digunakan pada validasi protein kode 3HEM adalah sumbu x(21113000), y(19983000), dan z(20998000) sedangkan pada validasi protein kode 2WGE adalah sumbu x(18162000), y(18000000), dan z(17001111). Resolusi grid pada 0,4Å dengan kondisi ligan fleksibel, Kondisi ligan fleksibel menunjukkan ligan memungkinkan untuk melakukan penyesuaian struktur dalam mencapai struktur yang stabil saat berikatan dengan reseptor,

Gambiu' J,I. Hasil Validasi Yliti tu Tumpang- Tindib Pose Senyawa Referensi yang Dipel'oleh d~Ili. Struktur Kiistal Protein Enzim p-keroasil-ACP Kas.Asintase (atom karbon bel":VIU'1111 merah) dan Pos.€Se:nyaw~Hasil *Docking* (atom karbon berwarna kllning)

RMSD (*root mean square devtatton*) merupakan dasar yang digunakan untuk memberikan penilaian pada validitas metode, Metode yang digunakan dikatakan valid jika nilai RMSD yang diperoleh :::;2,5 (Istyastono dkk., 2009).. Berdasarkan basil validasi ligan asli N-oktil oktan-I-amin (3HEM) dan tiolaktomisin (2WGE) terhadap *ligand copy*) diperoleh nilai RMSD sebesar 2,4638 pada protein kode 3HEM dan 0)1608 pada protein kode 2WGE pada kondisi ligan fleksibel. Hasil validasi didapatkan hasil yang valid, hasil tersebut menunjukkan bahwa protokol tersebut dapat digunakan untuk penapisan secara virtual dalam upaya penambatan molekul isolat 2.2 pada protein target Semakin kecil nilai RM:8D maka semakin balk metode yang dilakukan dan parameter penambatan molekul yang digunakan adalah dalam keadaan ligan fleksibel,



GilWbill' 32. Basil Validasi Yilitu Tumpang- Tmdlh Pose Senyawa Referensi yang Diperoleh dari Sruktnr Kristal Protein Enzim Asam rvtikolik Siklopropan Smtase (atom karbon berwarna abu-abu) dan Pose Senyawa Husil.Docking (atom karbon berwarna kuning)

Residu asam amino histidin311 A, sistein 171A, dan histidin345A yang merupakan residu asam amino dari *active site* enzim  $\beta$ -ketoasil-ACP KaaA sintase pada protein dengan kode 2WGE dan residu asam amino giisin145A pada *active site* enzim asam mikolik siklopropan sintase dengan kode 3HEM, Parameter yang diamati adalah energi bebas Gibbs( $\Delta G$  (kkal/mol) hasil interaksi reseptor-ligan, jarak dan residu asam amino yang terdekat dengan ligan  $\leq 5 \text{ \AA}$ ). Hasil *docking* yang dilakukan pada protein target disajikan pada Tabel X, Tabel XI, Tabel XU, dan Tabel XII.

Tabel X. Hasil *Docking* Pilda PreeemEnsfm  $\beta$ -keroasil-ACP KasA sintase

	E.n.ergi Ikatan Reseptor-Ligand ( $\Delta G$ ) (kkal/mol)
Tiolaktomisin ( <i>native ligand</i> )	-8.,8920
Thiacetazone	-5,5030
1801at 2.2	-10;79:34

Tabel XI, Ikatan Hidrogen Senyawa dengan ASilmAmino Enzim  $\beta$ -ketoasil-ACP KaaA sintase

Senyawa Uji	Jumlah Ikatan Hidrogen	Jarak Ikatan (Å)	Asam Amino Yang Berikatan	Gugus Senyawa Yang Berikatan.
Tiolaktomisin ( <i>native ligand</i> )	3	2,9087	Histidin 11	H-O
		2,9876	Sistein 171	H-O
		2,3482	Histidin 345	H-O
Thiacetazone	1		Glisin 403	N-O
Isolat 2.2	5	2,9669	Glisin 318	H-O
		2,1698	Threonin 315	H-O
		2,9996	Sistein 171	H-O
		2,2986	Histidin 311	H-O
		2,8268	Fenilalanin 402	N-O

Hasil perhincangan menunjukkan bahwa senyawa isoilla 2.2 mempunyai skor ikatan yang lebih besar daripada senyawa tiolaktomisin dan thiacetazone (Tabel X), Isolat 2.2 berinteraksi dengan residu asam amino histidins 11 dan sistein 171 pada *site active* enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase (Gambar 35). Skor -LIG senyawa isolat 2.2 lebih besar dibandingkan dengan skor -8.0 tiolaktomisin yang telah diketahui mempunyai aktivitas sebagai penghambat enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase. Oleh karena itu, senyawa isolat 2.2 secara *in silico* dapat dikatakan mempunyai aktivitas sebagai inhibitor protein enzim p-ketoasil-ACP KasA sintase yang lebih baik daripada tiolaktomisin (*native ligand*) sehingga layak untuk diteliti lebih lanjut aktivitasnya,

Gilmb~u'33. Inreraksl Ttolaktemisln dengan ,p-k.etoasil-ACP KasA sint~sle(Luekner dkk; 20(9)

Gambar 34. Visualisasi Inreraksi Thieacetasone dengan Enzim l3~keto~.sil-ACP KasA sintase

Gambar 35. Visualisasi Interaksi Isolat 2.2 dengan Enzim. p-ketoasil-ACP K<sub>1</sub>-sintase

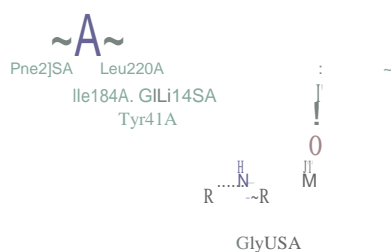
Senyawa	Energi Ikatan Reseptor-Ligand (kcal/mol)
Asil N-oktil oktan-1-amin ( <i>native ligand</i> )	-40986
Thiacetazone	-7,1675
Isolat 2.2	

Dari Tabel XU diketahui bahwa isolat 22 mampu berikatan dengan lebih baik terhadap enzim asam mikolik siklopropan sintase hal itu dibuktikan dari energi ikatan bebas Gibbs ( $\Delta G$ ) isolat 2.2 lebih besar daripada thiacetazone dan asil N-oktil oktan-1-amin (*native ligand*). Isolat 2.2 mampu berinteraksi dengan residu asam amino glisin 145 pada *site active* dari enzim asam mikolik siklopropan sintase dan mampu berikatan dengan residu asam amino sekunder yaitu tirosin-11. Jumlah ikatan hidrogen isolat 2.2 terhadap asam amino pada sisi aktif enzim asam mikolik siklopropan sintase relatif lebih banyak jumlahnya daripada ikatan antara ligan asli dan thiacetazone dengan enzim (Tabel XIII). Jumlah ikatan hidrogen yang lebih banyak akan mendukung kekuatan ikatan yang lebih besar antara senyawa dengan sisi aktif enzim. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa isolat 2.2 mempunyai

aktivitas sebagai inhibitor enzim asam mikolik siklopropan sintase yang lebih baik daripada asil N-oktil oktan-1-amin (*native ligand*) dan thiacetazone secara *in silico*.

Tabel XIII. Ikatan Hidrogen Senyawa dengan Enzim Asam Mikolik Siklopropan Sintase

Senyawa Uji	Jumlah Ikatan Hidrogen	Jarak Ikatan (Å)	Asam Amino Yang Berikatan	Gugus Senyawa Yang Berikatan
Asil N-oktil oktan-1-amin ( <i>Ffilitivazand</i> )	1		Glisin145	H-O
Thiacetazone	2	2,9345 2,9927	Tirosin-11 Glisin145	N-O H-O
Isolat 22	3	2,9002 2,8976 2,8789	Glisin145 Tirosin-11 Tirosin41	H-O N-O H-O



Gambar 36. Interaksi Asil N-oktil oktan-1-amin dengan Asam Mikolik Siklopropan Sintase (Barkandkk., 2009)

Gambar 37. Visualisasi Interaksi Thiocetalone dengan Enzim Asam Lipoik Sintase

Gambar 38. Visualisasi Interaksi Isolat 2.2 dengan Enzim Asam Lipoik Sintase

## DAFTAR PUSTAKA

- Akhter, W., Bhuiyan, M.K.A., Sultana, F., dan Hossain, M.M., n.d. Integrated effect of microbial antagonist organic amendment and fungicide in controlling seedling mortality (*Rhizoctania solani*) and improving yield in pea (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*.
- Alahari, A.; Trivelli, X.; Guerardel, Y.) Dover; L.G., Besra, G.S., Sacchetti, I.; dkk, 2007. Thiacetazone an antitubercular drug that inhibits cyclopropanation of cell wall mycolic acids in mycobacteria. *PloS One*, 2: e1343.
- Alvarez, J. dan Shoichet, B., 2005. *Virtual Screening in Drug Discovery*. CRC Press ..
- Anderson, K.J., 2004. *Organic Spectroscopic Analysis*. Royal Society of Chemistry ..
- Arnold, A.E. dan Lutzoni, F., 2007. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88: 541-549.
- Atkins. P.W., Jones, L., dan Laverman, L.E., 2013. *Chemical Principles*. W. H. Freeman.
- Baldan, R, Cigana, C., Testa, F. Bianconi, I., De Simone M. Pellin D., dkk., 2014. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis airways influences virulence of *Staphylococcus aureus* in vitro and murine models of co-infection. *PloS one*, 9: e89614.
- Barkan, D., Liu Z., Sacchetti, I.C.; dan Glickman, M.S., 2009. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolic Acid Cyclopropane Synthase CmaA2 in Complex with Dioctylamine ..
- Bartlett, I, 2014. Antibiotic Selection for Infections Involving Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*. *Medscape*, CME and Education.
- Bartz, F.E., Glassbrook, N.J., Danehower, D.A., dan Cubeta, M.A., 2013. Modulation of the phenylacetic acid metabolic complex by quinic acid alters the disease-causing activity of *Rhizoctonia solani* on tomato. *Phytochemistry*, 89: 47-52 ..
- Becker) S., 2008. *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons.
- Bonang, G. dan Koeswardono, E.S., 1982. *Mikrobiologi kedokteran: untuk laboratorium dan klinik*. Gramedia,
- Breitmaier, E, dan Voelter, W" 1981, Carbon-13 NMR spectroscopy: high-resolution methods and applications in organic chemistry and biochemistry. VCH Publisher, hal 1-19.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., dan Morse, S.A., 2007. *Medical Microbiology, 24th Edition*. J&L:GrawHill Professional
- Chen, J. dan Foloppe, N., 2013. Tackling the conformational sampling of larger flexible compounds and macrocycles in pharmacology and drug discovery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21: 7898-7920.
- Chintu, C., Luo, C., Bhat, G., Raviglione, M., Dul'ont, H., dan Zumla, A., 1993. Cutaneous hypersensitivity reactions due to thiacetazone in the treatment of

- tuberculosis in Zambian children infected with HIV -1 *Archives of Disease in Childhood*, 68: 665-668.
- Choudhary, np.; 2009" Diuretic activity of the leaves of *Coleus aromaticus* Benth, *Ancient Science of Life* 29: 20-21.
- Contreras; L. Toro, C.S., Troncoso; G.; dan Mora, G'C, 1997. *Salmonella typhi* mutants defective in anaerobic respiration are impaired in their ability to replicate within epithelial cells. *Microbiology (Reading, England)*, 143 ( Pt 8): 2665-2672.
- mlimartha, S., 2006. *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Niaga Swadaya.
- Denyer, S.P.", Hodges, N., Gorman. S.P., dan Gilmore, B..F., 2011. *Hugo and Russell' harmaceuucal Microbiology* ..John Wiley & Sons.
- Dewick, P.M., 2009. *Medicinal Natural Products: A Btosynthenc Approach*. Wiley ..
- Dewick, P.M., 210L. *Medicinal Natural Products: A Biosyntheuc Approach* ..John Wiley & Sons ..
- Dewoto, R, 2007. Pengembangan obat tradisional Indonesia menjadi fitofarmaka, *Majalah Kedokteran Indonesia* 57: 5-6.
- El-hawary, S,S" El-sofany, R.B. Abdel-Monem, AR. Ashour, R.S" dan Sleem, A.A 2012. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* ( @fiU.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae) 4: 45--64.
- El-Mansi, T, E.M., El-Mansi, E..M.T., Bryce, C.F.A.. Demain, A.L., dan Allman, AR..2012. *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Third Edition, 3 edition*. ed..eRC Press, Boca Raton" FL.
- Gandjar, .L dan Rohman, A., 2007 .. *Kimia Farmasi Analtsis*. Pustaka Pelajar, Yogyakarta.
- Garcia, v.G., Onco, M.A.P. •dan Susan, V.R., 2006..Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 4; .55-79,
- Ghosh; RB.. Sur, T.K.; Maity, L.N.; dan Chakraborty; S.C.; 2000, Antiuro lithiatic activity of *coleus Aromaticus* Benth, In Rats. *Ancient science of life*, 20; 44-47.
- Gillespie S. dan Hawkey P,M. 2006, *Principles and Practice of Clinical Bacteriology*. John Wiley & Sons.
- Gleeson, C. dan Gray, N., 2002. *The Coliform Index and Waterborne Disease: Problems of Microbial Drinking Water Assessment* CRC Press.
- Goldman, E. dan Green, L.H., 2008 .. *Practical Handbook of Microbiology, Second Eduton*. eRe Press.
- Goncalves, T.B., Braga, M.A., de Oliveira, F..F.M., Santiago, G.M.P., Carvalho, C.B.M., Cabral, P.B.. e, dkk., 2012. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiellapneumoniae*. *Pbytomedicine*, 19; 962-968.
- Graumann. P. 2012. *Bacillus: Cellular and Molecular BiologV*. Horizon Scientific Press.



- Grzegorzewicz, A.E., Kordulakova, I., Jones, V., Born, S.E.M., Belardinelli, J.M., Vaquie, A., dkk. 2012. A common mechanism of inhibition of the *Mycobacterium tuberculosis* mycolic acid biosynthetic pathway by isoxyl and thiacetazone. *The Journal of Biological Chemistry* 287: 38434-38441.
- Guilfoile, P. dan Alcamo, I.E., 2007. *Antibiotic-Resistant Bacteria* Infobase Publishing
- Habib, M.R. dan Karim; M.R., 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradici-Svacetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycobiology.*, 37: 3]-36.
- Hadioetomo, R.S., 1990. *Mikrobiologi dasar dalam praktek: teknik dan prosedur dasar laboratorum*. PT Gramedia,
- Harborne, I.B., 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysts*. Springer.
- Harwood, L.M. dan Moody, C.T., 1989. *Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice* Blackwell Scientific Publications Oxford England" Boston.
- Heftmann, E. 2004. *Chromatography: Fundamentals and Applications of Chromatography and Related Differential Migration Methods - Part A: Fundamentals and Techniques*. Elsevier.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia* diterjemahkan oleh Badan Litbang Kebutanan. Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, hal. 1698-1699 ..
- Higginbotham, S.I., Arnold, A.E., Ibanez, A., Spadafora, C., Coley, P.D., dan Kumar" T.A., 2013. Bioactivity of fungal endophytes as a function of endophyte taxonomy and the taxonomy and distribution of their host plants. *PloS one*, 8: e73192.
- Hoffmann, E. de dan Stroobant, V., 2013. *Mass Spectrometry; Principles and Applications* John Wiley & Sons
- Holt, J. dan, 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* Lippincott Williams & Wilkins.
- Hostettmann, K; Marston A. dan Hostettmann, M. 1998. *Preparative Chromatography) Techniques: Applications in Natural Product Isolation*. Springer,
- Iludziki, I., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol,
- Hullatti, K. dan Bhattacharjee, P. 2011. Pharmacognostical Evaluation of Different Parts of *Coleus ombotnicus* Lam. Lamiaceae. *Pharmacognosy Journal*, 3: 39-44.
- Istyastono, E., Yuniarti, N., dan Lumina, 2009. Sintesis Senyawa Berpotensi sebagai Inhibitor Angiogenesis: 2-benzilidenasikloheksana-1,3-dion. *Majalah Farmasi Indonesia*, (1-8).
- Iwamoto, M., Mu, V., Lynfield, R.; Bulens, S., Nadle, J., Aragon, D.; dkk., 2013. Trends in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatrics*, 132: e817-824.

- Jasperse, Z. 14 Melting Range. URL:  
[http://web.mnstate.edu/~jasp/jchem3\\_55INI6iltin\\_g20Range.doc.pdf](http://web.mnstate.edu/~jasp/jchem3_55INI6iltin_g20Range.doc.pdf)
- Joshi, R., Badakar, V., dan Holkute, S.; 2011. Carvacrol Rich Essential Oils of *Coleus aromaticus* (Benth.) from Western Ghats Region of North West Karnataka, India. *Advances in Environmental Biology*, 5: 1307-1310.
- Kayser, F.E. dan Bienz, K.A. 2001. *Medical Microbiology*. Thieme.  
 Kemp, W.; 1915. *Organic Spectroscopy*. Wiley; New York.
- Kharwa, N.; Verma, V.C., Kumar, A., Gond S.K., Harper, J.K.; Hess, W.M.; dkk., 2009. Javanicin, an antibacterial naphthaquinone from an endophytic fungus of neem, *Chloridium* sp. *Current microbiology*, 58: 233-238.
- Kiwalska, T. dan Sherma, J., 2006. *Preparative Layer Chromatography*. Elsevier Press.
- Krai, A., Desiderio, D.M., dan Nibbering, N.M., 2008. *Mass Spectrometry: In Instrumentation, Interpretation, and Applications*. John Wiley & Sons.
- Krieg, N.R., Aronson, A., Ludwig, W., Whitman, W.B., Hedlund, B.P., Paster, S.L., dkk. 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Firmicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia; Chlamydiae, and Planctomycetes*. Springer.
- Kulandaivehi, S. dan Janarthanan S., 2001. *Practical Manual on Fermentation Technology*. LK. International Publishing House Pvt. Limited.
- Kumaran, A. dan Karunakaran, R.I., 2007. Activity-guided isolation and identification of free radical-scavenging components from an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 100: 356-361.
- Luckner, M., 1990. *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals: With 83 Tables*. Fischer.
- Luckner, S.R.; Machutta, C.A.; Tonge, P.I.; dan Kisker, C.; 2009. Crystal Structures of Mycobacterium Tuberculosis KaaA Show Mode of Action within Cell Wall Biosynthesis and its Inhibition by Thiolactomycin. *Structure*, 17: 1004-1011.
- Macomber, R.S.; 1998. *A Complete Introduction: to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley.
- Margine, S. 2008, Produksi metabolit sekunder (antibiotik) oleh isolat jamur endofit Indonesia. *Majalah Farmasi Indonesia*, 19: 86 - 94.
- Ma, Y.M., Li, Y., Liu, J.Y., Song, Y.C., dan Tan, R.X., 2004. Anti-Helicobacter pylori metabolites from Rhizoctonia sp. Cy064, an endophytic fungus in a Cynodon dactylon. *Fitoterapia*, 75: 451-456.
- McLafferty, F.W. 1993. *Interpretation of Mass Spectra*. University Science Books.
- McNeil, B. dan Harvey, L., 2008. *Practical Fermentation Technology*. Wiley, Chichester, England. Hoboken NJ.
- Mohamed, T., Zhao, S.; White, D.O.; dan Parveen, S., 2014. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Kentucky* isolated from pre- and post-chill whole broilers carcasses. *Food Microbiology*, 38: 6-15.

- Mohan, J., 2004. *Organic Spectroscopy. Principles and Applications*. CRC Press.
- Motiejunas, D. dan Wade, R.C., 2007. 4.09 ~ Structural, Energetic, and Dynamic Aspects of Ligand-Receptor Interactions, dalam: Triggler, I.B.T.J. (Ed.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier Oxford, hal. 193-213.
- Murthy, P.S., Ramalakshmi, K., dan Srinivas, P.; 2009. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. *Food Chemistry*, 114; 1014-1018.
- Narayanan KB. dan Sakthivel, N., 2011. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Research Bulletin*, 46: 1708-1713.
- NCeLS, 1999. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guidelines*.
- Nisak, U.K., 2013. Isolasi Fungi Penghasil Senyawa Antimikroba dari Tanaman Jintan (*Coleus amboinicus* Lour.) dan Karakterisasi Senyawa Aktifnya dengan Metode KLT-Bioautografi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
- Pace 1.L. Rupp, M.E., dan Finch, R.G." 2005. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. CRC Press,
- Pane C., Piccolo A., Spaccini, R., Celano, G., Vilecco, D., dan Zaccardelli, M" 2013. Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor*. *Applied Soil Ecology*, 65: 43-51.
- Patel, R. Mahobia, N., Waseem, N., Upwar, N., dan Singh, S., 2010. Phyto-Physicochemical Investigation of Leaves of *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng. *Pharmacognosy Journal*, 2: 536-542.
- Pavia, D.; Lampman, G., Kriz, G.; dan Vyvyan, J., 2014. *Introduction to Spectroscopy*. Cengage Learning.
- Pirttila, A.M. dan Frank, A.C., 2011]. *Endophytes of Forest Trees: Biology and Applications*. Springer.
- Prihatiningtias, W., 2005. Senyawa Bioaktif Fungi Endofit Akar Kuning (*Fibraurea chloroleuca* Miers) sebagai Senyawa Antimikroba, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta,
- Putri, A.E.P., Dr. Puji Astuti, M.S., dan Prof. Dr. Wahyono., S.U., 2014. Penelusuran Senyawa Sitotoksik Ekstrak Etil Asetat Kultur Fungi Endofit Kode AAI dari Tanaman *Artemisia annua* Linn. Terhadap Sel T47D. Universitas Gadjah Mada.
- Ratnaweera, P.B., Williams, D.E., de Silva, R.D., Wijesundera, R.L.C., Dalisay, D.S., dan Andersen, R.I., 2014. Helvolic acid, an antibacterial nortriterpenoid from a fungal endophyte, *Xylaria* sp. of orchid *Anoectochilus setaceus* endemic to Sri Lanka. *Mycology* 5; 23-28.
- Ren, C.L., Konstan, M.W.; Yegin, A., Rasouliyan, L., Trzaskoma, B., Morgan, W.I., dan dkk., 2012. Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung

- function decline in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, 11: 293-299.
- Santoni A, 2009. Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Kulit Batang Surian (*Toona sinensis*) Meliaceae dan Uji Aktivitas Insektisida. Program Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Sastrohamidjojo, H., 2001. *Spektroskopi*, II. ed, Liberty; Yogyakarta,
- Schneider; G. dan Baringhaus, K.-H., 2008. *Molecular Design: Concepts and Applications*. Wiley.
- Sebastianes, F.L.S., Cabedo N., El Aouad, N., Valente, A.M.M.P., Lacava, P.r., Azevedo, J.L., dkk., 2012. 3-hydroxypropionic acid as an antibacterial agent from endophytic fungi *Diaporthe phaseolorum* .. *Current microbiology*, 65: 622-632.
- Selvakumar, P., naveena, B.E., dan prakash, S.D., 2012. Studies on the antidiarrhoeal activity of the essential oil of *Coleus ambotnicas* and *Eucalyptus globulus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, **Supplement** 2: 871.5-8719.
- Setiabudy, R dan Gall, V.RS .. 1995. "Pengantar Antimikroba", Dalam *Farmakologi dan Terapi*, Edisi Keempat, ed. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia Ganiswara, Jakarta.
- Sharma O.P., 1998. *Textbook of Fungi*. Tata McGraw-Hill Education.
- Siegel M.R; Latch M.C. Bush; L.P.; Fannin F.F.; Rowan D.D. Tapper; Raj dkk., 1990. Fungal endophyte-infected grasses: Alkaloid accumulation and aphid response. *Journal of chemical ecology*; 16: 3301-3315.
- Stahl, E., 1969. *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag, Berlin, hal, 234.
- Stanbury. P.F., Hall, S., dan Whitaker, A.. 1999. *Principles Of Fermentation Technology, Second Edition.*; 2 edition, ed. Butterworth-Heinemann, Oxford, U.K.~Tarrytown N.Y., U.S.A
- Stepniewska, Z. dan Kuzniar A. 2013. Endophytic microorganisms=promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Applied microbiology and biotechnology*; 97: 9589-9596,
- Strobel, G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5; 535-544.
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., dan Harper, J., 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of natural products*, 67: 257-268.
- Stuart, B.H., 2004. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. John Wiley & Sons ..
- Supratman, D., 2010. *Elucidasi Struktur & Senyawa Organik*; 1st ed, L Widya Padjajaran, Bandung.
- Syamsuhidayat, S., dan Hutapea J. 1999. Inventaris Tumbuhan Obat Indonesia. Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Jakarta hal. 166-167.

- Tanaka, M., Sukiman, H., Saito" M., Suto, K., Prana, M., dan Tomita, F., 1999.. Isolation" Screening and Phylogene-tic Identification of Endophytes from Plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment*, 14: 237-241.
- Tan; RX. dan Zou, W.x., 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural product reports*; 18; 448--459.
- Todar, K.; 2006. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. University of Wisconsin-M\_aClisoDDepartment of Bacteriology.
- Tortora, G., Funke, B., dan Case, C., 2010. Microbiology: An Introduction, Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco, hal, 554-579, 572.....575.
- Verma, V.C., Lobkovsky, E., Gange, A.C., Singh, S.K., dan Prakash, S., 2011. Piperine production by endophytic fungus *Pertconta sp.* isolated from *Piper longum L.*. *The Journal of antibiotics*, 64: 427-431.
- Vijayafel, K., Anoulevem, C; dan Ashokku:mar, 8., 2013 .Protective Effect of *Coleus aromaticus* Benth (Lamiaceae) against Naphthalene-induced Hepatotoxicity. *Biomedical and Environmental Sciences* 26: 295-302.
- Wagner, H. dan Blatt S., 1996. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York hal 359L364.
- Winny. S., 2009. *Buku Ajar UntulcMohasiswa Farmasi Dan Praktisi Kimia Farmasi* 2nd ed..Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Xiao, J. Zhang, Q., Gao, Y-Q ., Shi, X.~W., dan Gao, J.-M., 2014 ..Antifunga] and anribacteria] metabolites from an endophytic *Aspergillus sp.* associated with Mdma azedaraoh .*Naturalproduct research:*..
- Yu, E., Zhang, L, Li, L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., dkk., 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research*, HiS; 437--449.
- Zcflagui, A. Gherraf N., Ladjel, S. dan Hameurlaine, S. 2012. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils from *Launaea resedifolia L* *Organic and Medicinal Chemistry Letters*, 2: 2.

# Monograf

---

## ORIGINALITY REPORT

---

14%

SIMILARITY INDEX

11%

INTERNET SOURCES

3%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

---

## PRIMARY SOURCES

---

1	Submitted to Universitas Brawijaya Student Paper	1%
2	Submitted to Sriwijaya University Student Paper	1%
3	Submitted to Universitas Muhammadiyah Surakarta Student Paper	1%
4	Submitted to University of Muhammadiyah Malang Student Paper	1%
5	Submitted to Universitas Jenderal Soedirman Student Paper	1%
6	Submitted to Universitas Islam Indonesia Student Paper	1%
7	Submitted to Udayana University Student Paper	1%
8	Submitted to University of Nottingham Student Paper	<1%

---

9

Submitted to Higher Education Commission  
Pakistan

Student Paper

&lt;1%

10

Submitted to Universitas Indonesia

Student Paper

&lt;1%

11

Submitted to University of Western Sydney

Student Paper

&lt;1%

12

Submitted to Universiti Teknologi MARA

Student Paper

&lt;1%

13

Submitted to Universitas Muria Kudus

Student Paper

&lt;1%

14

Submitted to iGroup

Student Paper

&lt;1%

15

Submitted to Cardiff University

Student Paper

&lt;1%

16

Submitted to Nguyen Tat Thanh University

Student Paper

&lt;1%

17

Submitted to University of Salford

Student Paper

&lt;1%

18

Submitted to University of Edinburgh

Student Paper

&lt;1%

19

Submitted to Politeknik Negeri Bandung

Student Paper

&lt;1%

20	Submitted to Universitas Sebelas Maret Student Paper	<1%
21	Submitted to UC, Boulder Student Paper	<1%
22	Submitted to Universiti Kebangsaan Malaysia Student Paper	<1%
23	Submitted to University of Gloucestershire Student Paper	<1%
24	Submitted to Laureate Education Inc. Student Paper	<1%
25	Submitted to Institute of Graduate Studies, UiTM Student Paper	<1%
26	Submitted to South Dakota State University Student Paper	<1%
27	Submitted to Universitas Jember Student Paper	<1%
28	Submitted to De Montfort University Student Paper	<1%
29	Submitted to University of Pretoria Student Paper	<1%
30	Submitted to University of Southern California Student Paper	<1%
31	Submitted to University of Strathclyde Student Paper	<1%



<1 %

32

Submitted to University of Mysore, Mysore

Student Paper

<1 %

33

Submitted to Universidad Europea de Madrid

Student Paper

<1 %

34

Submitted to University of Birmingham

Student Paper

<1 %

35

Submitted to CSU, Los Angeles

Student Paper

<1 %

36

Submitted to UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Student Paper

<1 %

37

Submitted to Universität Hohenheim

Student Paper

<1 %

38

Submitted to 87986

Student Paper

<1 %

39

Submitted to Manipal University

Student Paper

<1 %

40

Submitted to Padjadjaran University

Student Paper

<1 %

41

Submitted to Chungnam National University

Student Paper

<1 %

Submitted to Management & Science University

Student Paper

<1 %

---

43 Submitted to South Bank University <1 %  
Student Paper

---

44 Submitted to University of Queensland <1 %  
Student Paper

---

45 Submitted to Universiti Malaysia Sabah <1 %  
Student Paper

---

46 Submitted to Lambung Mangkurat University <1 %  
Student Paper

---

47 Submitted to State Islamic University of Alauddin Makassar <1 %  
Student Paper

---

48 Submitted to School of Business and Management ITB <1 %  
Student Paper

---

49 Submitted to University of Western Ontario <1 %  
Student Paper

---

50 Submitted to Pacific University <1 %  
Student Paper

---

51 Submitted to Universitas Muhammadiyah Riau <1 %  
Student Paper

---

52 Submitted to UIN Syarif Hidayatullah Jakarta <1 %  
Student Paper

---

Submitted to CSU, Long Beach <1 %  
Student Paper

---

54	Submitted to VIT University Student Paper	<1 %
55	Submitted to Cleveland State University Student Paper	<1 %
56	Submitted to University of Westminster Student Paper	<1 %
57	Submitted to Universitas Riau Student Paper	<1 %
58	Submitted to Universiti Malaysia Terengganu UMT Student Paper	<1 %
59	Submitted to University of Pune Student Paper	<1 %
60	Submitted to University of Seoul Student Paper	<1 %
61	Submitted to Widener University Student Paper	<1 %
62	Submitted to University of Mauritius Student Paper	<1 %
63	Submitted to Monash University Student Paper	<1 %
64	Submitted to University of Leicester Student Paper	<1 %

65

Submitted to Birkbeck College

Student Paper

<1%

---

66

Submitted to Universitas Jambi

Student Paper

<1%

---

67

Submitted to University of Cumbria

Student Paper

<1%

---

68

Submitted to The University of Memphis

Student Paper

<1%

---

69

Submitted to 61459

Student Paper

<1%

---

70

Submitted to Endeavour College of Natural Health

Student Paper

<1%

---

71

Submitted to Universitas Andalas

Student Paper

<1%

---

72

Submitted to University of Wales, Bangor

Student Paper

<1%

---

73

Submitted to Universiti Brunei Darussalam

Student Paper

<1%

---

74

Submitted to Universitas Pendidikan Indonesia

Student Paper

<1%

---

75

Submitted to Universiti Teknologi Malaysia

Student Paper

<1%

---

76	Submitted to Universiti Teknologi Petronas Student Paper	<1 %
77	Submitted to University of New South Wales Student Paper	<1 %
78	Submitted to University of Massachusetts, Lowell Student Paper	<1 %
79	Submitted to CSU Northridge Student Paper	<1 %
80	Submitted to University of Newcastle upon Tyne Student Paper	<1 %
81	Submitted to Universidad Nacional de Colombia Student Paper	<1 %
82	Submitted to Coventry University Student Paper	<1 %
83	Submitted to University of Bath Student Paper	<1 %
84	Submitted to Tikrit University Student Paper	<1 %
85	Submitted to Bradford College, West Yorkshire Student Paper	<1 %
86	Submitted to University of Lincoln Student Paper	<1 %

87

Submitted to National Institute of Education

Student Paper

&lt;1%

88

Submitted to Unika Soegijapranata

Student Paper

&lt;1%

89

Submitted to Univerza v Ljubljani

Student Paper

&lt;1%

90

Submitted to UC, Irvine

Student Paper

&lt;1%

91

Submitted to Aristotle University of Thessaloniki

Student Paper

&lt;1%

92

Submitted to International Islamic University  
Malaysia

Student Paper

&lt;1%

93

Submitted to Royal Melbourne Institute of  
Technology

Student Paper

&lt;1%

94

Submitted to Sultan Agung Islamic University

Student Paper

&lt;1%

95

Submitted to Forum Komunikasi Perpustakaan  
Perguruan Tinggi Kristen Indonesia (FKPPTKI)

Student Paper

&lt;1%

96

Submitted to Associatie K.U.Leuven

Student Paper

&lt;1%

97

Submitted to Universitas Sanata Dharma

Exclude quotes Off

Exclude matches Off

Exclude bibliography On

# Monograf

---

## GRADEMARK REPORT

---

FINAL GRADE

**/100**

GENERAL COMMENTS

**Instructor**

---

PAGE 1

---

PAGE 2

---

PAGE 3

---

PAGE 4

---

PAGE 5

---

PAGE 6

---

PAGE 7

---

PAGE 8

---

PAGE 9

---

PAGE 10

---

PAGE 11

---

PAGE 12

---

PAGE 13

---

PAGE 14

---

PAGE 15

---

PAGE 16

---

PAGE 17

---

PAGE 18

---

PAGE 19

---

PAGE 20



---

PAGE 21

---

PAGE 22

---

PAGE 23

---

PAGE 24

---

PAGE 25

---

PAGE 26

---

PAGE 27

---

PAGE 28

---

PAGE 29

---

PAGE 30

---

PAGE 31

---

PAGE 32

---

PAGE 33

---

PAGE 34

---

PAGE 35

---

PAGE 36

---

PAGE 37

---

PAGE 38

---

PAGE 39

---

PAGE 40

---

PAGE 41

---

PAGE 42

---

PAGE 43

---

PAGE 44

---

PAGE 45

---

PAGE 46

---

PAGE 47

---

PAGE 48

---

PAGE 49

---

PAGE 50

---

PAGE 51

---

PAGE 52

---

PAGE 53

---

PAGE 54

---

PAGE 55

---

PAGE 56

---

PAGE 57

---

PAGE 58

---

PAGE 59

---

PAGE 60

---

PAGE 61

---

PAGE 62

---

PAGE 63

---

PAGE 64

---

PAGE 65

---

PAGE 66

---

PAGE 67

---

PAGE 68

---

PAGE 69

---

PAGE 70

---

PAGE 71

---

PAGE 72

---

PAGE 73

---

PAGE 74

---

PAGE 75

---

PAGE 76

---

PAGE 77

---

PAGE 78

---

PAGE 79

---

PAGE 80

---

PAGE 81

---

PAGE 82

---

PAGE 83

---

PAGE 84

---

PAGE 85

---

PAGE 86

---

PAGE 87

---

PAGE 88

---

PAGE 89

---

PAGE 90

---

PAGE 91

---

PAGE 92

---