

Rollando, S.Farm., M.Sc., Apt.

**SENYAWA
ANTI BAKTERI
dari
Fungi Endofit**

SENYAWA ANTIBAKTERI DARI FUNGI ENDOFIT

Rollando, S.Farm., M.Sc., Apt.



SENYAWA ANTIBAKTERI DARI FUNGI ENDOFIT

Penulis:

Rollando, S.Farm., M.Sc., Apt.

Editor / Tata Letak:

Soetam Rizky Wicaksono

Penerbit

CV. Seribu Bintang

Malang – Jawa Timur - Indonesia

website: www.SeribuBintang.co.id

email : info@seribubintang.co.id

FB : www.fb.com/cv.seribu.bintang

ISBN : 978-623-7000-07-5

Edisi Pertama, Oktober 2019

Hak Cipta dilindungi oleh Undang-undang

Hak Cipta pada penulis

Hak Cetak dan Distribusi pada penerbit

Prakata



Puji syukur kepada Tuhan yang Maha Pengasih dan Penyayang atas segala karunia dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan buku “Senyawa Antibiotik dari Fungi Endofit”. Materi dalam buku ini membahas tentang konsep dasar fungi endofit, uji antibakteri, metode isolasi antibakteri dan senyawa antibakteri dari fungi endofit. Materi-materi dalam buku ini diharapkan dapat memudahkan mahasiswa baik dalam tingkan S1 dan S2 memahami peran fungi endofit dalam menghasilkan senyawa bioaktif.

Penulis mengucapkan mengucapkan banyak terima kasih kepada rekan sejawat yang telah memberikan kritik dan saran yang mendukung dalam penyusunan buku ini. Kepada pendamping hidupku yaitu Eva Monica, S.Farm.,M.Sc.,Apt. dan anak ku tercinta, terima kasih atas pengertian dan dukungannya yang tidak pernah habis. Buku ini juga aku persembahkan kepada orang tuaku yang tidak pernah lelah untuk berdoa dan berjuang untuk memberikan yang terbaik baik anak-anaknya. Kepada semua yang telah mambantu tersusunnya buku ini yang tidak bisa saya sebutkan satu per satu, tidak lupa saya mengucapkan banyak terima kasih.

Kritik dan saran yang membangun senantiasa saya nantikan guna penyempurnaan buku ini.

Malang, 1 Oktober 2019

Rollando,S.Farm.,M.Sc.,Apt.

Daftar Isi

Prakata	1
BAB I PENDAHULUAN	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	8
1. Tinjauan tentang tanaman jinten (<i>Coleus amboinicus</i> Lour.)	9
2. Tinjauan tentang mikroba endofit	13
3. Tinjauan tentang bakteri uji	15
4. Tinjauan tentang fermentasi	22
5. Tinjauan tentang antibakteri	24
6. Tinjauan tentang uji aktivitas antibakteri	26
7. Tinjauan tentang kromatografi	28
8. Tinjauan tentang identifikasi senyawa aktif	30
9. Tinjauan tentang penambatan molekul	35
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN	37
A. Hasil Identifikasi Fungi Endofit Kode DJ2	38
B. Hasil Produksi Metabolit Sekunder Fungi Endofit Kode DJ2	40
C. Hasil Pengambilan Metabolit Sekunder	42
D. Hasil Fraksinasi Senyawa Aktif Ekstrak Etil Asetat secara KLT Preparatif	44
E. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi (Skrining Senyawa Aktif)	49
F. Hasil Isolasi Senyawa Aktif Antibakteri	53
G. Hasil Uji Antibakteri	60
H. Hasil Identifikasi Senyawa Aktif Antibakteri	63
I. Pembahasan Jalur Biosintesis Isolat 2.2	77

Daftar Pustaka	79
Glosarium	91
Indeks	94

BAB I

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 antibiotika dapat menyulitkan dalam proses pengobatan penyakit; misalnya berkembang bakteri *Salmonella kentucky* dan *Salmonella typhimurium* yang resisten terhadap sefalosporins (Mohamed dkk., 2014), resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik *tobramycin*, *gentamicin*, 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 (2007), Indonesia memiliki lebih 30.000 spesies tumbuhan dan 5463 spesies tumbuhan merupakan tumbuhan obat yang dapat dijadikan sumber isolat jamur endofit. Salah satu tumbuhan berkhasiat obat yang memiliki banyak manfaat misalnya tumbuhan jinten (*Coleus amboinicus* Lour). Hullatti dan Bhattacharjee (2011) menyatakan tumbuhan 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 (seskuiterpen bisiklik), dan flavonoid (kuersetin, apigenin, luteolin, salvigenin, dan genwanin) (Narayanan dan Sakthivel, 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 inangnya. Fungi endofit mempunyai hubungan mutualistik dengan tanaman inangnya yaitu proteksi terhadap herbivore, serangga dan patogen (Siegel dkk., 1990). Fungi endofit menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas biologi, diantaranya steroid, terpenoid, fenolik, alkaloid dan sebagainya (Tan 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 inangnya, walaupun hal ini jarang terjadi. Sebagai contoh adalah fungi endofit *Diaporthe phaseolorum* yang menghasilkan senyawa antibakteri, yaitu asam 3-hidroksiopropanoat 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* Lour.)

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 ruas yang menyentuh tanah akan keluar akar. Daun tunggal dan tebal berdaging, letak berhadapan, bertangkai bentuk budar telur ujung meruncing 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 diremas. Perbungaannya majemuk berupa tandan dengan panjang 20 cm keluar dari ujung percabangan, dan ketiak daun dengan warna biru 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	: Labiatae
Marga	: <i>Coleus</i>
Jenis	: <i>Coleus amboinicus</i> Lour.

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



Gambar 1. Tanaman Jinten (*Coleus amboinicus* 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). Vijayafel (2013) 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 kafeat, 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 menyebut minyak terbang. Minyak atsiri tersusun dari jalur biosintesis metabolit sekunder yaitu jalur asetat-mevalonat untuk

golongan terpenoid dan jalur sikimat-fenil propan untuk golongan aromatik (Dewick, 2011). Minyak atsiri daun jinten mengandung senyawa p-cimen, metil kavikol, timol, karvakol, α -kubeben, β -karyopilen, trans- α -bergamot, α -humulen, γ -gurjujen, α -kalakoren, karyopilen oksida, α -korokalen, β -karyopilen, metil eugenol, terpinolen, 1,8-sineol, β -pinen, α -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 fenil propanoid, 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 (C_6) terikat pada rantai propana (C_3) sehingga membentuk struktur $C_6-C_3-C_6$. Senyawa flavonoid dapat menghasilkan 3 struktur senyawa yaitu flavonoid, isoflavonoid dan neoflavonoid. Senyawa flavonoid pada daun jinten adalah flavon salvigenin, 6-metoksigenkwanin, 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, rhemumatik, aprodhisiak dan perut kembung (Dalimartha, 2006). Uji aktivitas antioksidan in vitro terhadap superoksid oksidase menunjukkan

bahwa ekstrak air daun jinten memiliki daya antioksidan yang sedang dengan nilai EC_{50} sebesar 73,9 $\mu\text{g/ml}$ (Kumaran dan Karunakaran, 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 induksi naftalen dosis tinggi (Vijayafel 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* (Gonçalves dkk., 2012). Ekstrak etanol dan air daun jinten mempunyai aktifitas diurutik dengan pemberian dosis 500 mg/kg dengan terbukti meningkatkan total volume urin dan konsentrasi elektolit (Choudhary, 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 antiurolitiatik melawan batu 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; Stępniewska dan Kuźniar, 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 menebang tanaman aslinya untuk diambil sebagai simplisia, yang kemungkinan besar memerlukan puluhan tahun untuk dapat dipanen (Higginbotham dkk., 2013).

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-hydroxybutanonitrile adalah antifungi

dan antibakteri yang diisolasi dari fungi endofit *Aspergillus sp.* pada tumbuhan *Melia azedarach* yang efektif menghambat fungi fitopatogenik (*Gibberella saubineti*, *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 MIC sebesar 25-100 μM (Xiao dkk., 2014).

Camptothecin adalah senyawa inhibitor topoisomerase 1 yang dihasilkan oleh tumbuhan *Camptotheca acuminata*. Senyawa ini ternyata dapat diisolasi dari *Fusarium solani*, fungi endofit yang tumbuh pada tumbuhan *Camptotheca acuminata* (Pirttilä dan Frank, 2011). Khawaran dkk. (2009) menemukan senyawa antibiotik *javanicin* dari fungi endofit *Chloridium sp.* yang juga dihasilkan oleh tumbuhan inangnya *Azadirachta indica*. Ratnaweera dkk. (2014) mengisolasi asam helvolat dari kultur fungi endofit *Xylaria sp.* yang terdapat pada *Anoectochilus setaceus*. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antibiotik dengan nilai MIC sebesar 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ terhadap *Bacillus subtilis* dan nilai MIC sebesar 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ terhadap *Staphylococcus aureus*. *Cryptocandin* adalah antifungi yang dihasilkan oleh mikroba endofit *Cryptosporiopsis quercina* yang berhasil di isolasi dari tanaman obat *Tripterigeum wilfordii*, dan berhasiat sebagai antijamur yang patogen terhadap manusia yaitu *Candida albicans* dan *Trichopyton spp.* (Strobel, 2003)

3. 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 kedua yaitu *safranin* (Goldman dan Green, 2008).

a. Staphylococcus aureus

S.aureus merupakan bakteri Gram positif yang berbentuk bulat dengan diameter 0,8–1,0 μm dan tersusun bergerombol tidak beraturan, kadang-kadang seperti untaian buah anggur, 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).

S.aureus 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	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus aureus</i>

S.aureus mengeluarkan enterotoksin pada makanan yang berprotein tinggi. Enterotoksin ini bersifat termostabil, tahan terhadap aktivitas pemecahan oleh enzim-enzim pencernaan dan relatif tahan terhadap pengeringan. Patogenitas *S.aureus* merupakan efek gabungan dari 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. *S.aureus* adalah patogen utama pada manusia, karena menyebabkan keracunan makanan dan infeksi kulit. Infeksi lokal pada kulit dapat berupa jerawat, infeksi folikel rambut atau abses. Jika *Staphylococcus* menyebar dan terjadi bakteremia, maka dapat terjadi endokarditis, osteomielitis, meningitis atau infeksi paru-paru (Brooks dkk., 2007).

b. Escherichia coli

E.coli merupakan golongan bakteri Gram negatif yang termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini berbentuk batang dengan susunan sel tunggal, ukuran panjang sel sekitar 2 μm dan diameter 0,5 μm . Hidup pada suhu 20-40 °C dan suhu optimumnya 37 °C. *E.coli* merupakan bakteri patogen yang

banyak ditemukan pada usus besar manusia dan berfungsi dalam pembusukan sisa makanan (Holt, 1994). Sifat biokimia. *E.coli* antara lain dapat memfermentasi beberapa karbohidrat seperti laktosa, sukrosa dan manitol, menghasilkan indol dan bersifat motil (Gillespie dan Hawkey, 2006).

E.coli dapat menyebabkan diare karena menghasilkan enteroksin yang dikenal 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 paru, 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).

Menurut *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition* volume empat (Krieg dkk., 2011), klasifikasi *E.coli* 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 endospora. 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). *B.subtilis* dapat tumbuh pada pH asam sampai basa yaitu sekitar pH 2-11 (Todar, 2006).

B.subtilis 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 membentuk 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 α -D-galaktosil, α -D manosil dan rhamosil yang tersusun secara berulang 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 ekstrim. 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	: Proteobakteria
Kelas	: Gamma Proteobakteri
Bangsa	: Enterobakteriales
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 fluorosensi 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 obligat yang tumbuh optimal 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* (Baldan dkk., 2014), pasien kanker, dan luka bakar (Pace dkk., 2005).

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

Kerajaan	: Monera
Divisi	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Bangsa	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: <i>Pseudomonas</i>
Jenis	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

f. Streptococcus mutans

Streptococcus mutans merupakan bakteri Gram positif, non-motil, dan bersifat anaerob (Kayser dan Bienz, 2011). Bakteri ini termasuk dalam kelompok *Streptococcus* hemolitik alfa, atau disebut juga *Streptococcus viridians*, karena dapat menimbulkan hemolisis sel darah merah yang berakibat pemudaran warna hijau kecoklatan disekitar koloni. Pemudaran warna hijau disebabkan pembentukan produk hemoglobin (Hadioetomo, 1990). Dinding sel bakteri terdiri dari protein, karbohidrat, dan peptidoglikan. Bakteri ini tumbuh dengan baik pada suhu 37 °C (Bonang dan Koeswardono, 1982).

Bakteri *S. mutans* menjadi penyebab utama dalam karies gigi (Bonang dan Koeswardono, 1982). Bakteri *S.mutans* mensekresi glukosiltransferase ekstrasel, yang disebut dekstransukrase, yang mengubah sukrosa membentuk polimer glukosa tidak larut (glukan). Glukan melekat erat pada permukaan gigi dan pada bakteri, sehingga *S.mutans* menempel kuat pada permukaan gigi. Selama menempel pada permukaan gigi, *S.mutans* melakukan fermentasi fruktosa yang sudah didegradasi

dari sukrosa membentuk asam laktat. Asam laktat ini menyebabkan demineralisasi dan pembusukan gigi sehingga menjadi karies gigi (Kayser dan Bienz, 2011).

Menurut Garrity dkk,. (2007) klasifikasi *S.mutans* adalah sebagai berikut:

Kerajaan	: Monera
Divisi	: Firmicutes
Kelas	: Bacili
Bangsa	: Lactobacilalles
Suku	: Streptococcaceae
Marga	: <i>Streptococcus</i>
Jenis	: <i>Streptococcus mutans</i>

4. 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., (1999) menyatakan bahwa fermentasi dapat menghasilkan biomassa (sel-sel mikroba), enzim (amilase dan protease), metabolit primer mikroba (polisakarida, protein, dan asam nukleat, metabolit primer mikroba (antibiotik dan vitamin), biokonversi (konversi asam asetat dari etanol). Faktor-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 ke dalam fermentor, ada medium lama, produk, atau sel yang dikeluarkan sebanyak medium baru yang ditambahkan dalam fermentor. Sistem dengan volume berubah, ke dalam fermentor ditambah medium baru tetapi tidak ada medium lama yang dikeluarkan dari dalam fermentor (Stanbury dkk., 1999; Kulandaivelu dan Janarthanan, 2012).

Sistem *continous* 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 dari faktor-faktor seperti volume kultur, biomassa, konsentrasi produk dan substrat, pH, suhu dan oksigen terlarut (Stanbury dkk., 1999; Kulandaivelu dan Janarthanan, 2012). Keuntungan dalam sistem ini adalah mempunyai produktivitas dan kecepatan pertumbuhan dapat dioptimalkan, proses dalam waktu yang lama dapat dijalankan, dapat digunakan model 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).

5. Tinjauan tentang antibakteri

Antibakteri adalah zat yang menekan pertumbuhan atau reproduksi bahkan membunuh bakteri. Antibakteri terbagi atas dua berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu bakteriostatika yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri dan bakterisida yang bersifat membunuh bakteri (Guilfoile dan Alcamo, 2007). Antibakteri dapat memiliki aktivitas bakteriosatika menjadi aktivitas bakterisida apabila kadarnya ditingkatkan melebihi kadar hambar minimal (KHM) (Setiabudy dan Gan, 1995).

Target mekanisme antibakteri adalah sebagai berikut:

1. 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).
2. 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 membentuk integritas komponen seluler (Kayser dan Bienz, 2011b)
3. 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).

4. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein
DNA dan RNA yang mempunyai peran yang sangat penting sebagai bahan baku pembentukan sel bakteri. Penghambatan DNA dan RNA akan mengakibatkan kerusakan pada sel (Brooks dkk., 2007).
5. 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, 2011)

6. 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).

b. Metode difusi

Metode ini adalah suatu metode untuk menguji daya antibakteri berdasarkan berdifusinya zat antimikroba dalam media padat dengan pengamatan pada daerah pertumbuhan. Biasanya metode ini digunakan untuk zat antimikroba yang larut dan tidak larut. Metode difusi berdasarkan pencadangnya terdiri atas metode difusi dengan sumuran, 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 kecepatan 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 diletakan didalamnya. Metode difusi parit adalah metode dengan membuat parit sepanjang diameter media padat dan zat uji diletakan pada parit tersebut kemudian diinkulasi 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 bentuk 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 kiselgur (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, 2007).

Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk analisis kualitatif terhadap suatu senyawa. Parameter pada KLT yang digunakan untuk identifikasi adalah nilai Rf. Nilai Rf (*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 (Heftmann, 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 diletakkan 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 (Hostettmann dkk., 1998).

8. Tinjauan tentang identifikasi senyawa aktif

a. Spektrofotometri infra merah (IR)

Spektrofotometri inframerah merupakan salah satu jenis spektroskopi yang digunakan untuk mengidentifikasi jenis ikatan yang terdapat dalam suatu senyawa. Bila radiasi elektromagnetik yang berkisar antara 400 cm^{-1} dan 4.000 cm^{-1} (2.500 dan 20.000 nm) dilewatkan pada suatu sampel dan diserap oleh ikatan-ikatan molekul di dalam sampel, maka molekul tersebut dapat mengalami peregangan ataupun penekukan ikatan (Winny, 2009). Semua ikatan kimia mempunyai panjang gelombang radiasi yang berbeda-beda untuk menghasilkan 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., 2013).

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 alur 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 solut-solut 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 geraknya 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; Kraj dkk., 2008).

c. Spektrometri resonansi magnetik inti (NMR)

Sesuai dengan namanya, NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*), 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 dari sifat-sifat sampel. Suatu plot dari frekuensi puncak-puncak absorpsi versus intensitas puncak memberikan suatu spektrum NMR (Kemp, 1975; Mohan, 2004).

Spektroskopi NMR proton ($^1\text{H-NMR}$) merupakan sarana untuk menentukan stuktur senyawa organik dengan mengukur momen magnet atom hidrogen. Pada kebanyakan senyawa, atom hidrogen terikat pada gugus yang berlainan (seperti $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3-$, $-\text{CHO}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{CHOH}-$) 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 (Anderson, 2004; Pavia dkk., 2014).

Spektrum NMR tidak hanya dapat membedakan beberapa banyak proton yang berbeda dalam molekul, tetapi ia 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 tiap integrasi proton sama dengan perbandingan jumlah proton dalam molekul (Winny, 2009).

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

Pergeseran kimia ^{13}C antara 0 sampai dengan 230 ppm yang terbagi atas sp^3 antara 0–60, alkohol 60–80 ppm, sp antara 70–80 ppm, 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 (CH_3) berbentuk quartet, metilen (CH_2) berbentuk triplet, metin berbentuk doublet sedangkan karbon quarterner 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 puncaknya 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, 2007). Molekul ligan ditambatkan pada situs aktif atau situsambat dari suatu protein yang sedang diam (statik) di dalam penambatan molekul, dengan menyertakan molekul ko-faktor dan /atau H₂O di dalamnya. Data diperoleh mengenai posisi dan orientasi ligan-ligan di 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, 2013).

Sejumlah energi yang dinamakan energi *Gibbs* penambatan (ΔG_{bind}) akan dibebaskan bersamaan perubahan konformasi ikatan (Schneider dan Baringhaus, 2008). Pada penambatan molekul, energi terendah yang dibebaskan oleh ligan dianggap sebagai ΔG_{bind} . Pada saat kecocokan interaksi tercapai, maka konformasi yang dianut 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

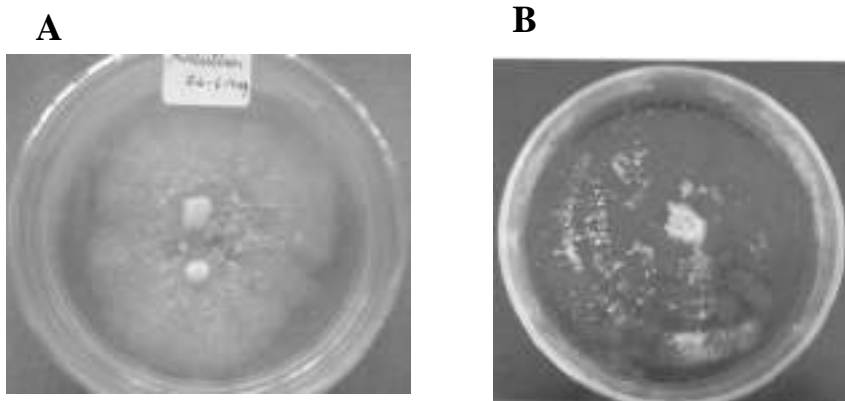
PEMBAHASAN



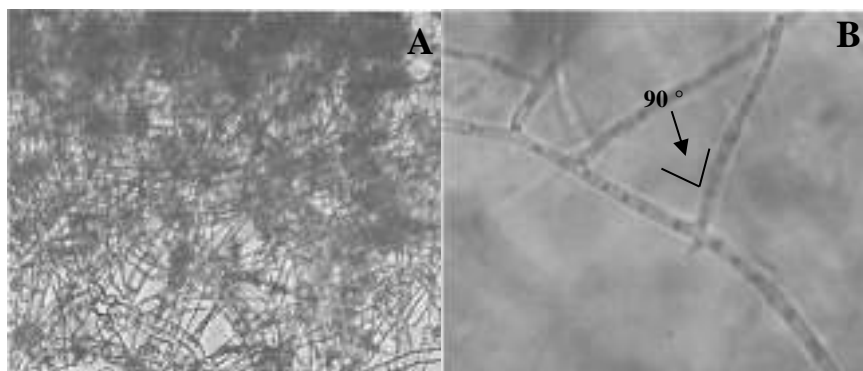
A. Hasil Identifikasi Fungi Endofit Kode DJ2

Fungi endofit kode DJ2 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 coklat kehitaman (Gambar 3B). Identifikasi morfologi fungi yang dilakukan di Laboratorium Mikologi Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, dapat dilihat di Lampiran 1.

Identifikasi menunjukkan bahwa fungi endofit kode DJ2 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 Hari (B)Umur 20 Hari



Gambar 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, $3\beta,5\alpha,6\beta$ -trihidroksiergosta-7,22-dien (Ma dkk., 2004).

Rhizoctonia solani dan *Rhizoctonia cerealis* merupakan 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., 2013; Bartz dkk., 2013; Akhter dkk., 2014.). Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengidentifikasi spesies dari fungi endofit genus *Rhizoctonia sp.* sehingga dapat mengungkapkan hubungan spesies fungi terhadap potensi antibakteri.

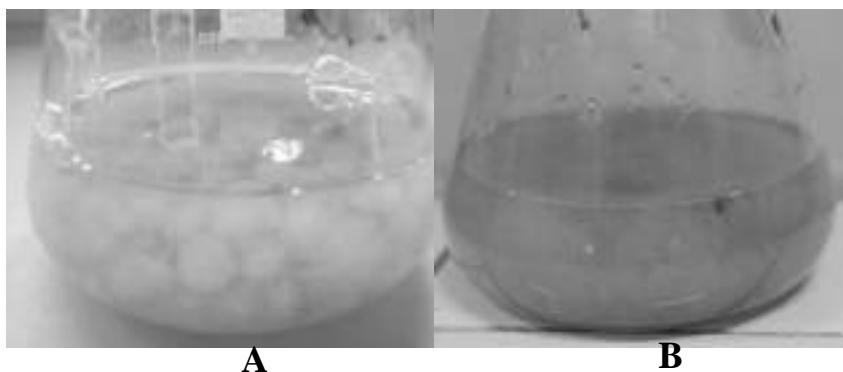
B. Hasil Produksi Metabolit Sekunder Fungi Endofit Kode DJ2

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

Media PDB digunakan untuk memperpendek fase lag pada pertumbuhan fungi. Media PDB memiliki komposisi yang mirip dengan media PDA, perbedaannya pada PDB tidak ada agar. Fungi DJ2 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 didalam 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 penyari, partisi dilakukan dengan menggunakan perbandingan antara etil asetat dan media PDB sebesar 1:1 dengan 3 kali replikasi. Etil asetat dikeringkan dengan cara didiamkan kedalam lemari asam. Ekstrak yang dihasilkan berwarna coklat (gambar 6) dan rendemen ekstrak etil asetat dapat dilihat pada Lampiran 2.

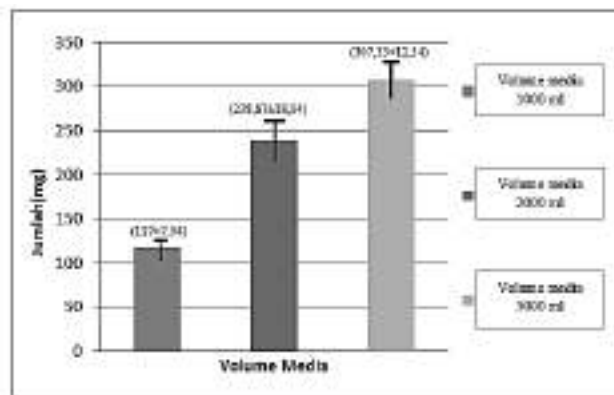


Gambar 6. Ekstrak Etil Asetat

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

penyari diharapkan dapat melarutkan senyawa yang terdapat dalam media fermentasi.

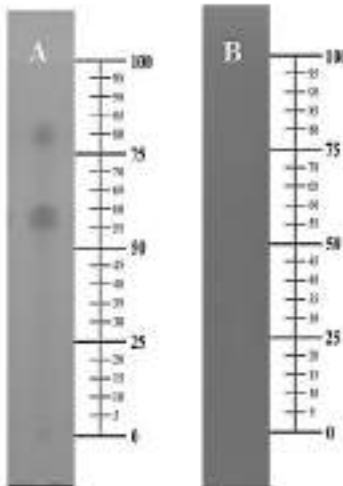
Ekstrak etil asetat yang dihasilkan dari proses fermentasi pada volume media 1000 mL sebesar $117 \pm 7,94$ mg. Jumlah ekstrak etil asetat yang dihasilkan akan meningkat 2 sampai 3 kali apabila volume media di tingkatkan (Gambar 7). Hal tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak yang dihasilkan akan meningkat jumlahnya sebanding dengan media yang diberikan dalam proses fermentasi. Jumlah media yang diberikan akan berbanding lurus terhadap nutrisi didalam 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 lapi 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 KLT dengan fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial.



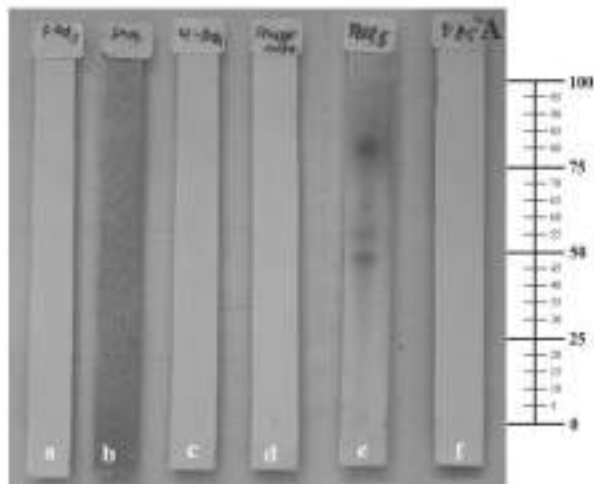
Gambar 8. Kromatogram KLT Ekstrak Etil Asetat

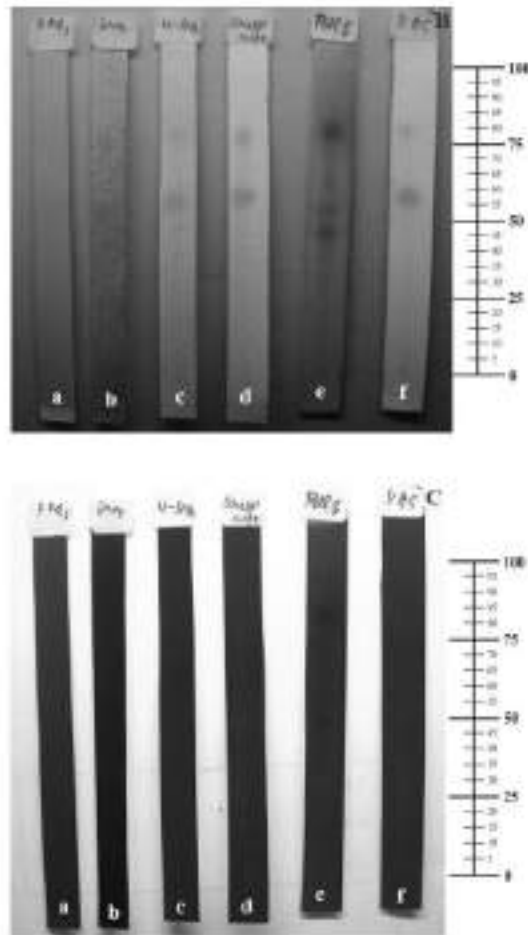
Keterangan gambar:

Kromatogram di bawah sinar UV_{254} (A), sinar UV_{366} (B). Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial, dan pengembangan 8 cm.

Kromatogram yang diperoleh kemudian disemprot dengan 6 jenis pereaksi semprot yaitu: vanilin asam sulfat, 4-DNPH, anisaldehyd-asam sulfat, dragendorf, FeCl₃, dan serium sulfat dengan perlakuan khusus setiap pereaksi semprot. Pereaksi semprot digunakan untuk mendeteksi senyawa yang tidak terdeteksi dibawah sinar UV₂₅₄ dan UV₃₆₆.

Hasil pada Gambar 9 menunjukkan 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 menunjukkan bercak pada *hrf* 50, 55, 60 dan 80 merupakan turunan fenolik (Wagner dan Bladt, 1996). Pereaksi ini akan mengabstraksi H⁺ sampel sehingga terbentuk ikatan rangkap terkonjugasi, semakin lama reaksi berlangsung maka semakin panjang ikatan terbentuk. Pereaksi anisaldehyd-asam sulfat dapat digunakan sebagai pereaksi semprot untuk mendeteksi bercak pada plat KLTP sebelum dilakukan penggolongan dan pemisahan fraksi



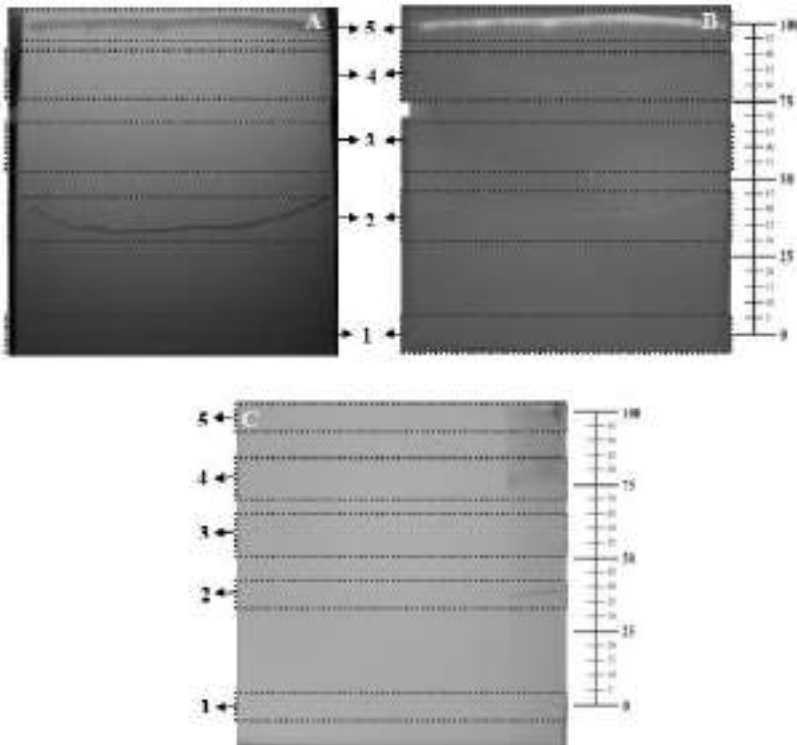


Gambar 9. Kromatogram KLT Ekstrak Etil Asetat

Keterangan gambar:

Kromatogram di bawah sinar tampak (A), UV₂₅₄ (B), UV₃₆₆ (C). (a) pereaksi FeCl₃, (b) Dragendorff, (c) 4-DNPH, (d) Sulfur Sulfat, (e) Anisaldehyd-Asam Sulfat, (f) Vanilin Asam Sulfat. Fase diam silika gel F₂₅₄, fase gerak n-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial, dan pengembangan 8 cm.

Fraaksinasi 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-heksan : etil asetat : metanol (2:6:1) dengan penambahan 1 tetes asam asetat glasial. Kromatogram yang terdeteksi dibawah sinar UV₂₅₄, UV₃₆₆ dan deteksi dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat kemudian dikelompokkan 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 : metanol (2:6:1) ditambah 1 tetes asam asetat glasial. Visualisasi pemisahan fraksi secara KLT preparatif, yakni (A) kromatogram di bawah UV₂₅₄, (B) UV₃₆₆ nm, (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 silika disimpan pada tempat yang khusus sesuai penggolongan fraksi. Serbuk silika dilarutkan 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 I. Fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya terhadap bakteri uji.

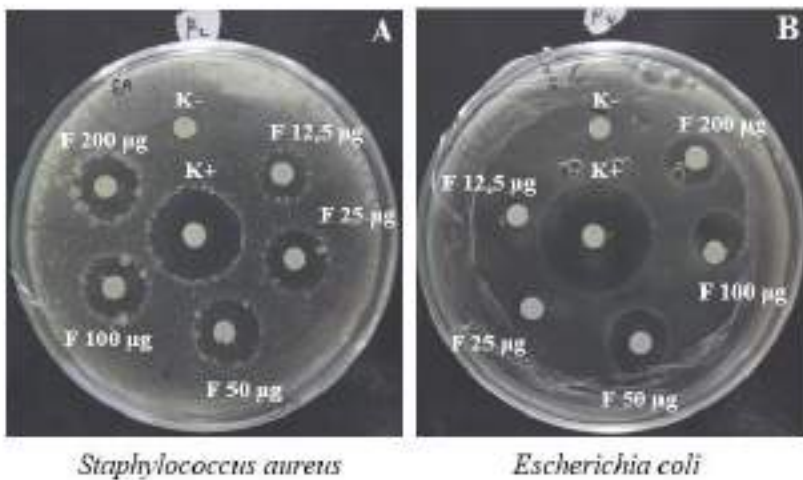
Tabel I. Rendemen dan *hRf* Fraksi

Fraksi	<i>hRf</i>	Sinar Tampak	UV ₂₄₅	UV ₃₆₆	Anisaldehyd-Asam sulfat	Rendemen (%b/b)
1	0	Coklat	Meredam	-	-	2.28
2	40	Kuning	Meredam	Berpendar Biru	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. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi (Skrining Senyawa Aktif)

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



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 (steptomisin 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 = $1,5 \times 10^6$ cfu/ml

Pengamatan menunjukkan bahwa fraksi 2, 4, dan fraksi 5 mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih baik terhadap bakteri uji dibandingkan dengan fraksi lainya (Tabel II). Fraksi 2 dan 5 menghambat pertumbuhan semua semua bakteri uji (*E.coli*, *S.aureus*, *B.subtilis*, *S.thypi*, dan *P.aeruginosa*). Fraksi 4 menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*, *S.aureus*, *B.subtilis*, dan *S.thypi* 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 dilihat 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 *Disc Diffusion* Fraksi terhadap Bakteri Uji

Fraksi	Loading dose (µg)	Zona Hambatan Pertumbuhan (mm)						Kontrol Positif	Kontrol Negatif
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>			
1	12,5	ND	7	ND	ND	ND	21	ND	
	25	7,5	9	ND	ND	ND			
	50	ND	16	7	ND	ND			
	100	11	6	ND	ND	ND			
	200	10	15	ND	ND	17			
2	12,5	18	20	19	11	12	22	ND	
	25	17	18	17	13	14			
	50	18	21	19	16	12			
	100	15	18	17	19	18			
	200	12	23	15	20	21			
3	12,5	ND	ND	ND	ND	ND	21		

Fraksi	Loading dose (µg)	Zona Hambatan Pertumbuhan (mm)						Kontrol Positif	Kontrol Negatif
		<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P. aeruginosa</i>			
	25	ND	ND	ND	ND	ND		ND	
	50	12	18	ND	ND	ND			
	100	8	17	ND	ND	ND			
	200	9	8	18	ND	ND			
4	12,5	ND	ND	ND	11	ND	20	ND	
	25	ND	7	9	10	ND			
	50	12	11	11	9	ND			
	100	13	10	13	10	ND			
	200	8	8	15	9	ND			
5	12,5	ND	11	12	10	8	22	ND	
	25	ND	13	13	11	12			
	50	ND	15	10	12	13			
	100	ND	16	15	11	9			
	200	12	16	11	13	8			

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

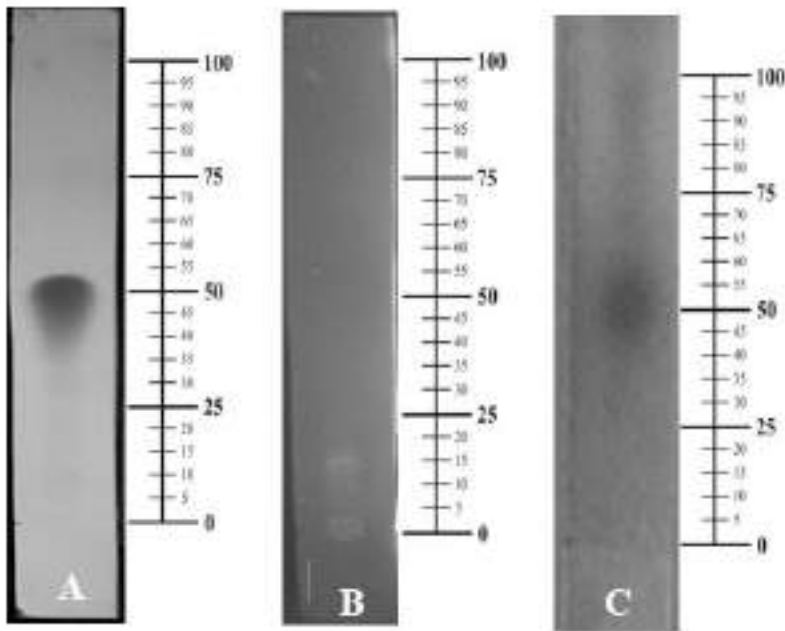
Fraksi 5 tidak digunakan dalam uji aktivitas (penentuan nilai KHM dan KBM) dan isolasi senyawa aktif antibakteri, karena fraksi 5 diduga senyawa kontaminan dari pelarut etil asetat teknis yang digunakan pada proses ekstraksi. Senyawa kontaminan yang diduga senyawa di-(2-etilheksil) ptealat, merupakan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

Isolat di-(2-etilheksil) ptealat 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-

etilheksil) ptealat berada pada nilai hRf yang sama (*hRf* 100) pada UV₂₅₄ dan UV₃₆₆. Di-(2-etilheksil) ptealat 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. Hasil 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).

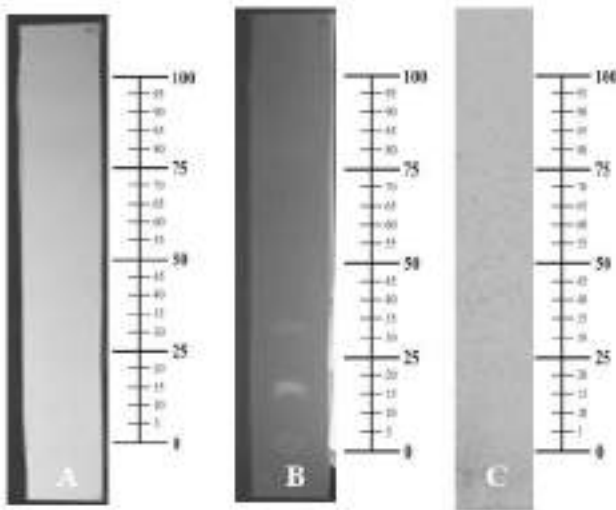


Gambar 12. Profil KLT Fraksi 2 Hasil Optimasi

Keterangan gambar:

- A = Profil KLT UV₂₅₄
- B = Profil KLT UV₃₆₆
- C = Anisaldehyd-asam sulfat
- Fase diam = Silika gel F₂₅₄
- 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).

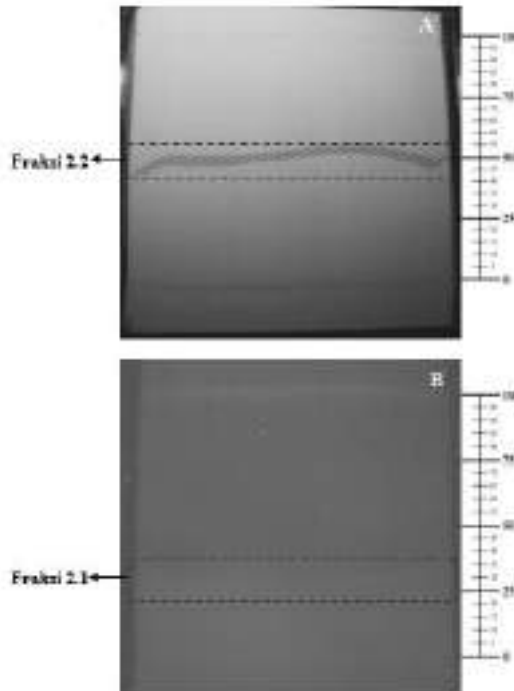


Gambar 13. Profil KLT Fraksi 4 Hasil Optimasi

Keterangan gambar:

- A = Profil KLT UV₂₅₄
- B = Profil KLT UV₃₆₆
- C = Anisaldehyd-asam sulfat
- Fase diam = Silika gel F₂₅₄
- 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 dari optimasi diaplikasikan pada metode KLTP pada masing-masing fraksi. Isolasi fraksi 2 dengan KLTP menghasilkan 2 bercak terpisah pada hRf 30 (UV₃₆₆) dan 50 (UV₂₅₄) (Gambar 14). Isolasi fraksi 4 menghasilkan 2 bercak terpisah pada hRf 25 (UV₃₆₆) dan 55 (UV₂₅₄) (Gambar 15). Bercak kemudian dipisahkan, dilarutkan dengan kloroform:metanol(1: 1), saring milipore dan kristalisasi. Rendemen tiap fraksi dapat dilihat pada Tabel III.



Gambar 14. Profil KLTP Fraksi 2

Keterangan gambar:

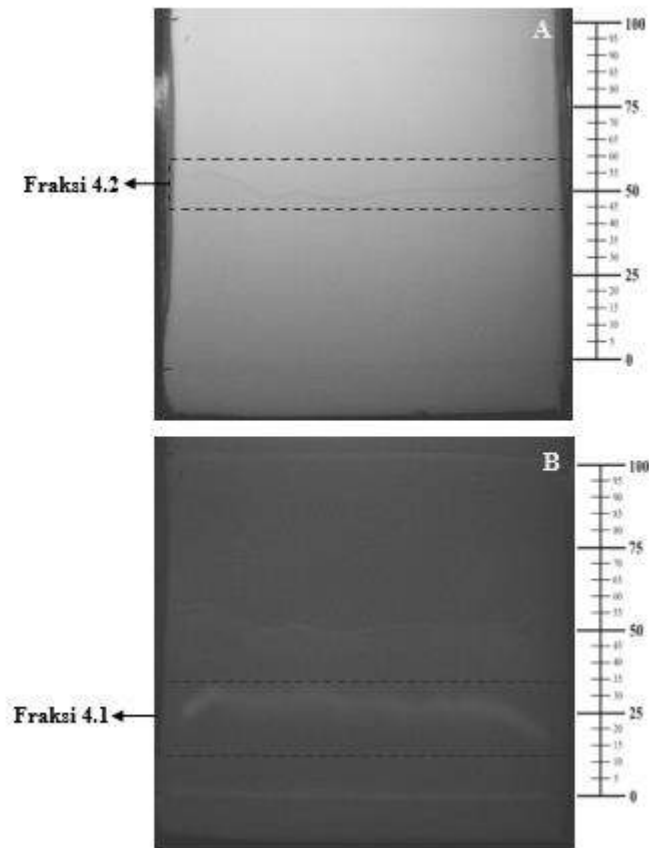
A = Profil KLT UV₂₅₄

B = Profil KLT UV₃₆₆

Fase diam = Silika gel PF₂₅₄

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

Jarak pengembangan = 15 cm



Gambar 15. Profil KLTP Fraksi 4

Keterangan gambar:

A = Profil KLT UV₂₅₄

B = Profil KLT UV₃₆₆

Fase diam = Silika gel PF₂₅₄

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

Jarak pengembangan = 15 cm

Tabel III. Rendemen dan *hRf* Fraksi

Fraksi	<i>hRf</i>	Sinar Tampak	UV ₂₄₅	UV ₃₆₆	Rendemen (%b/b)	
2	2.1	30	-	-	Berpendar biru	12,5
	2.2	50	-	Meredam	-	48,13
4	4.1	25	-	-	Berpendar Biru	45,91
	4.2	55	-	Meredam	-	2,15

Keterangan : Berat fraksi 2 = 316 mg

Berat fraksi 4 = 218 mg

Senyawa utama dari fraksi 2 yaitu fraksi 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 (1:3,v/v), wasbensin: etil asetat (2:1,v/v), metanol: kloroform (1:2,v/v), dan etil asetat : metanol (5:2, v/v) menghasilkan bercak tunggal dengan *hRf* masing-masing 20, 35, 50, 60, 67, dan 74 (Lampiran 5).

Fraksi 4.1 diuji dengan fase gerak etil asetat : wasbensin (4:1,v/v), etil asetat : kloroform (3:1,v/v), etil asetat : metanol (5:1, v/v), n-heksan : metanol (3:2,v/v), dan n-heksan : etil asetat (2:5,v/v) menghasilkan bercak tunggal 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.

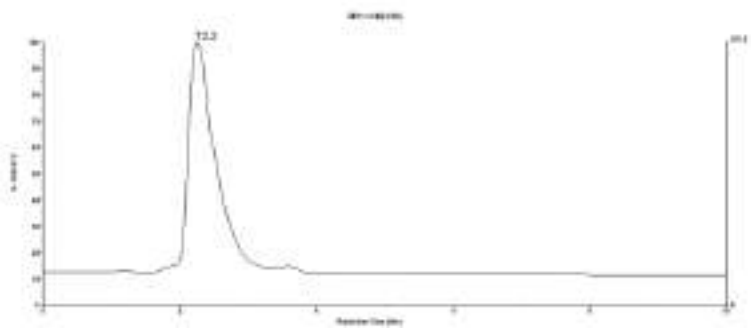
Pemeriksaan titik lebur dilakukan untuk mengetahui kemurnian dari senyawa hasil isolasi. Serbuk isolat yang telah diuji

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).

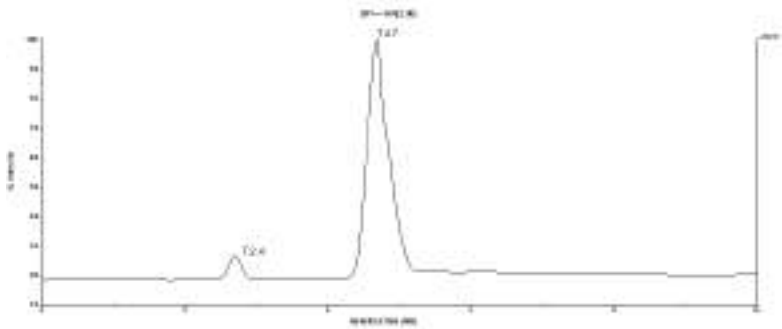
Tabel IV. Pemeriksaan Titik Lebur Isolat

Isolat	Rerata jarak titik lebur		<i>Standard deviation</i>	
	<i>Start of melting</i> (°C)	<i>End of melting</i> (°C)	<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 cair 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 pembacaan *microplate 96 wells* menggunakan *microplate reader* yang diaplikasikan dalam nilai absorbansi.

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 KHM₅₀ dan KHM₉₀, serta mengetahui nilai kadar bunuh minimum isolat dengan parameter KBM.

Uji antibakteri secara garis besar menunjukkan bahwa isolat 2.2 lebih aktif daripada isolat 4.1. Hal tersebut ditunjukkan dengan menganalisis nilai KHM₅₀ dan KHM₉₀ dari isolat. Isolat 2.2 mempunyai nilai KHM₅₀ dan KHM₉₀ yang lebih kecil daripada isolat 4.1 (Tabel V). Misalnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. subtilis*, isolat 2.2 memerlukan konsentrasi 9,79 µg/mL dalam menghambat 90% pertumbuhan bakteri daripada isolat 4.1 yang memerlukan konsentrasi lebih tinggi yaitu 19,18 µg/mL.

Tabel V. Nilai KHM₅₀, KHM₉₀, dan Nilai KBM Isolat 2.2 dan 4.1

BAKTERI	SENYAWA					
	ISOLAT 2.2			ISOLAT 4.1		
	KHM ₅₀ (µg/mL)	KHM ₉₀ (µg/mL)	KBM (µg/mL)	KHM ₅₀ (µg/mL)	KHM ₉₀ (µg/mL)	KBM (µg/mL)
<i>B. subtilis</i>	1,24	9,79	20,00	2,69	19,18	40,00
<i>E. coli</i>	1,17	6,62	20,00	1,35	9,19	40,00
<i>P. aeruginosa</i>	1,27	9,38	40,00	1,33	14,70	40,00
<i>S. aureus</i>	0,73	10,80	40,00	0,86	17,56	40,00
<i>S. mutans</i>	0,31	7,25	10,00	0,24	9,40	20,00
<i>S. typhi</i>	1,19	10,21	10,00	1,90	16,70	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 bakteriostatik dan bakterisidal dari suatu senyawa. Bakteriostatik digunakan untuk menyebut agen antibakteri yang mampu mencegah pertumbuhan bakteri. Bakterisidal merupakan konsentrasi minimum antibakteri yang mampu membunuh $\geq 99,9\%$ ($3 \log_{10}$) pertumbuhan bakteri setelah inkubasi selama 18-24 jam dalam media cair (NCCLS, 1999).

Senyawa bersifat bakterisidal jika memiliki rasio KBM:KHM ≤ 4 , bersifat bakteriostatik jika memiliki rasio KBM:KHM ≥ 16 (Bartlett, 2014) dan dikatakan toleran jika memiliki rasio KBM:KHM sebesar 32 (NCCLS, 1999). Rasio KBM:KHM yang cukup besar menunjukkan sifat toleran dari bakteri uji terhadap agen antibakteri yang diujikan.

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 ≤ 4 , sedangkan isolat 2.2 bersifat bakteriostatik terhadap bakteri *P. aeruginosa* karena nilai rasio antara KBM dan KHM ≥ 4 (Tabel VI). Isolat 4.1 bersifat bakteriostatik terhadap bakteri *E. coli* karena memiliki rasio KBM dan KHM sebesar ≥ 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 VI).

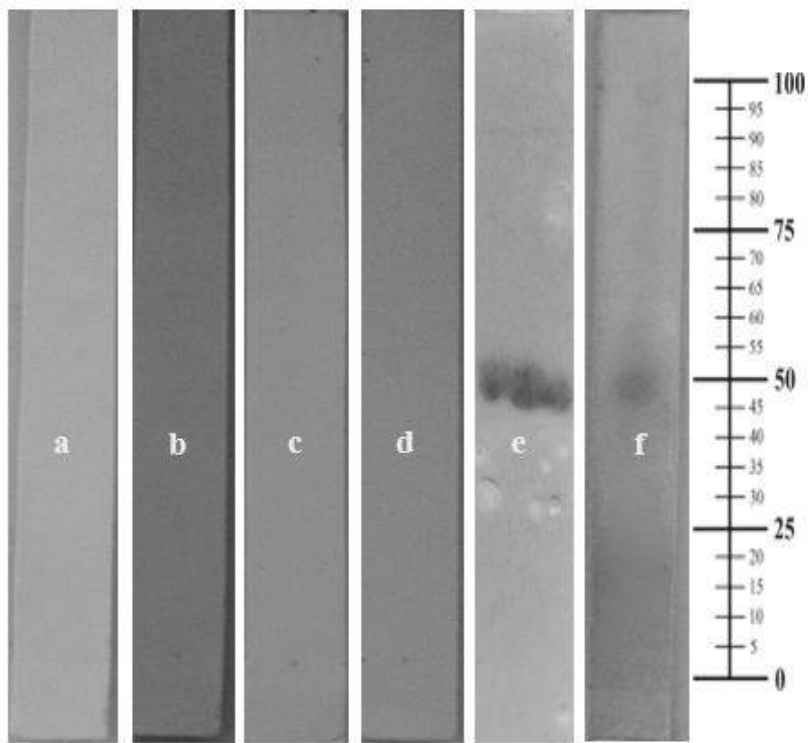
BAKTERI	SENYAWA					
	ISOLAT 2.2			ISOLAT 4.1		
	KHM ₉₀ (µg/mL)	KBM (µg/mL)	KBM :KHM ₉₀	KHM ₉₀ (µg/mL)	KBM (µg/mL)	KBM :KHM ₉₀
<i>B. subtilis</i>	9,79	20	2,04	19,18	40	2,08
<i>E. coli</i>	6,62	20	3,02	9,19	40	4,35
<i>P. aeruginosa</i>	9,38	40	4,26	14,70	40	2,72
<i>S. aureus</i>	10,80	40	3,70	17,56	40	2,27
<i>S. mutans</i>	7,25	10	1,38	9,40	20	2,12
<i>S. typhi</i>	10,21	10	0,97	16,70	20	1,19

Tabel VI. Penentuan Sifat Senyawa Antibakteri

H. Hasil 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, FeCl_3 dengan perlakuan



Gambar 18. Kromatogram KLT Isolat 2.2 dibawah Sinar Tampak

Keterangan gambar:

(a)Pereaksi FeCl_3 , (b)2,4-DNPH , (c)Serium Sulfat , (d)Vanilin-asam sulfat, (e)Dragendorf, (f)Anisaldehyd-Asam Sulfat, Fase diam silika gel F_{254} , fase gerak n-heksan : etil Asetat (1:3,v/v), dan pengembangan 8 cm.

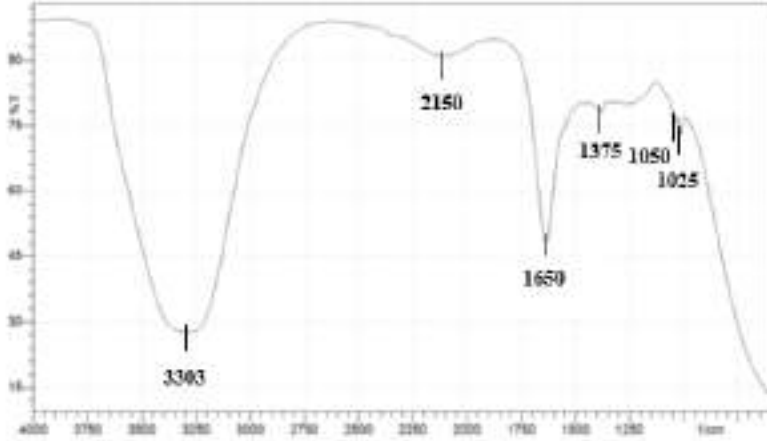
Hasil identifikasi menunjukkan isolat 2.2 terdeteksi menggunakan pereaksi dragendorf dan anisaldehyd-asam sulfat, bercak tunggal menunjukkan warna coklat jingga dan ungu pada sinar tampak (gambar 18). Senyawa yang terdeteksi berwarna merah menggunakan pereaksi dragendorf merupakan senyawa alkaloid. Nitrogen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

2. Elusidasi Struktur Isolat 2.2

a. Analisis Spektrum FT-IR

Spektrum infra merah isolat 2.2 menunjukkan pita yang melebar pada daerah 3303 cm^{-1} yang mengindikasikan adanya gugus hidroksi $-\text{OH}$, vibrasi *stretching* lemah dengan intensitas rendah pada daerah 2150 cm^{-1} mengindikasikan gugus imina ($\text{HN}=\text{CH}-$) (Supratman, 2010), serapan kuat dengan bentuk pita tajam pada daerah 1650 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus $\text{C}=\text{O}$ (Stuart, 2004), serapan lemah pada daerah 1375 cm^{-1} mengindikasikan adanya gugus metil. Puncak lemah pada daerah sidik jari pada bilangan gelombang 1025 dan 1050 cm^{-1}

mengindikasikan adanya ikatan C-O dan menunjukkan adanya senyawa ester.



Gambar 19. Spektra FT-IR Isolat 2.2

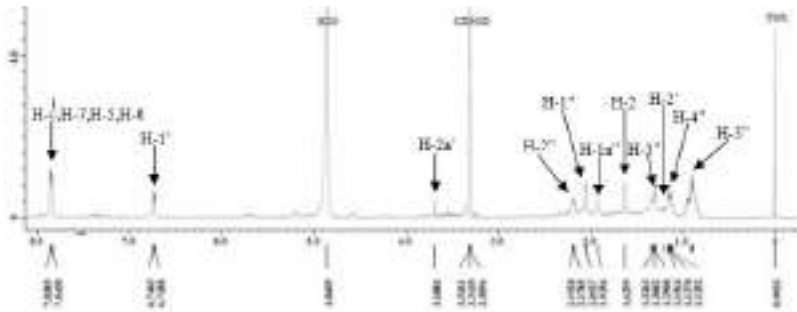
Tabel VII. Interpretasi Spektra FT-IR Isolat 2.2

Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)		Bentuk, Intensitas	Interpretasi
Isolat 2.2	Pustaka*		
1025	1300–1000	Tajam, Lemah	C-O <i>stretching</i>
1050	1300–1000	Tajam, Lemah	C-O <i>stretching</i>
1375	1200-1450	Tajam, Lemah	Metil (C-H <i>bending</i>)
1650	1640-1670	Tajam, Kuat	(C=O) <i>stretching</i>
2150	2000–2200	Melebar, Lemah	HC=NH (imina)
3303	3500-3200	Melebar, Kuat	Hidroksi (-OH <i>stretching</i>)

*(Sastrohamidjojo, 2001; Stuart, 2004; Supratman, 2010)

b. Analisis Spektrum ¹H-NMR

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



Gambar 20. Spektra ¹H-NMR Isolat 2.2

Spektrum ¹H-NMR isolat 2.2 menunjukkan proton dengan δ 7,85 ppm (H-4 dan H-7, *d*, *J* = 7) dan 7,84 ppm (H-5 dan H-6, *d*, *J* = 7) merupakan proton-proton benzen disubstitusi dengan posisi orto atau benzen orto substitusi dengan integrasi total 4, dimana terdiri dari 2 set hidrogen yang linier (H-4 linier dengan H-7; H-5 linier H-6). Proton yang muncul pada δ 6,73 ppm (H-1') dengan pola splitting *doublet*, integrasi 2 dan *Coupling Constant* (*J*) 7,75 Hz menunjukkan adanya gugus metilen (-CH₂-), proton metilen dengan geseran kimia lebih *downfield* mengindikasikan bahwa gugus metilen tersebut mengikat atom yang lebih elektronegatif (atom oksigen).

Substituen elektronegatif pada karbon akan mereduksi perindangan diamagnetik didekat proton-proton yang terikat, karena akan mereduksi kerapatan elektron disekitar proton-proton tersebut. Proton yang terikat pada karbon yang mengikat unsur elektronegatif, maka *chemical shift* dari proton tersebut akan naik dengan kenaikan elektronegativitas dari unsur yang diikat oleh atom karbon tersebut (Sastrohamidjojo, 2001).

Proton dengan δ 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 mengenal proton tetangganya sehingga keluar dengan splitting *singlet*. Proton yang muncul pada δ 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 (-CH₂-) atau proton metil (-CH₃) dan metin (-CH-).

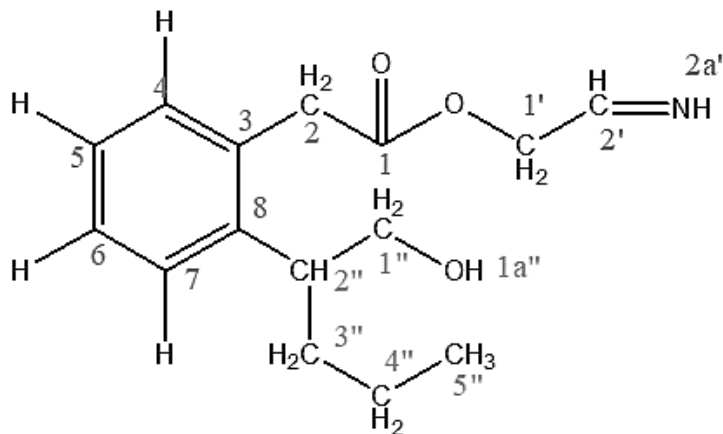
Proton dengan δ 2,0 ppm (H-1'') dengan integrasi 2 dan pola splitting *doublet* menunjukkan adanya gugus metilen (-CH₂-) yang bertetangga dengan satu proton atau gugus metin (-CH-). Proton yang muncul pada δ 1,92 ppm (H-1a'') dengan pola splitting *singlet* dengan integrasi 1 merupakan ciri khas dari proton yang terikat atom oksigen yang mempunyai sifat elektronegatif atau proton gugus hidroksi (-OH) pada rantai samping. Kondisi yang lebih umum terjadi pada serapan proton hidroksi dengan konsentrasi yang lebih tinggi, serapan muncul pada daerah δ 0,5 – 3,0 ppm karena ikatan hidrogen antara gugus hidroksi atau -NH dengan pelarut yang digunakan pada analisis yaitu metanol dan D₂O (Sastrohamidjojo, 2001; Supratman, 2010).

Proton dengan δ 1,62 ppm (H-2) dengan pola splitting *singlet* dan total integrasi 2 menunjukkan adanya gugus metilen (-CH₂-), 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 δ 1,29; 1,30; 1,32; dan 1,39 ppm (H-3'') dengan pola splitting *quartet* dengan integrasi 2 menunjukkan adanya gugus metilen (-CH₂-) yang

bertetangga dengan 3 proton yaitu proton metin dan metilen atau proton metil.

Proton dengan δ 1,20; 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 π (ϕ) menghasilkan medan magnet anisotropi sekunder. Gugus metin yang mempunyai elektron π , medan magnet yang dihasilkan oleh induksi perputaran elektron-elektron π 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 δ 1,11; 1,12; 1,13; 1,142; 1,149; dan 1,15 ppm (H-4'') dengan integrasi 2 menunjukkan gugus metilen (-CH₂-). 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 δ 0,88; 0,90; dan 0,91 ppm (H-5'') dengan integrasi 3 dan pola splitting *triplet* menunjukkan gugus metil (-CH₃) yang berdekatan dengan dua proton sekunder. Proton pada daerah *upfield* merupakan proton yang sangat terlindungi atau jauh dari atom elektronegatif.



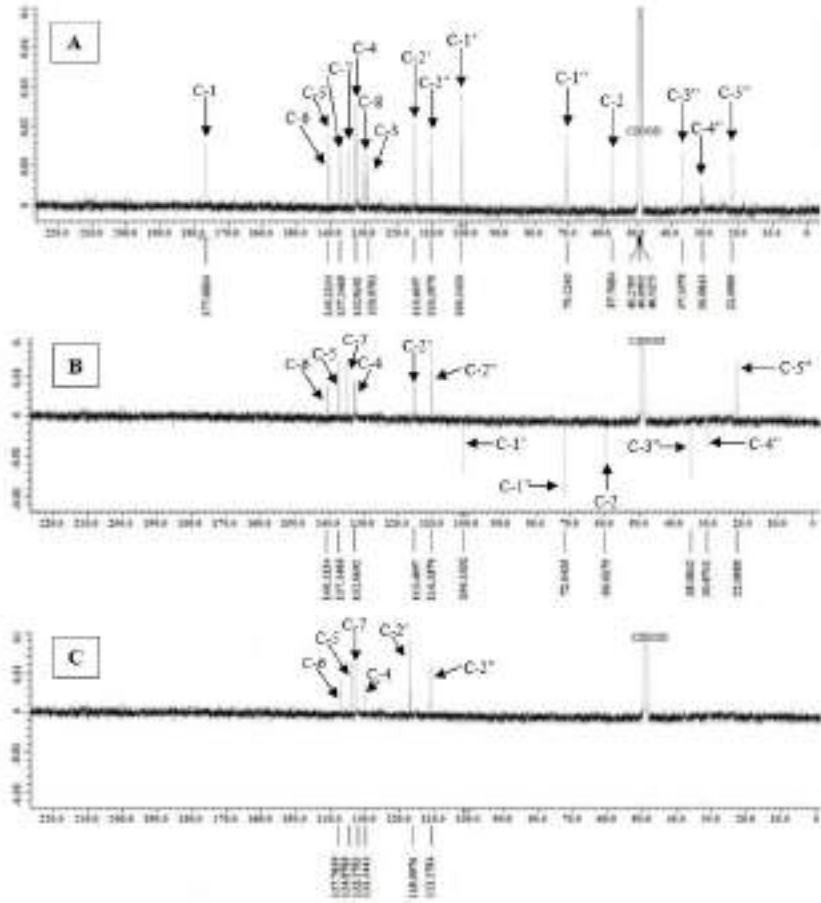
Gambar 21. Perkiraan Struktur Isolat 2.2

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

δ_{H} (ppm)	Kode	Multiplicitas	Perkiraan gugus fungsi
7,85 dan 7,84	H-4, H-7, H-5, H-6	<i>doubled of doubled</i>	-CH=CH- (aromatis)
6,73	H-1'	<i>doublet</i>	-CH ₂ -
3,68	H-2a'	<i>singlet</i>	=NH-
2,16; 2,17; 2,19; 2,21; dan 2,24	H-2''	<i>quintet</i>	-CH-
2,0	H-1''	<i>doublet</i>	-CH ₂ -
1,92	H-1a''	<i>singlet</i>	-OH
1,62	H-2	<i>singlet</i>	-CH ₂ -
1,29; 1,30; 1,32; dan 1,39	H-3''	<i>quartet</i>	-CH ₂ -
1,20; 1,21; dan 1,21	H-2'	<i>triplet</i>	-CH=
1,11; 1,12; 1,13; 1,142; 1,149; dan 1,15	H-4''	<i>sextet</i>	-CH ₂ -
0,88; 0,90; dan 0,91	H-5''	<i>triplet</i>	-CH ₃

c. Analisis Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT

Spektrum ^{13}C -NMR dan DEPT digunakan untuk menunjukkan jumlah, jenis, dan posisi atom karbon yang terdapat pada isolat. Spektrum ^{13}C -NMR (Gambar 22A) isolat 2.2 terdeteksi 15 signal resonansi karbon. Signal yang muncul pada daerah sangat *downfield* dengan δ 177,68 ppm (C-1) adalah karakteristik untuk resonansi karbon karbonil dengan ikatan rangkap terkonjugasi. Signal yang muncul pada daerah sangat *upfield* dengan δ 22.09 ppm (C-5'') merupakan karakteristik karbon metil. Pergeseran kimia pada spektroskopi ^{13}C -NMR mirip dengan spektroskopi ^1H -NMR, karbon metil dan TMS menyerap pada medan yang kuat (*upfield*) sementara karbon karboksil dan aldehida menyerap pada medan yang lemah (*downfield*)



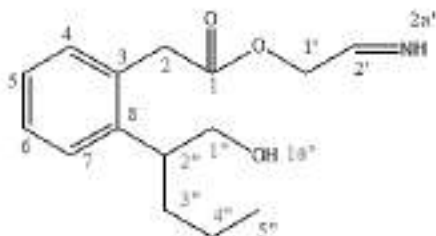
Gambar 22. Spektra ^{13}C -NMR (A), DEPT-135 (B), dan DEPT-90 (C) Isolat 2.2

Signal spektrum karbon yang muncul dengan δ 129,87; 130,54; 132,56; 134,98; 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 secara berdekatan pada daerah yang cukup *downfield*. Hibridasi atom ^{13}C sangat penting untuk menentukan pergeseran kimia, atom karbon dari benzena yang merupakan atom karbon sp dan sp^2

akan menyerap secara bersamaan pada medan magnet yang lemah sehingga keluar pada daerah yang cukup *downfield* (Supratman, 2010).

Analisa DEPT-135 menunjukkan terdapat lima karbon metilen ($-\text{CH}_2$) dengan puncak negatif (Gambar 22B) yaitu pada δ 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 177,68 ppm merupakan karbon dari gugus karbonil (C-1) dan pada δ 129,87 dan 130,54 ppm yang merupakan dua karbon dari gugus benzena pada posisi tersubstitusi (C-3 dan C-8). Satu signal karbon pada daerah yang sangat *upfield* pada δ 20,09 merupakan karakteristik karbon dari gugus metil (C-5''). Spektrum DEPT-135 ($\theta_3 = 135^\circ$) memberikan signal negatif untuk gugus metilen ($-\text{CH}_2$), signal positif untuk gugus metin dan metil, akan tetapi tidak memberikan signal pada atom karbon kuartener (signal hilang) (Supratman, 2010).

Analisa DEPT-90 menunjukkan terdapat enam karbon metin (Gambar 22C) pada δ 111,27; 115,99; 131,24; 132,17; 134,87; dan 137,76 ppm (C-2'', C-2', C-4, C-7, C-5, dan C-6). Satu signal karbon pada δ 20,09 ppm pada DEPT-135 yang diduga merupakan karbon dari gugus metil, pada DEPT-90 tidak muncul dan hal tersebut semakin menguatkan bahwa signal pada δ 20,09 ppm merupakan signal dari gugus metil. Spektrum DEPT-90 ($\theta_2 = 90^\circ$) memberikan signal positif untuk gugus metin, tetapi signal karbon dari karbon kuartener, metil dan metilen tidak muncul (Supratman, 2010).

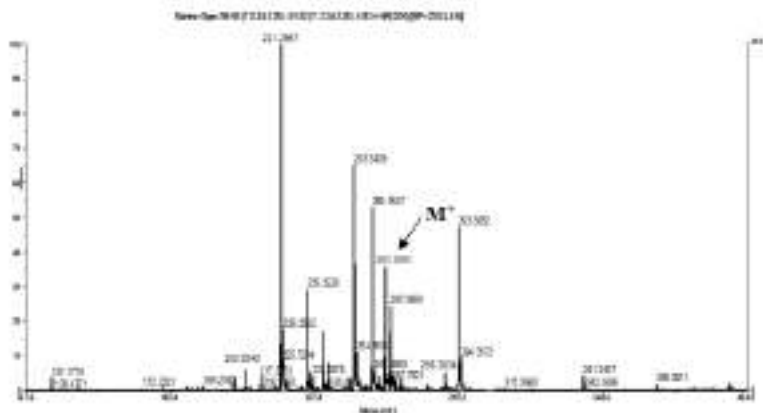


Gambar 23. Perkiraan Struktur isolat 2.2

Tabel IX. Data spektra ¹³C-NMR isolat 2.2

δ_c (ppm)	Kode	Perkiraan gugus fungsi
177,68	C-1	C=O
22.09	C-5''	-CH ₃
129,87; 130,54; 132,56; 134,98; 137,34; dan 140,11	C-3, C-8, C-4, C-7, C-5, dan C-6	-C=C- (aromatis)
30,67; 35,08; 60,01; 72,04; dan 100,10	C-4'', C-3'', C-2, C-1'', dan C-1'	-CH ₂ - (metilen)
111,27 dan 115,99	C-2'' dan C-2'	-CH- (metin)

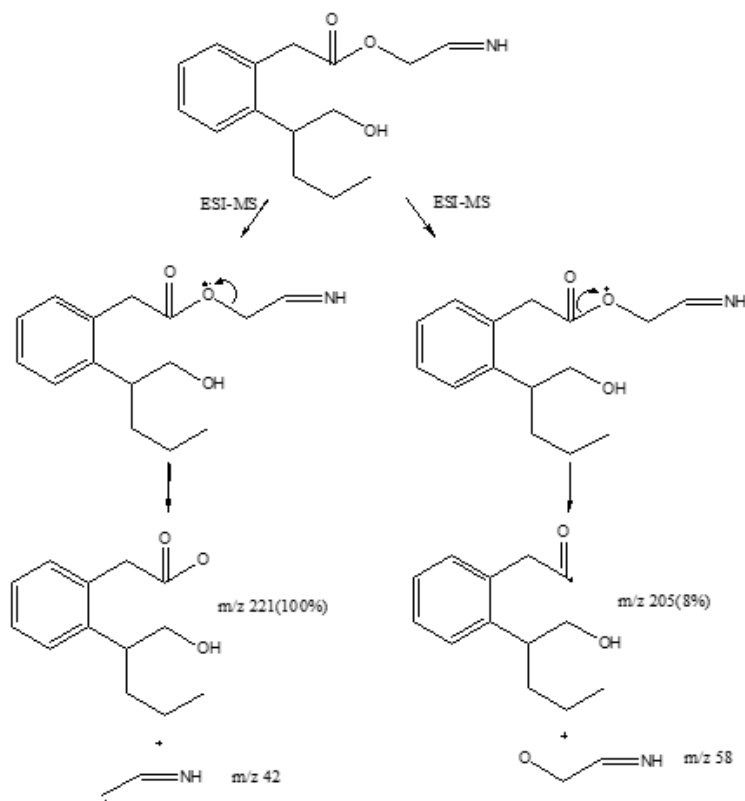
d. Analisis Spektrum Massa LC-MS



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 dominan 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 .

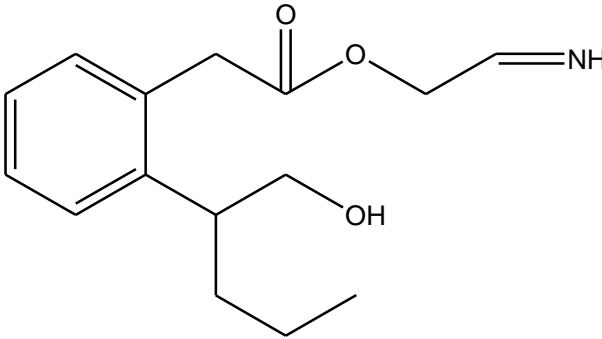
Puncak m/z 263 adalah sesuai dengan $[M]^+$ dari isolat 2.2 yang mempunyai rumus molekul $C_{15}H_{21}NO_3$ dengan bobot molekul 263,33 g/mol. Berdasarkan *peak* yang dihasilkan pada spektra tersebut, terlihat bahwa ion $C_{15}H_{21}NO_3^+$ mengalami beberapa pola fragmentasi. Pada pola fragmentasi yang 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 $C_2H_4ON^+$ 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 isolat 2.2 yang telah dijabarkan diatas dapat diduga bahwa isolat 2.2 merupakan senyawa derivat alkaloid dari L-serin dan L-fenilalanin dengan rumus molekul $C_{15}H_{21}NO_3$ dan rumus bangun seperti terlihat pada Gambar 26. Nama senyawa isolat 4 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*).



Gambar 26. Struktur Isolat 2.2

2-iminoethyl 2-(2-(1-hydroxypentan-2-yl)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 berasal dari prekursor D-asam giserin-3-fosfat menjadi 3-hidroksi-asam piruvat fosfat dengan katalis enzim fosfoglisarat dehidrogenase. 3-hidroksi-asam piruvat fosfat dibentuk kembali oleh enzim transferase yaitu fosfoserin aminotransferase menjadi L-serin-3-fosfat yang merupakan senyawa intermediet L-serin. Intermediet L-serin-3-fosfat pada akhirnya dibentuk menjadi L-serin dengan katalis enzim fosfoserin fosfatase (Luckner, 1990).

Gugus benzen aromatis isolat 2.2 berasal dari asam amino L-fenilalanin (jalur shikimate) yang mengalami jalur reaksi yang kompleks sehingga membentuk asam benzoat. Asam benzoat akan tereduksi dan kehilangan karbondioksida (CO_2) 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-fenilpentanol. 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-fenilpentanol yang teraktifkan pada posisi orto akan berinteraksi dengan asam formil asetat yang kemudian disertai reaksi dekarboksilasi (kehilangan CO_2) untuk membentuk senyawa intermediet 2-hidroksi pentanil benzaldehid.

L-serin yang mempunyai gugus hidroksi akan menyerang gugus karbonil senyawa 2-hidroksi pentanil benzaldehid pada

posisi karbon alpha yang bermuatan elektropositif, kemudian disertai kehilangan satu atom hidrogen dalam membentuk intermediet L-serin 2-hidroksi pentanil benzaldehid. Senyawa L-serin 2-hidroksi pentanil benzaldehid kemudian mengalami penambahan satu gugus hidroksi pada posisi atom N primer L-serin dengan katalis L-serin-N-monooksigenase untuk membentuk senyawa golongan N-hidroksi-L-serin. Senyawa golongan N-hidroksi-L-serin pada akhirnya akan mengalami reaksi dekarboksilasi oksidatif sehingga kehilangan senyawa CO₂ untuk membentuk senyawa alkaloid imina yaitu isolat 2.2 (*2-iminoethyl 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 shikimat (asam amino L-fenilalanin) dan jalur asetat (asam amino L-serin) (Lampiran 10).

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 (*Rhizoctonia solani*) and improving yield in pea (*Pisum sativum* L.). *Comptes Rendus Biologies*.
- Alahari, A., Trivelli, X., Guérardel, Y., Dover, L.G., Besra, G.S., Sacchetti, J.C., 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, R.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, J.C., dan Glickman, M.S., 2009. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Mycolic Acid Cyclopropane Synthase CmaA2 in Complex with Dioctylamine.
- Bartlett, J., 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., 1987. 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*. McGraw Hill Professional.
- Chen, I.-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., DuPont, 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, G.P., 2009. Diuretic activity of the leaves of *Coleus aromaticus* Benth. *Ancient Science of Life*, **29**: 20–21.
- Contreras, I., 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.
- Dalimartha, S., 2006. *Atlas tumbuhan obat Indonesia*. Niaga Swadaya.
- Denyer, S.P., Hodges, N., Gorman, S.P., dan Gilmore, B.F., 2011. *Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology*. John Wiley & Sons.
- Dewick, P.M., 2009. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley.

- Dewick, P.M., 2011. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic 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.H., Abdel-Monem, A.R., Ashour, R.S., dan Sleem, A.A., 2012. Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) 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, A.R., 2012. *Fermentation Microbiology and Biotechnology, Third Edition*, 3 edition. ed. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Gandjar, I. dan Rohman, A., 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. 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, R.B., 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 Edition*. CRC Press.
- Gonçalves, 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 *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*, **19**: 962–968.
- Graumann, P., 2012. *Bacillus: Cellular and Molecular Biology*. Horizon Scientific Press.

- Grzegorzewicz, A.E., Korduláková, J., Jones, V., Born, S.E.M., Belardinelli, J.M., Vaquié, 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 Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycobiology*, **37**: 31–36.
- Hadioetomo, R.S., 1990. *Mikrobiologi dasar dalam praktek: teknik dan prosedur dasar laboratorium*. PT Gramedia.
- Harborne, J.B., 1998. *Phytochemical Methods A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*. Springer.
- Harwood, L.M. dan Moody, C.J., 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 Kehutanan, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, hal. 1698–1699.
- Higginbotham, S.J., Arnold, A.E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P.D., dan Kursar, 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.G., 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.
- Hudziki, J., 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol,.
- Hullatti, K. dan Bhattacharjee, P., 2011. Pharmacognostical Evaluation of Different Parts of *Coleus amboinicus* Lour., Lamiaceae. *Pharmacognosy Journal*, **3**: 39–44.
- Istyastono, E., Yuniarti, N., dan Jumina, 2009. Sintesis Senyawa Berpotensi sebagai Inhibitor Angiogenesis : 2-benzilidenasikloheksana-1,3-dion. *Majalah Farmasi Indonesia*, (1–8).
- Iwamoto, M., Mu, Y., Lynfield, R., Bulens, S.N., Nadle, J., Aragon, D., dkk., 2013. Trends in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatrics*, **132**: e817–824.
- Jasperse, 2014. *MeltingRange*. URL: http://web.mnstate.edu/jasperse/Chem355/Melting20R_ange.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.H. dan Bienz, K.A., 2011a. *Medical Microbiology*. Thieme.
- Kemp, W., 1975. *Organic Spectroscopy*. Wiley, New York.
- Kharwar, R.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.
- Kowalska, T. dan Sherma, J., 2006. *Preparative Layer Chromatography*. CRC Press.
- Kraj, A., Desiderio, D.M., dan Nibbering, N.M., 2008. *Mass Spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*. John Wiley & Sons.

- Krieg, N.R., Parte, A., Ludwig, W., Whitman, W.B., Hedlund, B.P., Paster, B.J., dkk., 2011. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Springer.
- Kulandaivelu, S. dan Janarthanan, S., 2012. *Practical Manual on Fermentation Technology*. I.K. International Publishing House Pvt. Limited.
- Kumaran, A. dan Karunakaran, R.J., 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.J., dan Kisker, C., 2009. Crystal Structures of *Mycobacterium Tuberculosis* KasA Show Mode of Action within Cell Wall Biosynthesis and its Inhibition by Thiolactomycin. *Structure*, **17**: 1004–null.
- Macomber, R.S., 1998. *A Complete Introduction to Modern NMR Spectroscopy*. Wiley.
- Margino, 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 *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.G., 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: Triggle, J.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, K.B. dan Sakthivel, N., 2011. Extracellular synthesis of silver nanoparticles using the leaf extract of *Coleus amboinicus* Lour. *Materials Research Bulletin*, **46**: 1708–1713.
- NCCLS, 1999. *Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents: Approved Guideline*.
- Nisak, U.K., 2013. Isolasi Fungi Penghasil Senyawa Antimikroba dari Tanaman Jinten (*Coleus amboinicus* Lour.) dan Karakterisasi Senyawa Aktifnya dengan Metode KLT-Bioautografi. Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Pace, J.L., Rupp, M.E., dan Finch, R.G., 2005. *Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy*. CRC Press.
- Pane, C., Piccolo, A., Spaccini, R., Celano, G., Villecco, 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.
- Pirttilä, 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 Antimikrob. 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 AA1 dari Tanaman *Artemisia annua* Linn. Terhadap Sel T47D. Universitas Gadjah Mada.
- Ratnaweera, P.B., Williams, D.E., de Silva, E.D., Wijesundera, R.L.C., Dalisay, D.S., dan Andersen, R.J., 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.J., 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, II. 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.T., 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 antidandruff activity of the essential oil of *Coleus amboinicus* and *Eucalyptus globulus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, **2**, **Supplement 2**: S715–S719.
- Setiabudy, R. dan Gan, V.H.S., 1995. *Pengantar Antimikroba*, *Dalam Farmakologi dan Terapi*, Edisi Keempat. ed. Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia Ganiswara, Jakarta.
- Sharma, O.P., 1898. *Textbook of Fungi*. Tata McGraw-Hill Education.
- Siegel, M.R., Latch, G.C., Bush, L.P., Fannin, F.F., Rowan, D.D., Tapper, B.A., 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.
- Stępniewska, Z. dan Kuźniar, 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, U., 2010. *Elusidasi Struktur Senyawa Organik*, 1st ed, 1. 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 Phylogenetic Identification of Endophytes from Plants in Hokaido Japan and Java Indonesia. *Microbes and Environment*, **14**: 237–241.
- Tan, R.X. 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-Madison Department 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 *Periconia sp.* isolated from *Piper longum* L. *The Journal of antibiotics*, **64**: 427–431.
- Vijayafel, K., Anbulevam, C., dan Ashokkumar, B., 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. 359–364.
- Winny, S., 2009. *Buku Ajar Untuk Mahasiswa 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. Antifungal and antibacterial metabolites from an endophytic *Aspergillus sp.* associated with *Melia azedarach*. *Natural product research*, .

- Yu, H., 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*, **165**: 437–449.
- Zellagui, 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.

Glosarium



Bakteri :	Mikroba bersel satu yang memiliki dinding sel, berkembang biak dengan membelah diri, yang memiliki empat bentuk utama yaitu kokus, basil, spiral, koma.
Mikroba endofit	Mikroba yang memiliki ukuran yang sangat kecil yang hidup dalam jaringan tanaman.
Kromatografi	teknik analisis yg pemisahan komponennya didasarkan pd perbedaan suatu sifat berpindah antara dua fase, fase yg satu bergerak dan fase yg lain diam
Terpenoid	merupakan metabolit sekunder
Membran sel	fitur universal yang dimiliki oleh semua jenis sel berupa lapisan antarmuka yang disebut membran plasma, yang memisahkan sel dengan lingkungan di luar sel, terutama untuk melindungi inti sel dan sistem kelangsungan hidup yang bekerja di dalam sitoplasma

<i>Senyawa organik</i>	Golongan besar senyawa kimia yang molekulnya mengandung karbon, kecuali karbida, karbonat, dan oksida karbon seperti protein, lemak, dan karbohidrat, merupakan komponen penting dalam biokimia.
<i>Isolasi</i>	Teknik yang digunakan untuk mendapatkan satu senyawa dari kumpulan senyawa.
<i>Enzim</i>	biomolekul berupa protein yang berfungsi sebagai katalis (senyawa yang mempercepat proses reaksi tanpa habis bereaksi) dalam suatu reaksi kimia organik.
<i>Fungi</i>	Jamur

Indeks



- Bacillus subtilis*, 14, 17, 18, 60
Escherichia coli, 14, 16, 17, 49, 60
Etil asetat, 42
Fermentasi, 22, 40
Fungi endofit, 7, 13, 38
Kromatografi Cair Kinerja Tinggi, 31
Kromatografi lapis tipis, 28
L-serin, 75, 77
Metode difusi, 26
Metode dilusi, 26
Mikroba endofit, 7, 13, 91
Optimasi fase gerak, 53
Penambatan molekul, 35
Pseudomonas aeruginosa, 6, 19, 20, 60, 80, 87
Rhizoctonia cerealis, 39
Rhizoctonia solani, 39
Salmonella thypi, 18, 19
Senyawa fenolik, 11
Sistem *continuous*, 23
Spektrofotometri inframerah, 30
Spektroskopi massa, 30
Spektroskopi NMR, 32, 33, 34
Staphylococcus aureus, 14, 15, 16, 49, 60, 80, 84
Tanaman jinten, 9
Uji antibakteri, 60

Buku dengan judul "Senyawa Antibakteri dari Fungi Endofit" ini merupakan salah satu seri buku dari topik penelitian tentang fungi endofit yang dapat menghasilkan senyawa bioaktif. Buku ini bercerita tentang salah satu fungi endofit genus *Rhizoctonia* sp. yang diisolasi dari tanaman jinten.

Fungi ini dikembangkan dengan metode fermentasi dan dalam waktu 14 dapat dipanen untuk menghasilkan senyawa antibakteri. Senyawa terpenoid yang dihasilkan memiliki aktifitas yang tinggi terhadap bakteri patogen *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, dan *S.Thypi*. Semoga buku ini dapat bermanfaat untuk kita semua. Salam jiwa peneliti.



Seribu Bintang

www.SeribuBintang.co.id
info@SeribuBintang.co.id
fb.com/cv.seribu.bintang

ISBN 978-623-7000-87-5



9 786237 000075