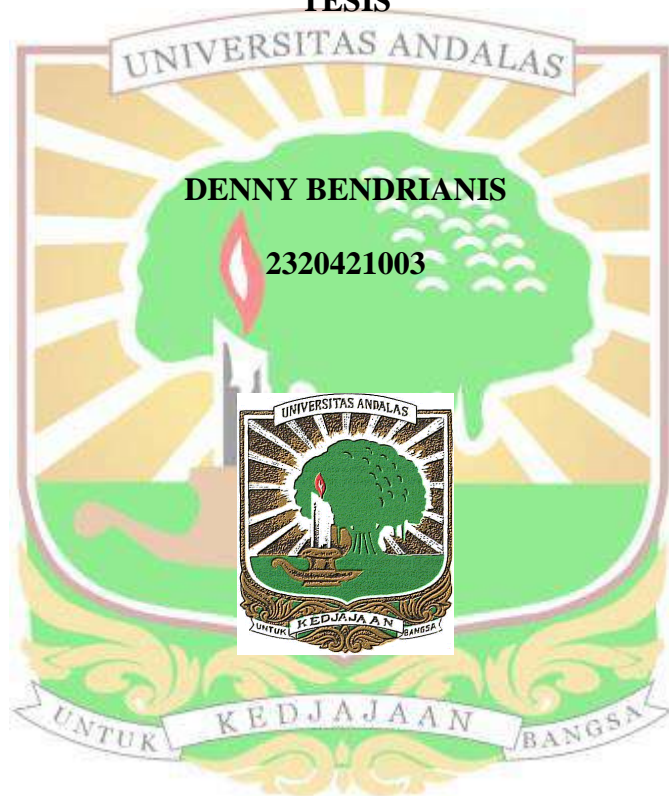


**IDENTIFIKASI MOLEKULER DAN POTENSI METABOLIT  
SEKUNDER ANTIOKSIDAN ISOLAT JAMUR ENDOFIT TUMBUHAN  
MANGROVE (*Rhizophora apiculata*)**

**TESIS**



**DENNY BENDRIANIS**

**2320421003**

**PROGRAM STUDI MAGISTER  
DEPARTEMEN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS ANDALAS  
PADANG, 2024**

**IDENTIFIKASI MOLEKULER DAN POTENSI METABOLIT  
SEKUNDER ANTIOKSIDAN ISOLAT JAMUR ENDOFIT TUMBUHAN  
MANGROVE (*Rhizophora apiculata*)**

**TESIS**



*Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Magister Sains Pada  
Program Studi Magister Biologi Universitas Andalas*

**PROGRAM STUDI MAGISTER**

**DEPARTEMEN BIOLOGI**

**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM**

**UNIVERSITAS ANDALAS**

**PADANG, 2024**

**HALAMAN PENGESAHAN**

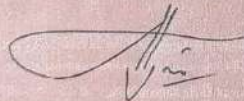
Judul : Identifikasi Molekuler Dan Potensi Metabolit Sekunder  
Antioksidan Isolat Jamur Endofit Tumbuhan Mangrove  
(*Rhizophora apiculata*)  
Nama : Denny Bendrianis  
NIM : 2320421003  
Program Studi : Magister Biologi

Tesis ini telah diuji dan dipertahankan dihadapan panitia ujian akhir Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas dan dinyatakan lulus pada tanggal 20 Mei 2024.

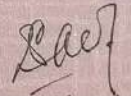
Menyetujui,  
Komisi Pembimbing

Ketua Pembimbing

Anggota Pembimbing



(Dr. Anthoni Agustien, MS)  
NIP. 196208121988111001



(Dr. Feskaharny Alamsjah, M. Si)  
NIP. 196407141990012001

Kepala Departemen Biologi  
Universitas Andalas



(Dr. Wilson Novarino)  
NIP. 197111031998021001

Ketua Program Studi S2 Biologi  
Universitas Andalas



(Prof. Dr. Erizal Mukhtar)  
NIP. 195709011986031004

## RIWAYAT HIDUP



Denny Bendrianis

Penulis dilahirkan di Pitalah, Kecamatan Batipuh, Kabupaten Tanah Datar pada tanggal 23 Januari 2001.

Penulis merupakan anak bungsu dari empat bersaudara dari pasangan Apa Bendrizal dan Amak Dekonis. Penulis

memulai Pendidikan di TK Nurul Iman, SDN 33 Batipuh,

SMPN 1 Batipuh dan SMAN 1 Batipuh. Pada tahun 2019 – 2023 penulis melanjutkan Pendidikan S1 Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Penulis melanjutkan Pendidikan S2 di Program Studi Magister Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas melalui program *Fast Track*. Selama perkuliahan penulis berkesempatan menjadi asisten Laboratorium Mikrobiologi dan aktif dalam beberapa kepanitian acara dan berkontribusi dalam organisasi dalam maupun luar kampus.



## PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Denny Bendrianis

NIM : 2320421003

Dengan ini saya menyatakan bahwa tesis yang ditulis dengan judul “Identifikasi Molekuler Dan Potensi Metabolit Sekunder Antioksidan Isolat Jamur Endofit Tumbuhan Mangrove (*Rhizophora apiculata*)” adalah asli dan belum pernah diajukan untuk gelar master baik di Universitas Andalas atau di lembaga pendidikan tinggi lainnya. Tesis dan penelitian ini adalah hasil karya atau kerja saya sendiri dan bukan ciplakan dari hasil karya atau kerja orang lain, kecuali kutipan yang sumbernya dicantumkan.

Pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya dan apabila dikemudian hari terdapat kejangalan atau ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan aturan yang berlaku.



Padang, Mei 2024  
Yang menyatakan

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Denny Bendrianis', written over a horizontal line.

Denny Bendrianis  
NIM. 2320421003

## HALAMAN PENGHARGAAN

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

“Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman dari kamu sekalian dan orang-orang yang berilmu beberapa derajat. (Qs. Al Mujadalah 58:11)”

Alhamdulillahil'alamina...

Puji syukur kepada Allah SWT atas limpahan rahmat dan nikmat-Nya sehingga tesis ini dapat terselesaikan dengan baik. Dengan ridho-Mu, kupersembahkan tesis ini kepada kedua orangtuaku, Apa Bendrizal dan Amak Dekonis yang selalu mendoakan dan mendukungku, serta saudaraku Kak Mulyendra., S.S, Kak Dona Astriana., A.Md.Keb, Uda Ade Bendrianis, Uda Kosasih Efendi., S.pd, Uda Aidil Fiandri kuucapkan banyak terima kasih untuk semangat dan nasehatnya selama ini, tidak lupa terima kasih untuk moodboosterku keponakan tersayang Andhika Pradhana, Savero Pradhana, Anindhia Pradhana, Azlan Alfarizi dan Elzio Andrian.

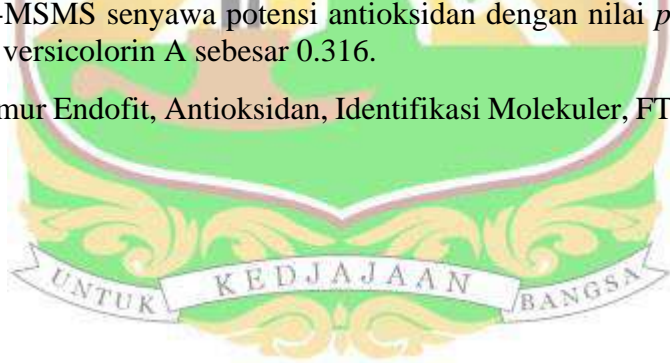
Teruntuk orang-orang penting dalam hidupku yang selalu menemani, mendengarkan dan memberikan semangat serta kepada teman-teman se-dospem. Selanjutnya untuk seseorang yang hadirnya tidak nyata tapi perannya luar biasa Lee Haechan yang selalu menjadi moodbooster dan penyemangat penulis melalui karya-karyanya, kata-kata motivasinya dan konten yang sangat menghibur. Tak lupa juga great appreciation for me and myself.

Terakhir, untuk seluruh keluarga Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Universitas Andalas, Terimakasih untuk semua kebersamaan dan bantuan selama ini dalam melewati suka duka di bangku perkuliahan.

## ABSTRAK

Tanaman mangrove diketahui menjadi salah satu sumber jamur endofitik yang menghasilkan beragam senyawa metabolit bioaktif dengan berbagai aktivitas biologis, seperti potensi antioksidan yang dapat meredam radikal bebas penyebab rusaknya sel jaringan tubuh. Tujuan penelitian ini yaitu untuk identifikasi molekuler isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata* dan Menganalisis potensi senyawa metabolit sekunder antioksidan isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata*. Penelitian dilakukan dengan identifikasi molekuler jamur endofit menggunakan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*). Selanjutnya, dilakukan identifikasi senyawa metabolit jamur endofit ekstrak etil asetat menggunakan instrument FTIR, GC MS dan LC MS-MS. Hasilnya menunjukkan analisis berbasis molekuler dari isolat jamur endofit mangrove EUA-111 memiliki similaritas dengan *Aspergillus flavus* ATCC 16883 ITS *region*. Analisis senyawa menggunakan FTIR diperoleh 15 *peak* dengan 8 serapan atau gugus fungsi yang berbeda; Analisis GC MS diperoleh 29 *peak* yang terdiri dari 17 senyawa berbeda dan 15 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan; Analisis LC MS-MS diperoleh 16 senyawa dan 7 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan. Potensi antioksidan tertinggi yang diperoleh dari GC-MS yaitu senyawa 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate dengan nilai *potential activity* yaitu 0.775 dan LC-MSMS senyawa potensi antioksidan dengan nilai *potential activity* tertinggi yaitu versicolorin A sebesar 0.316.

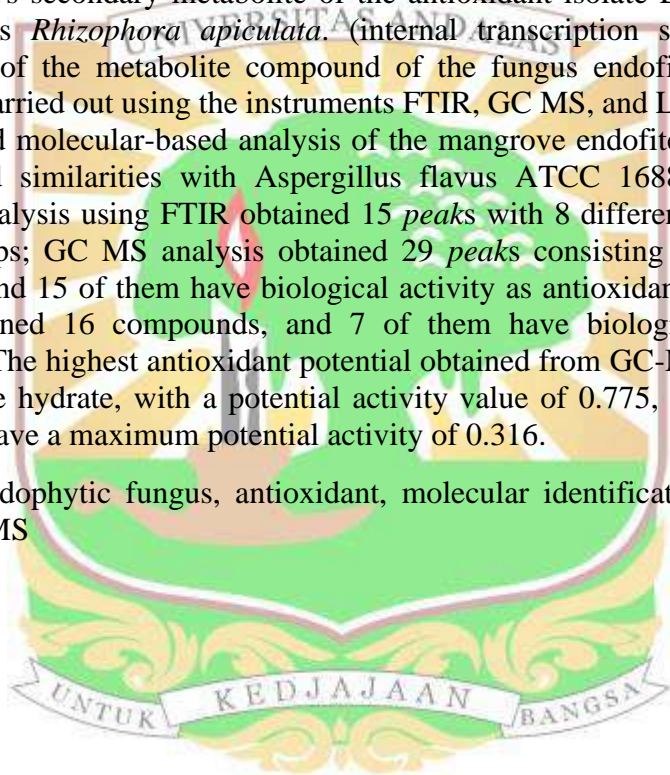
Kata kunci: Jamur Endofit, Antioksidan, Identifikasi Molekuler, FTIR, GC MS, LC MS-MS



## ABSTRACT

Mangrove plants are known to be a source of endophytic mushrooms that produce a variety of bioactive metabolite compounds with a range of biological activities, such as antioxidant potential that can suppress free radicals causing cell damage to body tissues. The objective of the study is to identify the molecular isolate of the EUA-111 endophytic fungus *Rhizophora apiculata* and to analyze the potential of the compound's secondary metabolite of the antioxidant isolate EUA-111 of the endofit fungus *Rhizophora apiculata*. (internal transcription spacer). Further identification of the metabolite compound of the fungus endofit extract, ethyl acetate, was carried out using the instruments FTIR, GC MS, and LC MS-MS. The results showed molecular-based analysis of the mangrove endofite fungus isolate EUA-111 had similarities with *Aspergillus flavus* ATCC 16883 ITS *region*. Compound analysis using FTIR obtained 15 *peaks* with 8 different absorption or function groups; GC MS analysis obtained 29 *peaks* consisting of 17 different compounds, and 15 of them have biological activity as antioxidants; LC MS-MS analysis obtained 16 compounds, and 7 of them have biological activity as antioxidants. The highest antioxidant potential obtained from GC-MS is 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate, with a potential activity value of 0.775, and LC-MSMS antioxidants have a maximum potential activity of 0.316.

Keywords: endophytic fungus, antioxidant, molecular identification, FTIR, GC MS, LC MS-MS

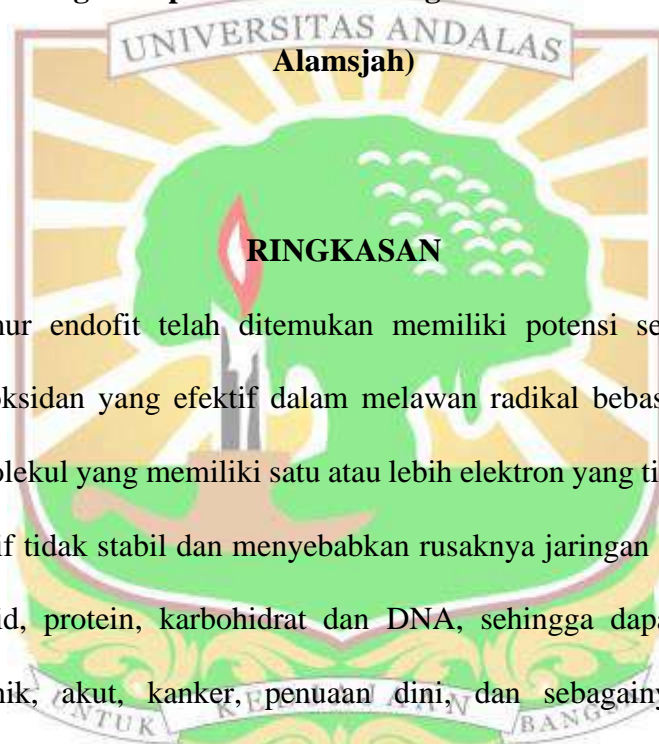




**Identifikasi Molekuler Dan Potensi Metabolit Sekunder Antioksidan Isolat  
Jamur Endofit Tumbuhan Mangrove (*Rhizophora apiculata*)**

**Oleh: Denny Bendrianis (2320421003)**

**(Di bawah bimbingan Bapak Dr. Anthoni Agustien dan Ibu Dr. Feskaharny**



Metabolit jamur endofit telah ditemukan memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antioksidan yang efektif dalam melawan radikal bebas. Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga relatif tidak stabil dan menyebabkan rusaknya jaringan sel tubuh seperti kerusakan lipid, protein, karbohidrat dan DNA, sehingga dapat menimbulkan penyakit kronik, akut, kanker, penuaan dini, dan sebagainya. Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih elektron untuk radikal bebas, sehingga radikal bebas dapat diredam, berperan dalam perlindungan sel dari kerusakan, mencegah oksidasi dan dapat melindungi tubuh dari *Reactive Oxygen Species* (ROS). Eksplorasi sumber antioksidan yang berasal dari tumbuhan akan memberikan dampak terhadap kelangsungan hidup tumbuhan, membutuhkan banyak pelarut organik dan hasil produk yang sedikit, sehingga menimbulkan biaya

produksi yang tinggi, untuk itu perlu adanya solusi dengan memanfaatkan mikroba endofit yang terdapat pada jaringan tumbuhan.

Penelitian ini bertujuan untuk identifikasi molekuler isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata* dan Menganalisis potensi senyawa metabolit sekunder antioksidan isolat EUA-111 jamur endofit dari tumbuhan mangrove *Rhizophora apiculata*. Hasil dari penelitian ini diperoleh jenis jamur endofit mangrove dan ditemukan berbagai senyawa metabolit sekunder jamur endofit mangrove yang memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan.

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari hingga Maret 2024 menggunakan koleksi isolat jamur endofit *Rhizophora apiculata* (Endofitik Universitas Andalas) EUA-111 dari Laboratorium Bioteknologi yang diisolasi dari tumbuhan mangrove kawasan Kapo-Kapo, Mandeh, Sumatera Barat yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 16,59  $\mu$ L. Tahapan penelitian dilakukan dengan identifikasi molekuler jamur endofit menggunakan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) dengan tahapan isolasi DNA yang menggunakan Kit Phytopure™ (Amersham); Amplifikasi menggunakan primer ITS5 (*forward*) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') dan primer ITS4 (*reverse*) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') dengan tahapan PCR yaitu 90 detik pada 95°C untuk denaturasi awal, diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari 30 detik pada 95°C untuk denaturasi, 30 detik pada 55°C untuk proses *annealing*, 90 detik pada 72°C untuk extension dan 5 menit pada 72°C untuk extension akhir, serta suhu penyimpanan tahap akhir adalah 15°C; Analisis hasil PCR dengan elektroforesis pada gel agarose 1%; Sekuensing DNA menggunakan *software* DNA

STAR dan data sekuen dibandingkan dengan BLAST; Analisis penjajaran sekuen dan hubungan kekerabatan (filogenetik) menggunakan *software* ClustalX, BIOEDIT dan MEGA dengan metode *Neighbor Joining bootstrap* 1000x, selanjutnya isolasi senyawa metabolit sekunder isolat jamur endofit EUA-111, jamur dikultivasi selama 14 hari, lalu jamur hasil kultivasi dioven selama 3 jam, setelah dioven jamur dimaserasi dengan pelarut etil asetat selama 2-3 hari, setelah dimaserasi jamur disaring dan filtrat yang didapatkan selanjutnya dievaporasi menggunakan rotary evaporation sampai didapatkan ekstrak jamur. Selanjutnya sampel diuji untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder antioksidan dengan FTIR, GC-MS, dan LC MS-MS.

Berdasarkan identifikasi molekuler dengan menggunakan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) diperoleh hasil bahwa isolat EUA-111 memiliki similaritas 99,50% dengan *Aspergillus flavus strain* ATCC 16883 dan identifikasi senyawa metabolit sekunder EUA-111 ekstrak etil asetat berdasarkan instrument FTIR diperoleh hasil yang menunjukkan adanya beberapa ikatan atau gugus senyawa yaitu gugus hidroksil (O-H), ikatan C-H, gugus karbonil (C=O), gugus hidroksi (C-O) dan gugus alkena (C=C); Berdasarkan analisis GC-MS diperoleh 17 senyawa, 15 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan dan diperoleh satu senyawa yang memiliki nilai potensial aktivitas tertinggi yaitu 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate sebesar 0.775; Berdasarkan analisis LC-MSMS diperoleh 16 senyawa, 7 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan dan diperoleh satu senyawa memiliki nilai potensial aktivitas tertinggi yaitu versicolorin A sebesar 0.316.

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirabbil'aalamiin, puji dan syukur penulis ucapkan kehadiran Allah Subhaanahu Wa Ta'ala atas limpahan rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan program studi Magister di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Shalawat dan salam semoga selalu tercurah kepada Rasulullah SAW, teladan terbaik bagi manusia. Tesis ini disusun berdasarkan hasil penelitian dalam mata ajaran Mikrobiologi yang berjudul **“Identifikasi Molekuler Dan Potensi Metabolit Sekunder Antioksidan Isolat Jamur Endofit Tumbuhan Mangrove (*Rhizophora apiculata*)”**.

Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar besarnya kepada Kedua Orang tua dan keluarga yang telah memberikan dukungan moril kepada penulis. Ucapan terima kasih juga ditujukan kepada Bapak Dr. Anthoni Agustien dan Ibu Dr. Feskaharny Alamsjah sebagai Dosen Pembimbing yang telah memberikan bimbingan, masukan, bantuan, ilmu, dan sarannya kepada penulis sejak awal penyusunan proposal hingga terlaksananya ujian akhir. Selanjutnya, ucapan Terimakasih penulis tujukan kepada:

1. Bapak Dr. Wilson Novarino selaku Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.

2. Bapak Prof. Dr. Erizal Mukhtar selaku Ketua Program Studi S2 & S3 Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas
3. Ibu Dr. Rita Maliza, Bapak Dr. Djong Hon Tjong dan Ibu Prof. Dr. Ir. Yetti Marlida, MP selaku penguji yang telah memberikan saran dan masukan demi menyempurnakan tesis ini.
4. Bapak dan Ibu Dosen staf pengajar Departemen Biologi, Program Studi Magister, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas. Karyawan dan Karyawati di Lingkungan Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Andalas.
5. Semua pihak yang sangat berperan dalam penyelesaian tesis ini, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis berharap agar tesis ini bermanfaat bagi pembaca dan berkontribusi dalam ilmu biologi secara umum. Semoga Allah senantiasa melimpahkan rahmat-Nya kepada kita semua.



Padang, Mei 2024

Denny Bendrianis

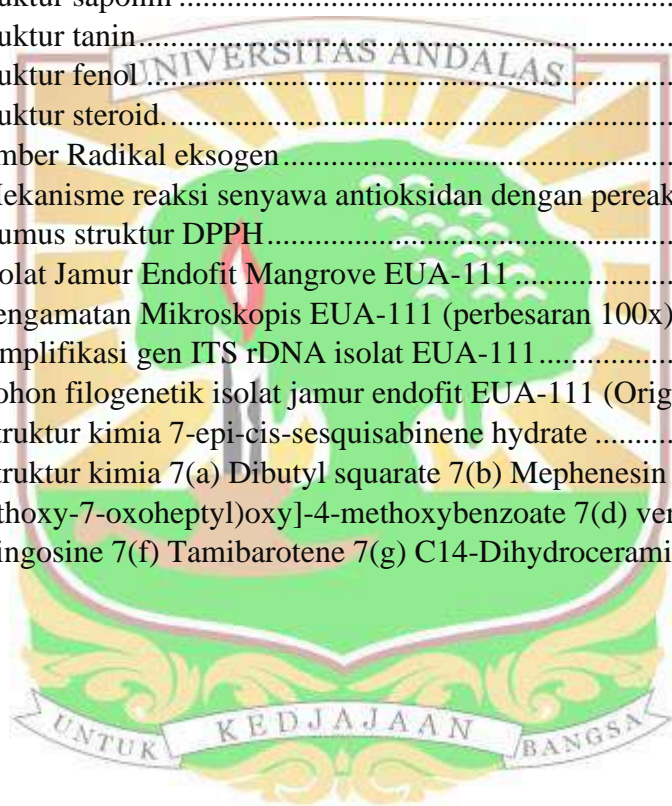
## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	<b>i</b>
<b>RIWAYAT HIDUP</b> .....	<b>ii</b>
<b>PERNYATAAN KEASLIAN TESIS</b> .....	<b>iii</b>
<b>HALAMAN PENGHARGAAN</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRAK</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xiv</b>
<b>DAFTAR GRAFIK</b> .....	<b>xv</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xvi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xvii</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
A. Latar Belakang .....	1
B. Rumusan Masalah .....	3
C. Tujuan Penelitian .....	3
D. Manfaat Penelitian .....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>4</b>
A. Tanaman Mangrove <i>Rhizophora apiculata</i> .....	4
B. Mikroorganisme Endofit .....	7
C. Metabolit Sekunder .....	10
D. Antioksidan .....	13
E. Identifikasi Molekuler .....	19
F. GC-MS .....	22
G. LC MS-MS .....	26
H. FTIR .....	28

<b>BAB III. METODE PENELITIAN .....</b>	<b>30</b>
A. Tempat dan Waktu .....	30
B. Metode Penelitian.....	30
C. Alat dan Bahan.....	30
1. Alat .....	<b>30</b>
2. Bahan.....	<b>30</b>
D. Prosedur Kerja.....	31
1. Persiapan Penelitian .....	<b>31</b>
a. Sterilisasi.....	31
b. Pembuatan Medium <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA) .....	31
c. Pembuatan Medium <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB) .....	31
2. Pelaksanaan Penelitian .....	<b>31</b>
a. Peremajaan Jamur Endofitik.....	31
b. Identifikasi Konvensional Isolat Jamur Endofit .....	32
c. Identifikasi Molekuler Isolat Jamur Endofit.....	32
d. Pembuatan dan Perbanyak Inokulum.....	35
e. Fermentasi jamur endofit EUA-111 .....	35
f. Ekstraksi Hasil Fermentasi .....	35
g. Uji Antioksidan.....	36
h. Identifikasi senyawa ekstrak jamur endofit dengan GC-MS, LC MS-MS dan FTIR .....	37
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>40</b>
A. Isolat Jamur Endofit Mangrove EUA-111 .....	40
B. Identifikasi Molekuler Isolat Jamur Endofit .....	42
C. Uji Antioksidan .....	49
D. FTIR ( <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ) .....	50
E. GC-MS ( <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> ) .....	53
F. LC-MSMS ( <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> ) .....	57
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>63</b>
A. Kesimpulan .....	63
B. Saran.....	63
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>64</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>78</b>

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Morfologi <i>Rhizophora apiculata</i> .....	5
Gambar 2. Struktur metabolit sekunder <i>R. apiculata</i> .....	6
Gambar 3. Struktur flavonoid .....	10
Gambar 4. Struktur alkaloid.....	11
Gambar 5. Struktur saponin .....	12
Gambar 6. Struktur tanin.....	12
Gambar 7. Struktur fenol.....	13
Gambar 8. Struktur steroid.....	13
Gambar 9. Sumber Radikal eksogen.....	17
Gambar 10. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan pereaksi DPPH ....	17
Gambar 11. Rumus struktur DPPH.....	18
Gambar 12. Isolat Jamur Endofit Mangrove EUA-111 .....	40
Gambar 13. Pengamatan Mikroskopis EUA-111 (perbesaran 100x).....	41
Gambar 14. Amplifikasi gen ITS rDNA isolat EUA-111.....	42
Gambar 15. Pohon filogenetik isolat jamur endofit EUA-111 (Original Tree)....	46
Gambar 16. Struktur kimia 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate .....	57
Gambar 17. Struktur kimia 7(a) Dibutyl squarate 7(b) Mephenesin 7(c) Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate 7(d) versicolorin A 7(e) Phytosphingosine 7(f) Tamibarotene 7(g) C14-Dihydroceramide .....	61





**DAFTAR GRAFIK**

	Halaman
Grafik 1. Spektrum IR metabolit sekunder jamur endofit EUA-111 .....	50
Grafik 2. Kromatogram GC-MS metabolit sekunder jamur endofit EUA-111 ....	53
Grafik 3. Kromatogram LC-MSMS metabolit sekunder jamur endofit EUA-111	57



## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. LC MSMS Analisis Detail .....	39
Tabel 2. Hasil analisis BLAST isolat EUA-111 dengan isolat yang terdapat di GenBank.....	44
Tabel 3. Hasil uji antioksidan menggunakan beberapa pelarut.....	49
Tabel 4. Hasil analisis FTIR jamur endofit EUA-111 .....	51
Tabel 5. Hasil analisis FTIR jamur endofit EUA-111 .....	53
Tabel 6. Hasil representasi web passonline terhadap 17 senyawa hasil GC-MS..	55
Tabel 7. Hasil interpretasi data dengan LC MSMS .....	58
Tabel 8. Hasil representasi web passonline terhadap 16 senyawa hasil LC-MSMS .....	59



## DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Pengamatan Mikroskopis EUA-111 .....
- Lampiran 2. Contoh elektroforegram hasil sekuensing isolat jamur EUA-111....
- Lampiran 3. Komposisi Basa Nukleotida .....
- Lampiran 4. Persentase sekuen divergence (p-distance).....
- Lampiran 5. Pohon filogenetik metode NJ dengan bootstrap 1000x .....



## BAB I. PENDAHULUAN

### A. Latar Belakang

Mangrove adalah ekosistem yang memiliki hubungan timbal balik antara makhluk hidup dengan lingkungannya (Hutasoit *et al.*, 2014). Spesies mangrove di Indonesia mencapai 202 spesies yang tersebar di seluruh negeri (Wardani *et al.*, 2016). Komunitas mangrove tumbuh di perairan payau atau muara dengan kisaran salinitas yang luas (Rozirwan *et al.*, 2020; 2022). Beberapa spesies mangrove yang ditemukan di Sumatra Barat diantaranya seperti *Rhizophora apiculata*, *Bruguiera gymnorrhiza*, *Ceriops tagal*, *Sonneratia ovata*, *Scyphiphora hydrophyllacea*, *Aegiceras corniculatum*, dan *Lumnitzera littorea* (Ofrizal *et al.*, 2017). Tanaman mangrove diketahui menjadi salah satu sumber jamur endofitik yang menghasilkan beragam senyawa metabolit bioaktif dengan berbagai aktivitas biologis (Sari *et al.*, 2022).

Jamur endofit adalah jamur yang hidup dalam jaringan tanaman yang memiliki kemampuan untuk meniru metabolit sekunder yang sama dengan inangnya melalui proses transfer genetik tanpa merusak jaringan tanaman inangnya (Tadizh & James, 2013; Zhang *et al.*, 2011; Agusta, 2009). Jamur mangrove berpotensi menghasilkan banyak senyawa, termasuk metabolit bioaktif (Hamed *et al.*, 2015) seperti fenolik, flavonoid, tanin, alkaloid, dan saponin (Das *et al.*, 2020; Sobolewska *et al.*, 2020; Gurudeeban *et al.*, 2015). Metabolit jamur endofit telah ditemukan memiliki potensi sebagai penghasil senyawa antioksidan yang efektif dalam melawan radikal bebas (Nafiannisa *et al.*, 2020). Radikal bebas merupakan molekul yang memiliki satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan sehingga relatif tidak stabil (Ridlo *et al.*,

2017) dan menyebabkan rusaknya jaringan sel tubuh seperti kerusakan lipid, protein, karbohidrat dan DNA, sehingga dapat menimbulkan penyakit kronik, akut, kanker, dan penuaan dini (Suryadi, 2013). Antioksidan merupakan senyawa kimia yang dapat memberikan satu atau lebih elektron untuk radikal bebas, sehingga radikal bebas dapat diredam (Romadanu *et al.*, 2014). Antioksidan juga berperan dalam perlindungan sel dari kerusakan, mencegah oksidasi serta melindungi tubuh dari *Reactive Oxygen Species* (ROS) (Omodamiro *et al.*, 2016).

Penelitian Nurhalimah *et al.* (2021) menguji aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder jamur endofit mangrove *Aegiceras corniculatum* diperoleh 1 isolat yang aktif yang menghasilkan antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 19,28  $\mu\text{L/mL}$ , senyawa yang teridentifikasi diantaranya phenol, hexadecanoic acid, hexadecanoic acid methyl ester, malic acid, N-aminopyrrolidine, 9-octadecanoic acid, methyl ester (E), benzenethanol, 4-hydroxy, 1,2-benzenedicarboxylic acid, d-tyrosine, bis(2-methylpropyl) ester 1-nonadecene dan heneicosane.

Penelitian ini menggunakan koleksi isolat jamur endofit *Rhizophora apiculata* (Endofitik Universitas Andalas) EUA-111 yang berasal dari kawasan Kapo-Kapo, Mandeh, Sumatera Barat yang diketahui memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 16,59  $\mu\text{L}$  (Zalamah, 2023). Berdasarkan hal tersebut penting untuk memperluas penelitian ini dengan melakukan identifikasi molekuler jamur endofit dari *Rhizophora apiculata* dan identifikasi senyawa antioksidan yang dihasilkan sehingga penelitian ini berpotensi untuk memberikan kontribusi dalam berbagai bidang industri, serta pengembangan obat-obatan dan bahan pangan berbasis sumber daya alam. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian

mengenai “Identifikasi Molekuler dan Potensi Metabolit Sekunder Antioksidan Isolat Jamur Endofit Tanaman Mangrove (*Rhizophora apiculata*)”.

## **B. Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah pada penelitian ini yaitu:

1. Apakah jenis isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata* berdasarkan identifikasi molekuler?
2. Apakah jenis senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata*?
3. Bagaimanakah potensi senyawa metabolit sekunder antioksidan isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata*?

## **C. Tujuan Penelitian**

Adapun tujuan penelitian ini yaitu:

1. Menganalisis jenis isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata* berdasarkan identifikasi molekuler.
2. Menganalisis jenis senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata*.
3. Menganalisis potensi senyawa metabolit sekunder antioksidan isolat EUA-111 jamur endofit *Rhizophora apiculata*.

## **D. Manfaat Penelitian**

Manfaat penelitian ini adalah untuk menambah khazanah ilmu pengetahuan dan memberikan informasi ilmiah mengenai Identifikasi Molekuler dan Potensi metabolit sekunder antioksidan isolate Jamur Endofit Tanaman Mangrove (*Rhizophora apiculata*).

## BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

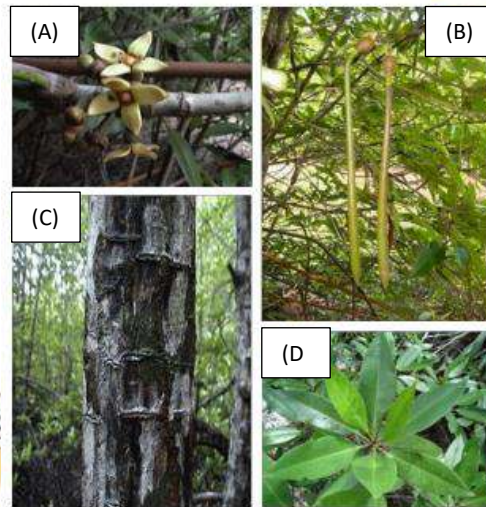
### A. Tanaman Mangrove *Rhizophora apiculata*

Mangrove merupakan salah satu ekosistem tumbuhan yang tumbuh subur di daerah dengan tanah lembab atau zona pasang surut. Sekelompok peneliti mengidentifikasi lebih dari 30 keluarga tanaman mangrove (Minobe *et al.*, 2010). Hal ini menunjukkan bahwa nilai ekologi dan ekonomi mangrove dalam berbagai aspek, termasuk kayu, sumber kayu bakar, habitat ideal bagi beragam satwa liar, pertahanan biologis dari tsunami dan badai, dan mitigasi erosi (Ong *et al.*, 2004; Hashim *et al.*, 2010). Ekosistem mangrove terdapat di sepanjang daerah pasang surut dengan salinitas tinggi dan kondisi pasang surut tinggi (Sheue *et al.*, 2013). Karena kondisi tersebut hutan mangrove telah berevolusi, menjadikannya spesies mangrove yang unik dengan kemampuan adaptasi yang mampu bertahan dalam kondisi ekstrim (Mohd Arrabe & Noraini, 2013; Samaddar & Jayakumar, 2015).

Keluarga tumbuhan mangrove, *Rhizophoraceae*, terdiri dari 16 genera dan 149 spesies di seluruh dunia yang cenderung tumbuh subur di hutan mangrove pesisir tropis dan subtropic ekosistem (Balasubramanian *et al.*, 2015). Empat genus mangrove yang terkenal yaitu *Rhizophora*, *Bruguiera*, *Ceriops* dan *Kandelia* yang diklasifikasikan sebagai spesies mangrove sejati, tersebar terutama di zona *intertidal* (Sheue *et al.*, 2013; Setyawan & Ulumuddin, 2012). *Rhizophora* merupakan genus terbesar di Famili *Rhizophoraceae*, terdiri dari tiga spesies utama yaitu *R. mucronata*, *R. stylosa* dan *R. apiculata*, serta dua spesies hibrida yaitu *R. x lamarckii* dan *R. x annamalayana* (Setyawan & Ulumuddin, 2012).

Menurut Zipcodezoo (2016) klasifikasi *Rhizophora apiculata* sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
 Subphylum : Euphyllophytina  
 Infraphylum : Radiotopses  
 Subclass : Magnoliidae  
 Family : Rhizophoraceae  
 Genus : *Rhizophora*  
 Species : *R. Apiculata*



Gambar 1. Morfologi *Rhizophora apiculata*.  
 A. Bunga, B. Propagul, C. Pohon, D. Daun  
 (Sumber: Vittaya *et al.*, 2022)

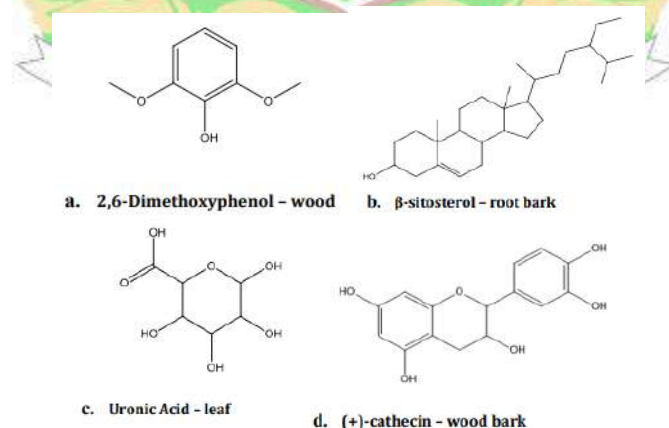
*Rhizophora apiculata* termasuk dalam mangrove sejati yang artinya adalah kelompok jenis tumbuhan mangrove yang membentuk tegakan murni atau mendominasi dalam komunitas mangrove dan memiliki akar napas (Santoso *et al.*, 2015). *Rhizophora apiculata* terkenal akan khasiat obatnya (Mahmud *et al.*, 2014; Satyavani *et al.*, 2012). Umumnya tanaman ini dimanfaatkan dalam pengobatan berbagai penyakit atau insektisida dan obat-obatan (Gajula *et al.*, 2020; Ravikumar *et al.*, 2011) tanaman ini kaya akan fitokimia dan juga memiliki sifat antimikroba, antikanker, antidiabetes, antidiare, antiemetik, dan hemostatik (Bandaranayake, 1998; Seepana *et al.*, 2016; Mahmud *et al.*, 2014; Satyavani *et al.*, 2012).

*Rhizophora apiculata* punya potensi yang bagus untuk dikaji mengenai senyawa metabolik sekunder yang dikandungnya (Mori *et al.*, 2021; Eriani & Usman, 2017). Seiring dengan penelitian kualitatif dan kuantitatif analisis fitokimia, ekstrak daun *Rhizophora apiculata* menunjukkan adanya 24 senyawa berbeda termasuk silane (SiH<sub>4</sub>), 2-sikloheksena, asam heksadekanoat, asam



linolenat, phytol dan asam stearat. Piridin sebagai konstituen utama dengan persentase tertinggi 12,47% (Eriani & Usman, 2017). Hampir seluruh bagian tumbuhan *Rhizophora* sp. mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tanin (Hadi, 2016) dan juga steroid, alkaloid, dan terpenoid yang memiliki manfaat biologis seperti antidiabetes, antibakteri, antikanker, dan antioksidan. Sifat bioaktivitas yang dimiliki mangrove mengesankan industri farmasi. Tanaman ini kuat, kaya tanin, dan memiliki kepadatan tinggi, terutama digunakan untuk konstruksi dan pembuatan arang (Kurniawan *et al.*, 2021).

Beberapa struktur senyawa telah diperoleh sebelumnya pada penelitian tentang *Rhizophora*, termasuk  $\beta$ -sitosterol dari kulit akar *Rhizophora apiculata* sebagai antimikroba (Kurniawan *et al.*, 2021), syringol diperoleh dari ekstrak asam pirolignat atau cairan kayu sebagai antioksidan (Loo *et al.*, 2008), (+)-catechin dari kelompok tannin diperoleh dari kulit kayunya sebagai antioksidan (Rahim *et al.*, 2008), dan ada juga struktur asam uronat yang diperoleh dari daun sebagai antivirus (Premanathan *et al.*, 1999) seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur metabolit sekunder *R. apiculata*  
(Sumber: Yogi *et al.*, 2022)

## B. Mikroorganisme Endofit

Mikroorganisme endofitik pertama kali dilaporkan di Darnel, Jerman, pada tahun 1904 (Tan & Zou, 2001). Mikroorganisme endofitik merupakan mikroorganisme (jamur, bakteri) yang hidup dan berkembang dalam jaringan tanaman sehat dengan membentuk koloni yang tidak membahayakan inangnya dan dapat ditemukan pada bagian akar, batang, daun dan bunga (Selim *et al.*, 2012). Hal ini menunjukkan kemungkinan terjadi hubungan simbiosis mutualisme antara mikroba endofit dan tanaman inangnya, namun ternyata ada pula endofit yang saprofit agresif atau patogen oportunistik. Organisme yang mudah ditumbuhkan, memiliki siklus hidup yang pendek dan dapat menghasilkan senyawa bioaktif dalam jumlah besar dengan metode fermentasi (Prihatiningtias & Wahyuningsih, 2011), salah satunya adalah jamur endofit.

Jamur endofit mempunyai peranan penting dalam mendukung ekosistem mangrove pada siklusnya. Hal ini terbukti bahwa jamur endofit merupakan sumber alami senyawa yang memiliki aktivitas biologis tinggi dan tingkat keragaman struktural (Vijaya, 2017). Jamur endofit juga menghasilkan kesamaan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman inangnya melalui mekanisme transfer genetik (Hasiani *et al.*, 2015). Fungsi endofit di dalam jaringan tumbuhan hidup secara intraseluler dan menginduksi inangnya dengan menghasilkan senyawa metabolit sekunder. Senyawa metabolit dari jamur endofit mempunyai aktivitas yang lebih banyak dibandingkan dengan tanaman inangnya (Veronica *et al.*, 2015). Karena jamur endofit dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang sama

dengan tanaman inangnya, namun dalam jumlah yang lebih banyak atau dengan struktur kimia yang berbeda sehingga memiliki aktivitas biologis yang lebih kuat

Jamur mendapatkan hasil produksi karbondioksida dari tumbuhan, tanaman inang juga memanfaatkan jamur endofit untuk sistem pertahanan, pertumbuhan, dan reproduksi (Putra, 2020). Selain itu, tumbuhan juga memperoleh manfaat tambahan dari jamur endofit. Jamur endofit menghasilkan senyawa yang berfungsi sebagai pengatur pertumbuhan, anti serangga, antivirus, antibiotik, dan penghasil enzim hidrolitik seperti amilase, selulase, xilanase, ligninase, dan kitinase (Kurnia *et al.*, 2014). Tujuh isolat jamur endofit, empat isolat akar, satu isolat kulit batang, dan dua isolat daun dari tanaman *Mikania micrantha* memiliki kemampuan untuk mengurangi konsentrasi timbal karena keberadaan timbal dapat menyebabkan stress oksidatif, yang menyebabkan radikal bebas meningkat melewati batas (Harwati, 2019).

Salah satu manfaat utama dari interaksi ini adalah kemampuan mikroorganisme endofit dalam meningkatkan penyerapan nutrisi oleh tanaman. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk memahami peran mikroorganisme endofit dalam tanaman. Misalnya, penelitian oleh Yang *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa mikroorganisme endofit mampu menghasilkan enzim yang meningkatkan efisiensi penyerapan nutrisi seperti fosfor (P) oleh tanaman. Penelitian oleh Hardoim *et al.*, (2015) menjelaskan bahwa mikroorganisme endofit dapat meningkatkan pertumbuhan tanaman dan ketahanan terhadap stress lingkungan. Penelitian lain oleh Khan *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa mikroorganisme

endofit dapat menghasilkan senyawa antimikroba yang bermanfaat dalam pertanian dan pengendalian penyakit tanaman.

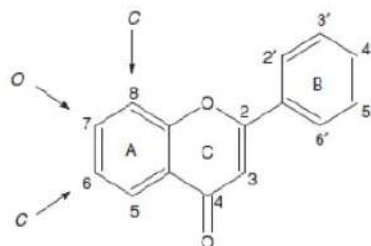
Selain itu, mikroorganisme endofit juga dapat meningkatkan resistensi tanaman terhadap serangan pathogen dan dapat menghasilkan senyawa antimikroba seperti antibiotik yang membantu melindungi tanaman dari infeksi patogen. Penelitian oleh Bertrand *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa mikroorganisme endofit bakteri mampu memproduksi senyawa antibiotik yang efektif dalam menghambat pertumbuhan patogen pada tanaman kentang. Interaksi mikroorganisme endofit dengan tanaman inang juga dapat merangsang pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Studi oleh Quiroga, *et al.*, (2019) mengungkapkan bahwa mikroorganisme endofit mampu menghasilkan hormon tumbuh seperti auksin yang mempercepat pertumbuhan tanaman dan meningkatkan produksi buah.

Senyawa antioksidan dapat melindungi tubuh dari radikal bebas yang berpotensi merusak sel dan menginduksi penuaan serta penyakit degeneratif. Pemanfaatan senyawa antioksidan dari jamur endofit mangrove dalam pengembangan suplemen nutrisi atau produk perawatan kulit dapat memberikan manfaat kesehatan yang signifikan. Dalam era resistensi antibiotik yang semakin meningkat, pencarian senyawa antibakteri baru menjadi sangat penting. (Soares *et al.*, 2019). Penemuan baru jenis mikroorganisme endofit, dengan pemahaman mendalam tentang potensi dan aplikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan dapat membuka jalan bagi pengembangan inovasi dalam bidang pertanian, farmasi, industri kosmetik, dan sektor lainnya.

### C. Metabolit Sekunder

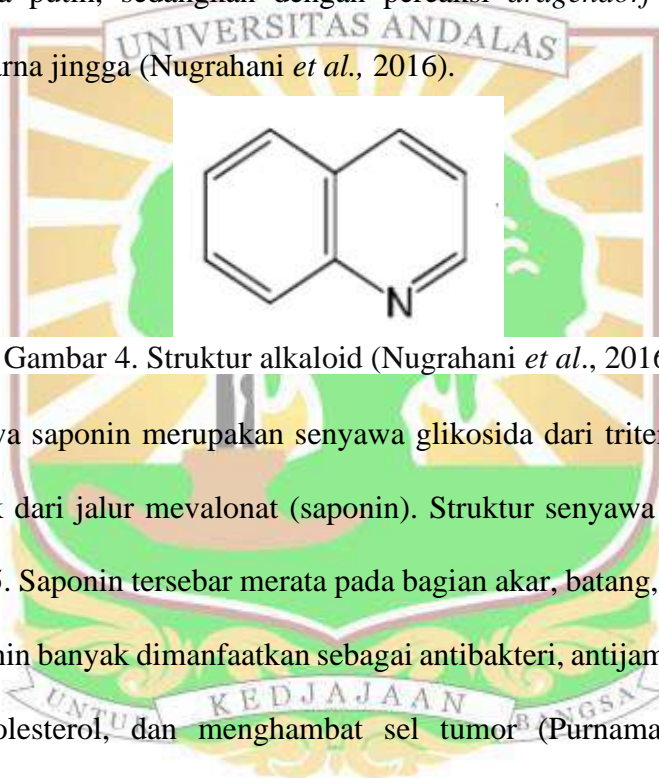
Metabolit sekunder diklasifikasikan dalam tiga kelompok yaitu terpenoid, fenolik, dan alkaloid (Bizzo *et al.*, 2012). Senyawa metabolit sekunder tidak berperan langsung untuk kehidupan tumbuhan namun berperan dalam interaksi sel dengan lingkungannya, seperti untuk perlindungan tanaman melawan tekanan biotik dan abiotik. Metabolit sekunder biasanya digunakan sebagai bahan obat-obatan, perasa, wewangian, insektisida dan lain-lain (Pagare *et al.*, 2015). Metabolit sekunder dibentuk oleh tanaman di luar jalur biosintesis karbohidrat dan protein. Jalur pembentukan metabolit sekunder ada tiga, yaitu jalur asam malonat contohnya palmitat, oleat, linoleat. Jalur asam mevalonat contohnya steroid, terpenoid, saponin. Dan jalur asam sikhimat contohnya, fenol, asam benzoic, lignin, tanin, quinon (Mariska, 2015).

Flavonoid turunan dari senyawa fenolik termasuk kelompok senyawa metabolit sekunder yang terbesar dan paling luas karena memiliki 6500 lebih kelas. Struktur senyawa flavonoid terlihat pada Gambar 3. Pembagian subkelas flavonoid berdasarkan pada sifat strukturalnya. Golongan utama dari kelas flavonoid yaitu flavon, isoflavon, flavanon, flavonol, kalkon, antosianin (Corradini *et al.*, 2011). Beberapa senyawa flavonoid memiliki aktifitas sebagai antibakteri, antioksidan, dan antiinflamatori (Arifin & Ibrahim, 2018).



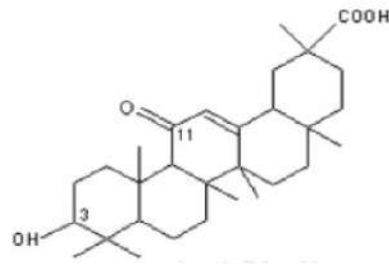
Gambar 3. Struktur flavonoid (Corradini *et al.*, 2011).

Senyawa alkaloid memiliki paling sedikit satu atom nitrogen. Struktur senyawa alkaloid terlihat pada Gambar 4. Turunan dari alkaloid antara lain adalah piridin, pirolidin, izoquinolon, fenetylamin, terpen, dan sebagainya (Cadar *et al.*, 2015). Senyawa alkaloid terutama indol dapat menghentikan reaksi radikal bebas. Selain itu turunan alkaloid yang juga memiliki aktivitas antioksidan adalah quinolone dan melatonin (Juniarti, 2011). Pada uji alkaloid dengan pereaksi meyer akan terbentuk endapan warna putih, sedangkan dengan pereaksi *dragendorf* akan terbentuk endapan berwarna jingga (Nugrahani *et al.*, 2016).



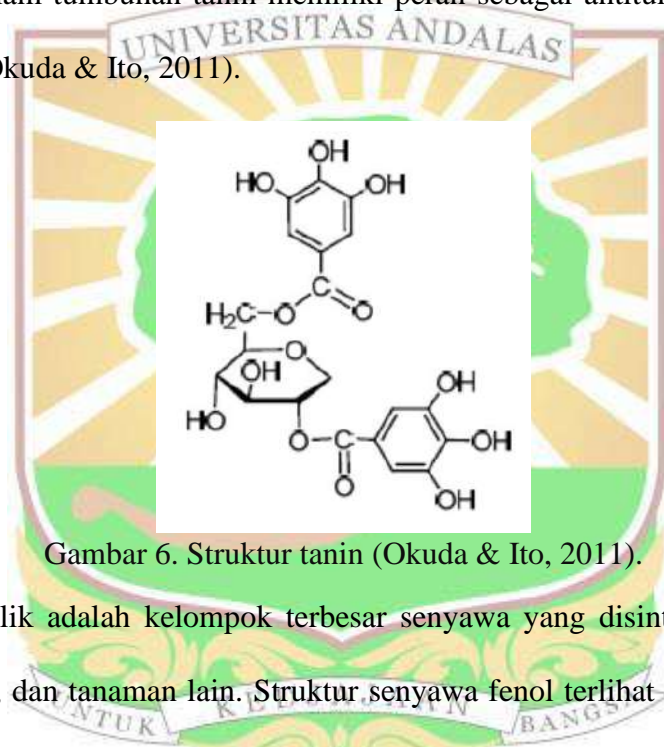
Gambar 4. Struktur alkaloid (Nugrahani *et al.*, 2016).

Senyawa saponin merupakan senyawa glikosida dari triterpen dan steroid yang terbentuk dari jalur mevalonat (saponin). Struktur senyawa saponin terlihat pada Gambar 5. Saponin tersebar merata pada bagian akar, batang, daun, dan buah. Senyawa saponin banyak dimanfaatkan sebagai antibakteri, antijamur, menurunkan konsentrasi kolesterol, dan menghambat sel tumor (Purnamaningsih, 2017). Senyawa saponin tersebar luas pada tanaman dan rata-rata memiliki gugus  $-OH$  (Bintoro *et al.*, 2017). Senyawa saponin akan menimbulkan busa jika dikocok dalam air, saponin larut dalam air dan alkohol tapi tidak larut dalam eter (Illing *et al.*, 2017).



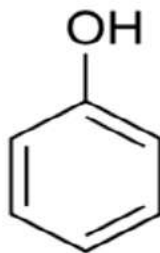
Gambar 5. Struktur saponin (Illing *et al.*, 2017).

Kompleks senyawa polifenol yang terbagi menjadi dua kelompok yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Struktur senyawa tanin terlihat pada gambar 6. Dalam tumbuhan tanin memiliki peran sebagai antitumor, antibakteri, antioksidan (Okuda & Ito, 2011).



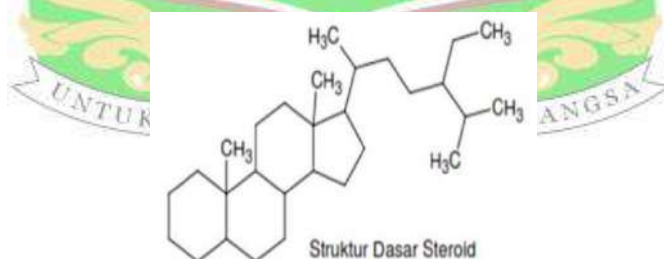
Gambar 6. Struktur tanin (Okuda & Ito, 2011).

Senyawa fenolik adalah kelompok terbesar senyawa yang disintesis oleh buah-buahan, sayur, dan tanaman lain. Struktur senyawa fenol terlihat pada Gambar 7. Senyawa fenolik dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu fenolik dengan cincin aromatik, kuionon, dan polimer (Kabera *et al.*, 2014). Senyawa fenol memiliki satu gugus hidroksil pada penyusunnya. Senyawa fenol memiliki aktivitas antioksidan, semakin tinggi kandungan fenol suatu tanaman maka semakin kuat aktivitas antioksidannya (Badriyah, 2017).



Gambar 7. Struktur fenol (Kabera *et al.*, 2014).

Terpenoid biasanya dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional, selain itu terpenoid memiliki fungsi sebagai pertahanan terhadap tekanan biotik dan abiotik, sebagai antibakteri, antineoplastik, dan fungsi farmasi lainnya. Sifat umum dari terpenoid adalah larut dalam pelarut organik, merupakan senyawa tak jenuh, siklik, mengalami polimerisasi dan dehidrogenasi, mudah teroksidasi (Yadav *et al.*, 2014). Steroid dibentuk oleh bahan alam yang disebut sterol dan berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangan dan serangan mikroba (Ningsih & Zuhair, 2016). Struktur steroid memiliki cincin siklopentana sebagai kerangka dasarnya. Pada umumnya steroid berfungsi sebagai hormon (Illing *et al.*, 2017). Struktur senyawa steroid terlihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Struktur steroid (Illing *et al.*, 2017).

#### D. Antioksidan

Sembilan belas tanaman obat dari sebelas famili di India memiliki jamur endofit yang menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki sifat antioksidan. Fenol dan flavonoid adalah dua senyawa metabolit sekunder yang bertanggung jawab atas



aktivitas antioksidan jamur endofit (Palanisamy *et al.*, 2018). Di Cina, juga ditemukan 46 isolat jamur endofit dari tanaman mangrove jenis *Rhizophora stylosa* dan *R. mucronata*, yang termasuk dalam delapan filum Ascomycota. Dari 39 isolat yang diteliti, ordo Diaportales dan Xylariales memiliki aktivitas oksidan tertinggi (Zhou *et al.*, 2018).

kemampuan antioksidan adalah melindungi sel dari kerusakan yang disebabkan oleh radikal bebas. Beta karoten, likopen, vitamin C dan vitamin E, membuatnya tertarik pada bahan pangan yang mengandung antioksidan terus meningkat. Azizah (2017) menyatakan bahwa antioksidan adalah molekul yang dapat dengan aman berinteraksi dengan radikal bebas dan menghentikan reaksi berantai sebelum molekul penting rusak. Radikal bebas juga dapat diikat oleh sistem enzim dan zat di dalam sel. Selain itu, sel dapat memperoleh antioksidan melalui sirkulasi setelah mengonsumsi makanan dan minuman yang kaya antioksidan.

Antioksidan yang berfungsi dalam sistem biologis tubuh manusia disebut antioksidan biologi. Ada tiga jenis antioksidan biologis yaitu antioksidan enzimatis, antioksidan nonenzimatis, dan antioksidan dari makanan. Koenzim Q10 dapat berfungsi sebagai antioksidan non-enzimatis dengan membersihkan radikal RO<sub>2</sub> dan menghambat peroksidasi lipida secara *in vitro*. Namun, dampak relatif dari koenzim Q10 pada fungsi otot rangka masih belum diketahui. Sementara antioksidan makanan, seperti vitamin C atau asam askorbat, bersifat larut dalam air, sehingga sangat penting bagi tubuh, terutama dalam lingkaran muka cair. Tubuh manusia memiliki sistem antioksidan untuk melindungi radikal bebas yang muncul

secara teratur. Tetapi tubuh membutuhkan antioksidan dari luar saat terpapar radikal berlebihan.

Sumber antioksidan dapat dibagi menjadi dua kelompok yaitu antioksidan alami dan antioksidan sintetis. Hardiningtyas, 2014 dan Syaifuddin (2015) memberikan penjelasan lebih lanjut tentang antioksidan alami dan sintetis sebagai berikut:

1. Antioksidan alami biasanya diisolasi dari sumber alami, terutama dari tumbuhan-tumbuhan. Contoh antioksidan alami termasuk senyawa polifenol flavonoid, tanin, katalase, dan glutathion peroksidase yang mengubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$ , dan superoksid dismutase yang mengkatalisis reaksi dismutase dari radikal anion superoksida menjadi  $H_2O_2$  (Hardiningtyas, 2014).
2. Antioksidan yang dibuat melalui sintesis kimia. Contohnya termasuk tert-butyl hidroquinone (tBHQ), butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), dan propil galat (PG). Selama bertahun-tahun, antioksidan tBHQ dan BHA dengan konsentrasi rendah digunakan untuk mencegah produk makanan mengalami oksidasi yang dapat menstabilkan nutrisi, rasa, dan warnanya. Syaifuddin (2015) menjelaskan bahwa antioksidan sintesis bersifat karsinogenik dalam jangka waktu tertentu dapat menyebabkan racun dalam tubuh, sehingga antioksidan alami menjadi alternatif karena dianggap lebih aman.

Menurut Sathiya *et al.*, 2015 Superoksida dismutase, katalase, glutathion peroksidase, dan glutathion reductase adalah beberapa enzim yang dapat berfungsi sebagai antioksidan. Antioksidan sekunder menangkap radikal bebas dan mencegah pembentukan radikal bebas melalui berbagai mekanisme antioksidan enzimatik,

Secara umum, mekanisme penangkapan radikal bebas diklasifikasikan menjadi enzimatis dan non-enzimatis.

Mekanisme antioksidan enzimatis diantaranya, yaitu:

1. Superoksida dismutase (SOD) merupakan metaloenzim yang mengkatalisis reaksi reduksi radikal anion superoksida menjadi hydrogen peroksida dan oksigen
2. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi reduksi senyawa hydrogen peroksida menjadi oksigen dan air

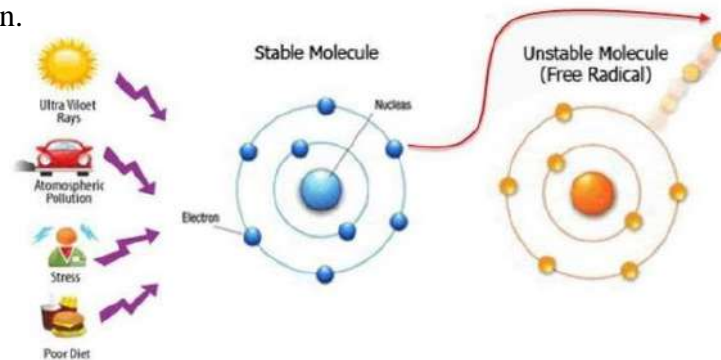
Secara non-enzimatis, dilaporkan oleh Birben *et al.*, (2012) senyawa antioksidan bekerja melalui empat cara, yaitu sebagai berikut:

1. Penangkap radikal bebas, misalnya vitamin C dan vitamin E,
2. Pengkelat logam transisi, misalnya EDTA,
3. Inhibitor enzim oksidatif, misalnya aspirin dan ibuprofen, dan
4. Kofaktor enzim antioksidan, misalnya selenium sebagai kofaktor glutathion peroksidase.

Antioksidan dapat diklasifikasikan berdasarkan sumbernya yaitu:

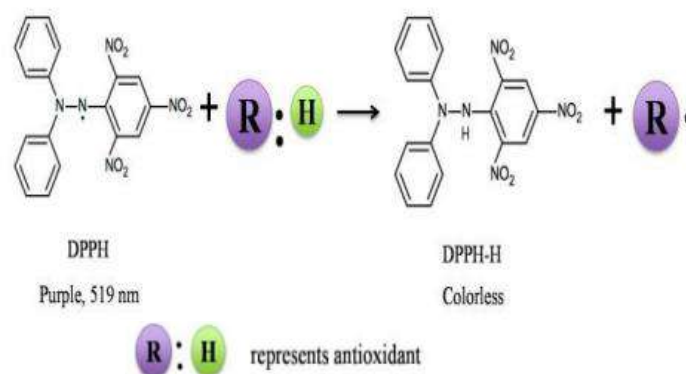
1. Antioksidan endogen merupakan senyawa antioksidan yang berasal dari dalam tubuh manusia yang berbentuk enzim maupun nonenzim. Antioksidan dalam bentuk enzim yaitu glutathion peroksidase, katalase, glutaredoksin, tioredoksin, peroksiredoksin dan superoksida dismutase. Antioksidan dalam bentuk non enzim yaitu glutathion, asam urat, asam  $\alpha$ -lipoat, dan bilirubin.
2. Antioksidan eksogen yaitu senyawa antioksidan yang berasal dari luar tubuh manusia, biasanya berasal dari hasil isolasi senyawa metabolit sekunder yang

16 terdapat pada tumbuhan dan juga dilakukan sintesis pada senyawa tersebut. Senyawa yang termasuk antioksidan diantaranya yaitu flavonoid, antosianin, butilhidroksianisol, butilhidroksitoluena, asam galat, vitamin C, vitamin E, dan  $\beta$ -karoten.



Gambar 9. Sumber Radikal eksogen (Tanti *et al.*, 2017)

Pengujian aktivitas antioksidan dapat dilakukan dengan beberapa metode diantaranya yaitu DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) dan MPM (The Modified Phenanthroline Method) (Arif *et al.*, 2014).

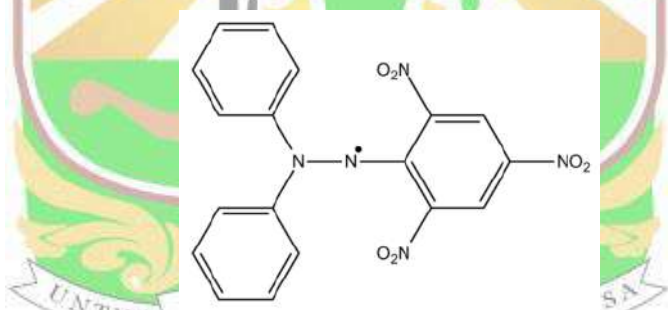


Gambar 10. Mekanisme reaksi senyawa antioksidan dengan pereaksi DPPH (Liang & Kitts, 2014)

Senyawa DPPH adalah radikal bebas yang stabil berwarna ungu dan apabila direduksi oleh radikal akan berubah menjadi warna kuning (diphenylpicrylhydrazil)

(Sadeli *et al.*, 2016). Sebagai radikal bebas yang stabil berwarna ungu, senyawa DPPH (diphenylpicrylhydrazil) akan menetralkan radikal bebas DPPH dan membentuk DPPH tereduksi setelah radikal bebas tersebut direduksi oleh radikal (Sadeli *et al.*, 2016). Bentuk DPPH tereduksi terjadi ketika DPPH berinteraksi dengan antioksidan baik melalui transfer elektron atau radikal hidrogen pada DPPH. Akibatnya, radikal bebas DPPH akan dibuang (Jos *et al.*, 2011).

Prinsip pengujian antioksidan adalah bahwa radikal bebas DPPH mengambil hidrogen dari antioksidan dan mengubahnya menjadi 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy. Reaksi ini kemudian diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm, di mana warna violet gelap terlihat. Penangkapan radikal bebas mengubah pasangan elektron, yang menyebabkan kehilangan warna sebanding dengan jumlah elektron yang diambil.



Gambar 11. Rumus struktur DPPH (Tanti *et al.*, 2017)

Dengan menggunakan pengukuran absorbansi larutan uji, aktivitas antioksidan dapat diukur dengan menghitung jumlah pengurangan intensitas warna ungu DPPH, yang sebanding dengan pengurangan konsentrasi larutan DPPH (Wahyuni, 2015).  $IC_{50}$ , atau konsentrasi minimum yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas, menunjukkan aktivitas antioksidan.  $IC_{50}$  adalah konsentrasi minimum yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal bebas.

Persamaan regresi antara nilai persen inhibisi dan konsentrasi larutan asam askorbat standar dapat digunakan untuk menentukan nilai  $IC_{50}$  sampel.

### **E. Identifikasi Molekuler**

Identifikasi molekuler jamur endofit adalah teknik identifikasi spesies jamur endofit yang dilakukan dengan menggunakan analisis urutan DNA. Beberapa hal yang perlu diketahui mengenai identifikasi molekuler jamur endofit diantaranya, pertama, Gen target yang digunakan dalam identifikasi molekuler jamur endofit adalah rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*). rDNA ITS adalah sekuens DNA yang terletak di antara gen ribosom yang digunakan untuk mengidentifikasi spesies jamur. Kedua, teknik PCR (Polymerase Chain Reaction) yang digunakan untuk mengamplifikasi rDNA ITS dari jamur endofit yang ditemukan pada tanaman inang. PCR dilakukan dengan menggunakan primer spesifik yang mengamplifikasi sebagian dari rDNA ITS. Ketiga, Analisis urutan DNA, Setelah amplifikasi rDNA ITS, analisis urutan DNA dilakukan untuk menentukan urutan DNA jamur endofit. Urutan DNA kemudian dibandingkan dengan database urutan rDNA ITS yang telah diketahui untuk mengidentifikasi spesies jamur.

Identifikasi secara molekuler dilakukan dengan metode PCR melalui penggunaan DNA *fingerprinting* dan DNA *barcoding*. Seorang peneliti Kary Mullis di perusahaan bioteknologi *Cetus Corporation* California menemukan PCR pada tahun 1983, yang membuat proses penggandaan fragmen DNA target (amplifikasi) lebih mudah dan lebih cepat. PCR merupakan proses melipat gandakan sekuens nukleotida tertentu dengan menggunakan proses enzimatik

secara *in vitro*. Penggandaan ini berhasil dilakukan menggunakan enzim, dan sepasang primer khusus untuk DNA target yang akan dilipatgandakan.

Nukleotida, yang terdiri dari basa nitrogen, gula pentosa (juga disebut nukleosida), dan ester fosfat, dikenal sebagai penyusun materi genetik. Sekuensing DNA genom dari hasil isolasi, hasil PCR, atau metode lain dapat digunakan untuk menentukan urutan nukleotida. Sekuensing DNA adalah modifikasi amplifikasi DNA pada PCR, metode ini yang paling akurat untuk mengidentifikasi spesies dengan menentukan urutan nukleotida adenin (A), sitosin (C), guanin (G) dan timin (T). Pada penggunaan dideoksinukleotida (ddNTPs) berlabel untuk elongasi DNA, produk PCR biasanya dimurnikan terlebih dahulu untuk menghilangkan kontaminan, baik primer maupun sisa pereaksi PCR. Dideoksi Sanger *method* adalah metode sekuensing yang paling umum digunakan. Hasil dari proses sekuensing adalah kromatogram yang terdiri dari nukleotida fragmen DNA. Perangkat lunak seperti *Sequence Scanner*, *ChromasPro*, dan *DNA STAR* dapat digunakan untuk melakukan analisis kromatogram sekuens untuk menemukan fragmen DNA yang diinginkan.

Identifikasi molekuler jamur endofit memiliki beberapa keuntungan, antara lain, dapat mengidentifikasi spesies jamur endofit dengan lebih akurat dan cepat dibandingkan dengan metode identifikasi lainnya, dapat mengidentifikasi spesies jamur endofit yang sulit atau tidak dapat diidentifikasi dengan metode identifikasi konvensional, dapat mengidentifikasi spesies jamur endofit yang belum pernah dideskripsikan sebelumnya.

Berikut adalah beberapa metode identifikasi molekuler jamur endofitik yang pernah dilakukan dalam beberapa penelitian:

1. Identifikasi molekuler fungi endofit daun kesambi (*Schleichera oleosa*) dan ketapang (*Terminalia catappa*) berdasarkan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*). (Masruroh, 2019)

Penelitian ini menggunakan teknik PCR untuk mengamplifikasi rDNA ITS dari fungi endofit yang ditemukan pada daun kesambi dan ketapang. Setelah itu, produk PCR dipurifikasi dan dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan DNA fungi endofit.

2. Identifikasi molekuler jamur *Trichoderma* sp. endofitik pada tanaman padi. (Ruchi, 2019)

Peneliti mengekstrak DNA dari sampel tanaman padi yang terinfeksi oleh jamur. DNA ekstrak kemudian digunakan untuk amplifikasi fragment DNA spesifik dengan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Setelah amplifikasi DNA selesai, peneliti melakukan sequencing DNA atau analisis PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) untuk mengidentifikasi spesies *Trichoderma* sp. endofitik yang tumbuh dalam tanaman padi.

3. Identifikasi isolat jamur endofit akar mangrove *Avicennia* sp. dari perairan Lampung. (Bagus, 2022).

Penelitian ini menggunakan teknik PCR untuk mengamplifikasi DNA isolat jamur endofit akar mangrove *Avicennia* sp. Setelah itu, produk PCR dipurifikasi dan dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan DNA jamur endofit.



4. Isolasi dan identifikasi kapang endofit dari pohon sengon provenan Kepulauan Solomon berdasarkan morfologi dan molekuler. (Nuryadi *et al.*, 2016)

Penelitian ini menggunakan teknik PCR untuk mengamplifikasi DNA kapang endofit yang ditemukan pada pohon sengon provenan Kepulauan Solomon. Setelah itu, produk PCR dipurifikasi dan dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan DNA kapang endofit.

5. Identifikasi jamur endofit daun jarum *Pinus radiata* menggunakan metode ekstraksi DNA secara langsung. (Istiana, 2014)

Penelitian ini menggunakan teknik PCR untuk mengamplifikasi DNA jamur endofit yang ditemukan pada daun jarum *Pinus radiata*. DNA diisolasi secara langsung dari jaringan daun tanpa melalui tahap kultur. Setelah itu, produk PCR dipurifikasi dan dilakukan sekuensing untuk menentukan urutan DNA jamur endofit.

#### F. GC-MS

Alat GC-MS (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) merupakan teknik analisis instrumental yang menggabungkan dua teknik, yaitu kromatografi gas (GC) dan spektrometri massa (MS). GC digunakan untuk memisahkan campuran senyawa menjadi komponen-komponennya, sedangkan MS digunakan untuk mengidentifikasi dan mengukur massa senyawa yang terpisah (Lee & Mittal, 2020).

Alat GC-MS terdiri dari beberapa komponen utama, seperti injektor, kolom pemisahan, detektor, dan sistem pengontrol. Injektor berfungsi untuk memasukkan sampel menjadi gas di dalam sistem. Kolom pemisahan memiliki fase stasioner yang dapat memisahkan komponen-komponen berdasarkan kecepatan elusinya.

Detektor mengukur jumlah dan jenis senyawa yang keluar dari kolom pemisahan, dan sistem pengontrol mengatur operasi dari semua komponen alat. (Chen *et al.*, 2020)

Mekanisme kerja alat GC-MS dimulai dengan injeksi sampel ke dalam sistem melalui injektor. Sampel kemudian dipanaskan di injektor dan diubah menjadi fase gas. Fase gas kemudian diinjeksikan ke dalam kolom pemisahan yang memiliki fase stasioner. Di dalam kolom pemisahan, komponen-komponen dalam sampel akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda berdasarkan afinitasnya terhadap fase stasioner. Komponen yang lebih mudah menguap akan bergerak lebih cepat dibandingkan yang kurang mudah menguap. Akibatnya, komponen-komponen akan terpisah selama mereka melewati kolom pemisahan. Setelah keluar dari kolom pemisahan, komponen-komponen kemudian masuk ke detektor. Detektor akan mengukur sinyal yang dikeluarkan oleh tiap komponen. Sinyal ini digunakan untuk mengidentifikasi komponen tersebut dan menentukan konsentrasi relatifnya. (Hailemariam *et al.*, 2020).

Berdasarkan bentuk fase diam yang digunakan, teknik kromatografi gas digolongkan dalam dua golongan utama, yaitu:

1. Kromatografi padat-gas (gas-solid chromatography): Bila sebagai fase diam digunakan adsorben padat
2. Kromatografi gas-cair (gas-liquid chromatography): Bila sebagai fase diam digunakan fase cair yang dilapiskan pada penyangga inert atau sebagai lapisan tipis pada dinding kolom kapiler. (Hohmann *et al.*, 2021)

Prinsip Kerja GC-MS adalah terdiri dari dua blok bangunan utama yaitu kromatografi gas dan spektrometri massa. Kromatografi gas menggunakan kolom kapiler yang tergantung pada dimensi kolom itu (panjang, diameter, ketebalan film) serta sifat fase (misalnya 5% fenil polisiloksan). Perbedaan sifat kimia antara molekul-molekul yang berbeda dalam suatu campuran dipisahkan dari molekul dengan melewati sampel sepanjang kolom. Molekul-molekul memerlukan jumlah waktu yang berbeda (disebut waktu retensi) untuk keluar dari kromatografi gas, dan ini memungkinkan spektrometri massa untuk menangkap, ionisasi, mempercepat, membelokkan, dan mendeteksi molekul terionisasi secara terpisah. Spektrometri massa melakukan hal ini dengan memecah masing-masing molekul menjadi terionisasi mendeteksi fragmen menggunakan massa untuk mengisi rasio. (Ramakrishna & Gupta, 2019).

#### 1. Kromatografi gas (GC)

Merupakan jenis kromatografi yang digunakan dalam kimia organik untuk pemisahan dan analisis. GC dapat digunakan untuk menguji kemurnian dari bahan tertentu, atau memisahkan berbagai komponen dari campuran. Dalam beberapa situasi, GC dapat membantu dalam mengidentifikasi sebuah senyawa kompleks. Dalam kromatografi gas, fase yang bergerak (atau "*mobile phase*") adalah sebuah operator gas, yang biasanya gas murni seperti helium atau yang tidak reaktif seperti gas nitrogen. *Stationary* atau fase diam merupakan tahap mikroskopis lapisan cair atau polimer yang mendukung gas murni, di dalam bagian dari sistem pipa-pipa kaca atau logam yang disebut kolom. Instrumen yang digunakan untuk melakukan

kromatografi gas disebut gas *chromatograph* (atau "*aerograph*", "gas pemisah"). (Vogelgesang *et al.*, 2021)

## 2. Spektrometri Massa (Mass Spectrometry)

Umumnya spektrum massa diperoleh dengan mengubah senyawa suatu sample menjadi ion-ion yang bergerak cepat yang dipisahkan berdasarkan perbandingan massa terhadap muatan. Spektrometri massa mampu menghasilkan berkas ion dari suatu zat uji, memilah ion tersebut menjadi spektrum yang sesuai dengan perbandingan massa terhadap muatan dan merekam kelimpahan relatif tiap jenis ion yang ada. Umumnya hanya ion positif yang dipelajari karena ion negatif yang dihasilkan dari sumber tumbukan umumnya sedikit. (Manoli *et al.*, 2021).

## 3. Kombinasi GC-MS

Saat GC dikombinasikan dengan MS, akan didapatkan sebuah metode analisis yang sangat bagus. Peneliti dapat menganalisis larutan organik, memasukkannya ke dalam instrumen, memisahkannya menjadi komponen tunggal dan langsung mengidentifikasi larutan tersebut. Selanjutnya, peneliti dapat menghitung analisa kuantitatif dari masing-masing komponen. (Gromov *et al.*, 2021)

## 4. Metode Analisis Kromatografi Gas- Spektrometri Massa (GC-MS)

Pada metode analisis GC-MS adalah dengan membaca spektra yang terdapat pada kedua metode yang digabung tersebut. Pada spektra GC jika terdapat bahwa dari sampel mengandung banyak senyawa, yaitu terlihat dari banyaknya puncak (*peak*) dalam spektra GC tersebut. Berdasarkan data waktu retensi yang sudah diketahui dari literatur, bisa diketahui senyawa apa saja yang ada dalam sampel. Selanjutnya adalah dengan memasukkan senyawa yang diduga tersebut ke dalam instrumen

spektrometer massa. Hal ini dapat dilakukan karena salah satu kegunaan dari kromatografi gas adalah untuk memisahkan senyawa-senyawa dari suatu sampel. Setelah itu, didapat hasil dari spektra spektrometri massa pada grafik yang berbeda. Informasi yang diperoleh dari kedua teknik ini yang digabung dalam instrumen GC/MS adalah tak lain hasil dari masing-masing spektra. Untuk spektra GC, informasi terpenting yang didapat adalah waktu retensi untuk tiap-tiap senyawa dalam sampel. Sedangkan untuk spektra MS, bisa diperoleh informasi mengenai massa molekul relatif dari senyawa sampel tersebut. (Xu *et al.*, 2020)

### G. LC MS-MS

*Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry* (LC MS-MS) adalah teknik analisis yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik dari kromatografi cair dengan deteksi yang sangat sensitif dan selektif dari spektrometri massa. LC MS-MS digunakan dalam berbagai aplikasi, termasuk analisis farmasi, analisis lingkungan, analisis makanan, dan analisis biologi. (Widmer & Kohler, 2021).

Prinsip Kerja LC MS-MS, diantaranya yaitu:

1. Pemisahan: Sampel diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi cair, di mana komponen-komponennya dipisahkan berdasarkan sifat fisikokimia mereka.
2. Ionisasi: Setelah elusi dari kolom LC, efen dialirkan ke spektrometer massa. Di sini, efen kolom LC diubah menjadi partikel bermuatan melalui proses nebulisasi, desolvatasi, dan ionisasi.
3. Pemisahan Massa: Partikel bermuatan kemudian dipecah menjadi ion-ion yang lebih kecil berdasarkan massa mereka menggunakan analisis spektrometri massa.

4. Deteksi: Ion-ion yang dihasilkan di detektor massa dihitung berdasarkan massa/charge ( $m/z$ ) mereka, dan sinyal deteksi dihasilkan. (Zhang *et al.*, 2021)

Mekanisme Kerja LC MS-MS:

1. Ionisasi: LC MS-MS dapat menggunakan berbagai teknik ionisasi, termasuk *Elektrospray Ionization* (ESI) dan *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI). Teknik ini menghasilkan partikel bermuatan dari efluen kolom LC.
2. Pemisahan Massa: LC MS-MS menggunakan analisis spektrometri massa tandem, di mana ion-ion yang dihasilkan dari ionisasi dipisahkan berdasarkan massa mereka. Teknik pemisahan massa yang umum digunakan termasuk Analisis Spektrometri Massa Tandem (MS-MS) dan Analisis Spektrometri Massa Tiga Dimensi (3D-MS)
3. Deteksi: Detektor massa dalam LC MS-MS dapat mengukur sinyal ion secara kuantitatif dan kualitatif, tergantung pada kebutuhan analisis. Detektor massa yang umum digunakan termasuk Spektrometri Massa Tandem (MS-MS) dan *Spektrometri Massa Quadrupole-Time of Flight* (Q-TOF). (Rochat, 2021)

Penggunaan alat LC MS-MS memiliki beberapa keuntungan, diantaranya memiliki sensitivitas tinggi, LC MS-MS dapat mendeteksi konsentrasi sampel dalam rentang femtogram hingga picogram. Selektivitas tinggi, kombinasi pemisahan kromatografi cair dengan deteksi massa memungkinkan identifikasi yang akurat dari komponen-komponen dalam sampel. Kemampuan analisis yang luas, LC MS-MS dapat digunakan untuk menganalisis berbagai jenis senyawa, termasuk senyawa polar dan non-polar, senyawa termolabil, dan senyawa dengan berbagai massa molekul. (Widmer & Kohler, 2021).

Contoh Aplikasi LC MS-MS, pada analisis farmasi LC MS-MS digunakan untuk analisis obat dalam sediaan farmasi, termasuk sirup dan bentuk lainnya. Analisis lingkungan LC MS-MS digunakan untuk mendeteksi kontaminan lingkungan, seperti pestisida dan bahan aditif makanan. Dan analisis biologi: LC MS-MS digunakan dalam penelitian biologi, termasuk analisis metabolit dan analisis protein. (Sheng & Song, 2020).

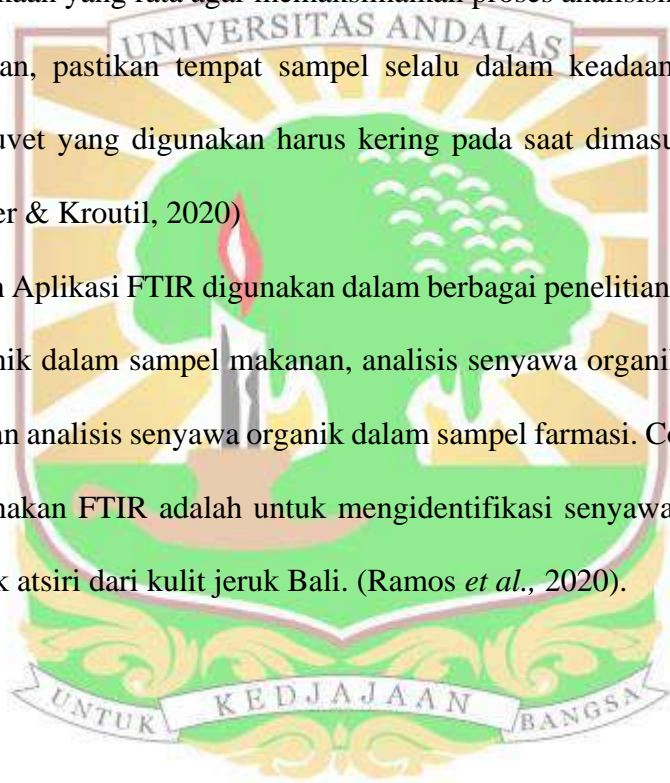
#### H. FTIR

*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) adalah teknik analisis kimia yang digunakan untuk mengidentifikasi senyawa berdasarkan pola serapan radiasi inframerah oleh ikatan-ikatan kimia dalam senyawa tersebut. Prinsip Kerja FTIR adalah mengukur serapan radiasi inframerah oleh senyawa dalam sampel. Radiasi inframerah melewati sampel, dan sebagian dari radiasi ini diserap oleh senyawa-senyawa dalam sampel. Pola serapan ini digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang ada dalam sampel. (King & Lecomte, 2021).

Mekanisme Kerja FTIR menggunakan interferometri Fourier transform untuk menghasilkan spektrum inframerah dari sampel. Spektrum ini kemudian dibandingkan dengan database spektrum inframerah yang ada untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa dalam sampel. Aplikasi penggunaan FTIR digunakan dalam berbagai bidang, seperti ilmu forensik, farmasi, kimia lingkungan, dan analisis makanan. Contoh aplikasi FTIR adalah untuk mengidentifikasi senyawa organik dalam sampel, seperti senyawa polimer, senyawa farmasi, dan senyawa lingkungan. (Andini *et al.*, 2021).

Keunggulan FTIR adalah kemampuannya dalam mengidentifikasi senyawa secara kualitatif dan kuantitatif dengan waktu analisis yang relatif singkat. FTIR juga dapat digunakan pada semua frekuensi, baik itu sumber cahaya secara simultan, sehingga mempengaruhi kecepatan analisis yang dilakukan menjadi lebih cepat daripada menggunakan pemindaian atau metode lainnya. Cara Penggunaan, FTIR harus disimpan di ruangan dengan suhu ruang dan diletakkan di atas meja dengan permukaan yang rata agar memaksimalkan proses analisisnya. Saat sampel ingin diletakkan, pastikan tempat sampel selalu dalam keadaan bersih setelah digunakan. Kuvet yang digunakan harus kering pada saat dimasukkan ke dalam alat. (Rohringer & Kroutil, 2020)

Contoh Aplikasi FTIR digunakan dalam berbagai penelitian, seperti analisis senyawa organik dalam sampel makanan, analisis senyawa organik dalam sampel lingkungan, dan analisis senyawa organik dalam sampel farmasi. Contoh penelitian yang menggunakan FTIR adalah untuk mengidentifikasi senyawa organik dalam sampel minyak atsiri dari kulit jeruk Bali. (Ramos *et al.*, 2020).





## BAB III. METODE PENELITIAN

### A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilakukan di Laboratorium Bioteknologi, Universitas Andalas, Padang yang dilaksanakan pada bulan Januari hingga Maret 2024.

### B. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Penelitian dilakukan dengan identifikasi molekuler jamur endofit menggunakan rDNA ITS (*Internal Transcribed Spacer*) kemudian analisis BLAST, pensejajaran dan filogenetik. Selanjutnya, dilakukan identifikasi senyawa metabolit jamur endofit ekstrak etil asetat menggunakan instrumen FTIR, GC MS dan LC MS-MS dengan masing-masing analisisnya menggunakan Origin2b ver.2023, NIST ver. 2. 5 dan MassLynx ver. 4. 1 dan disajikan secara deskriptif dalam bentuk table, gambar maupun grafik.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah tabung reaksi, cawan petri, gelas ukur, botol vial, jarum ose, lampu spiritus, kapas, kain kasa, tisu, labu ukur, oven, Erlenmeyer, *Eppendorf*, *waterbath*, *centrifuge*, *aluminium foil*, *autoclave*, *rotary evaporation*, *magnetic stirrer*, *hotplate*, *laminae air flow*, dan set GC-MS, set LC MS-MS dan FTIR dan set elektroforesis.

#### 2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah isolat penghasil antioksidan dengan nomor isolat EUA-111, bakteri uji, PDA (Merck Art. No. 1.10130.0500), aquades, kentang, dextrosa, dan etil asetat.

## D. Prosedur Kerja

### 1. Persiapan Penelitian

#### a. Sterilisasi

Alat dan medium yang digunakan terlebih dahulu disterilisasi menggunakan *autoclaf* dengan suhu 121°C, dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

#### b. Pembuatan Medium *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Ditimbang PDA (Merck Art. No. 1.10130.0500) dengan komposisi sebanyak 39 g ke dalam Erlenmeyer, kemudian dicukupkan 1000 mL aquades lalu dipanaskan menggunakan *hot plate* sampai mendidih dan disterilisasi menggunakan *autoclaf* pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### c. Pembuatan Medium *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Medium PDB dibuat dengan cara sejumlah kentang dikupas dan dipotong menjadi dadu, kentang yang sudah dipotong kemudian dicuci dan ditimbang 200 g lalu dididihkan dengan 500 mL aquades. Kentang yang sudah mendidih kemudian disaring lalu dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* 1000 mL dan ditambahkan 20 g Dextrosa dan volume dicukupkan menjadi 1L kemudian medium ditutup dan disterilkan di *autoclaf* (Suciatmih, 2010).

### 2. Pelaksanaan Penelitian

#### a. Peremajaan Jamur Endofitik

Disiapkan kultur stok jamur endofitik *R.apiculata* dari koleksi Laboratorium Bioteknologi, Universitas Andalas. Kemudian dilakukan peremajaan jamur pada cawan petri yang berisikan medium PDA, lalu diinkubasi 24 jam, setelah itu diremajakan lagi pada medium PDA miring.

## b. Identifikasi Konvensional Isolat Jamur Endofit

Identifikasi dari jamur endofit dilakukan dengan mengamati morfologinya baik secara makroskopik maupun mikroskopik. Pengamatan makroskopik dilakukan dengan mengamati warna koloni, warna sebalik, permukaan koloni (granular, seperti tepung, menggunung, licin, ada atau tidak tetes-tetes eksudat), diameter pertumbuhan koloni jamur, dan lingkaran konsentris. Pengamatan mikroskopik dilakukan dengan menggunakan mikroskop, dengan cara pada kaca objek diletakkan sedikit hifa lalu ditetaskan dengan pewarna *Lactophenol Cotton Blue* setelah itu dilakukan pengamatan identifikasi isolat jamur endofit (Suhartina *et al.*, 2018)

## c. Identifikasi Molekuler Isolat Jamur Endofit

### 1) Ekstraksi DNA Jamur Endofit

Ekstraksi DNA menggunakan miselia jamur yang ditumbuhkan pada media PDB selama 5-7 hari di *rotary shaker* 100 rpm pada suhu ruang. Isolat yang sudah tumbuh diambil dan dimasukkan ke dalam plastik steril kemudian dihaluskan menggunakan *pestle* steril. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Kit Phytopure™ (Amersham). Miselia yang telah ditumbuk halus dimasukkan ke dalam microtube steril, kemudian ditambahkan 600  $\mu\text{L}$  reagen 1 dan diaduk menggunakan spatula. Selanjutnya, reagen 2 ditambahkan sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dan diinversi hingga homogen kemudian diinkubasi selama 10 menit dalam *water bath* pada suhu 65°C. Sampel kemudian diinkubasi dalam *freezer* selama 20 menit.

Sampel kemudian ditambahkan kloroform yang sebelumnya telah disimpan pada suhu -20°C sebanyak 500  $\mu\text{L}$ . Sebanyak 100  $\mu\text{L}$  DNA *extraction resin*

*suspension* ditambahkan dan diinversi selama 10 menit, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1300 xg selama 10 menit. Sampel yang disentrifugasi akan membentuk 3 fasa. Fasa sampel yang berada di bagian atas *microtube* dipindahkan ke dalam *microtube* baru, kemudian ditambahkan isopropanol sebanyak volume sampel yang dipindahkan. Sampel tersebut kemudian disentrifugasi 4000 xg selama 5 menit hingga terbentuk *pellet* DNA. Pelet yang terbentuk dicuci dengan menambahkan 100  $\mu$ L etanol dingin 70%, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 4000 xg selama 10 menit. Supernatan dibuang dan *pellet* dikeringkan selama 1 jam hingga etanol hilang. *Pellet* DNA ditambahkan 50  $\mu$ L *nuclease free water* untuk resuspensi.

## 2) Amplifikasi DNA dengan Metode PCR

Amplifikasi DNA dilakukan dengan metode *Polymerase Chain reaction* (PCR) dalam volume campuran reaksi sebanyak 25  $\mu$ L. Campuran reaksi terdiri dari *gotaq green master mix* 12,5  $\mu$ L, *nuclease free water* 8,5  $\mu$ L, dan primer ITS4 (reverse) dan ITS 5 (forward) masing-masing 1  $\mu$ L, lalu ditambahkan 2  $\mu$ L DNA template. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam alat *Thermal Cycler* untuk amplifikasi DNA daerah ITS jamur endofit. Pengaturan suhu pada mesin PCR ditetapkan sebagai berikut: 90 detik pada 95°C untuk denaturasi awal, diikuti dengan 35 siklus yang terdiri dari 30 detik pada 95°C untuk denaturasi, 30 detik pada 55°C untuk proses *annealing*, 90 detik pada 72°C untuk *extension* dan 5 menit pada 72°C untuk *extension* akhir, serta suhu penyimpanan tahap akhir adalah 15°C (Hidayat *et al.*, 2016).

### 3) Elektroforesis dan Visualisasi DNA

Produk amplifikasi PCR perlu melalui tahap uji kualitatif untuk membuktikan keberadaan DNA secara kasat mata. Produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur 1% (w/v) gel agarosa sebanyak 3 $\mu$ L dan direndam dalam 1x buffer TAE pada *chamber*. DNA marker 100 bp sebanyak 2  $\mu$ L ditambahkan ke dalam sumur gel agarose sebagai alat ukur panjang produk PCR. Kemudian gel agarose berisi sampel dan DNA *marker* dilakukan elektroforesis pada tegangan 220 volt selama 25 menit. Sampel yang sudah melalui tahap elektroforesis dilakukan visualisasi DNA menggunakan sinar UV pada Gel Doc XR.

### 4) Sekuensing DNA

Produk hasil amplifikasi PCR yang diperoleh, dilakukan proses sekuensing susunan basa di laboratorium 1<sup>st</sup> Base Sequencing *Services* Malaysia untuk dianalisis sekuensing dua arah (*bidirectional sequencing*).

### 5) Analisis BLAST dan Pensejajaran Sekuen

Elektroferogram yang didapatkan dianalisis menggunakan program BioEdit ver. 7.7.1 (Hall, 1999). Sekuen DNA kemudian dilakukan analisis similarity dari setiap urutan basa terhadap data gen di GenBank pada *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI) dengan menggunakan *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST). Tingkat kesamaan 99-100% menunjukkan bahwa isolat jamur yang diperoleh adalah spesies yang sama. Data set sekuen jamur endofit yang berasal dari hasil sekuensing dan BLAST kemudian disejajarkan menggunakan Clustal X ver. 2.1 (Kumar *et al.*, 2016)

#### 6) Analisis Filogenetik

Analisis pohon filogenetik dilakukan dengan menggunakan software MEGA11 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*). Konstruksi pohon filogenetik berdasarkan jarak kekerabatan genetik dengan metode *Neighbor Joining* (NJ) yang diuji menggunakan *bootstrap* dengan 1000 kali ulangan (Tamura *et al.*, 2013).

#### d. Pembuatan dan Perbanyakkan Inokulum

Disiapkan 10 mL medium PDB dalam *Erlenmeyer* berukuran 100 mL, kemudian diinokulasi 2-3 ose miselium dari jamur ke dalam medium. Medium yang berisikan miselium jamur dishaker selama 24 jam dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 30°C. Setelah 24 jam inokulum tersebut dicampurkan ke dalam 90 mL medium PDB dalam *Erlenmeyer* berukuran 250 mL, kemudian difermentasi menggunakan shaker selama 24 jam dengan kecepatan 100 rpm pada suhu 30°C.

#### e. Fermentasi jamur endofit EUA-111

Fermentasi jamur endofit dilakukan secara *statis* dalam media PDB 1000 mL. Fermentasi dilakukan selama 14 hari (Heirina, 2020; Novika, 2021). Jamur endofit yang telah difermentasi dan tidak terjadi kontaminasi, kemudian dipanen untuk memisahkan antara jamur endofit dan media (Rachman *et al.*, 2018).

#### f. Ekstraksi Hasil Fermentasi

Jamur hasil fermentasi dipisahkan dari medium lalu dioven dengan suhu 40°C selama 3 jam. Setelah itu dimaserasi dengan etil asetat perbandingan 1:10 (Heirina, 2020) selama 2 hari (kondisi gelap). Setelah dimaserasi jamur disaring dan filtrat yang didapatkan dievaporasi menggunakan *rotary evaporation* sampai didapatkan ekstrak kental jamur (Sukmawaty *et al.*, 2020).

g. Uji Antioksidan

1) Pembuatan Larutan DPPH 0,05 mM

Serbuk DPPH (BM 394, 32) 0,0001 g dilarutkan dengan etil asetat 100 ml. Sehingga didapatkan larutan DPPH 0,05 mM. Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang bervariasi dari rentang 501-533 nm, panjang gelombang dipilih yang memiliki absorbansi tertinggi (Budiono *et al.*, 2019).

2) Pembuatan Larutan Uji

Larutan induk dibuat dengan cara melarutkan ekstrak menggunakan etil asetat dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian dibuat 5 variasi konsentrasi dari larutan induk yaitu 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm, dan 31,25 ppm.

3) Pengujian Antioksidan

Sebanyak 1,5 ml larutan uji masing-masing konsentrasi dimasukkan ke dalam testube, ditambahkan 3 ml larutan DPPH 0,05 mM divortex hingga homogen, diinkubasi dalam ruang gelap selama 30 menit. Selanjutnya serapan diukur pada panjang gelombang yang didapatkan. Untuk kontrol positif digunakan antioksidan standar yaitu asam askorbat dengan perlakuan yang sama pada sampel (Pratiwi *et al.*, 2014). Aktivitas antioksidan sampel ditentukan oleh besarnya hambatan serapan radikal DPPH melalui perhitungan inhibisi serapan DPPH (Muharni *et al.*, 2015) yang dapat dihitungkan dengan formulasi sebagai berikut:

$$\text{Persentase Inhibisi} = \frac{Ab. \text{ blanko} - Ab. \text{ sampel}}{Ab. \text{ blanko}} \times 100\%$$

#### 4) Penentuan IC<sub>50</sub>

IC<sub>50</sub> ditentukan dengan menggunakan konsentrasi sampel dan besar persen inhibisi yang diperoleh masing-masing pada sumbu x dan y dalam persamaan regresi linear dengan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang akan diperoleh sebagai IC<sub>50</sub> (Suryanita *et al.*, 2019). Data nilai absorbansi DPPH kontrol dan DPPH setelah direaksikan dengan larutan sampel dan dibandingkan dengan beberapa konsentrasi dipakai untuk menghitung persen inhibisi. Dari nilai persen inhibisi kemudian digunakan untuk larutan ujian yang bisa menghasilkan hambatan radikal bebas sebesar 50 dengan persamaan regresi linear:  $y = a + bx$ . Keterangan; y = 50; x = Konsentrasi larutan uji; a = Gradien; b = Konstanta (Hasanah *et al.*, 2017).

Dari masing-masing sampel menyatakan nilai y sebesar 50 dan nilai x yang didapatkan dari IC<sub>50</sub>. Nilai IC<sub>50</sub> menyatakan besarnya konsentrasi sampel (ekstrak dan kontrol yaitu asam askorbat) yang dibutuhkan untuk mereduksi sebesar 50% radikal bebas DPPH (Rahmayani *et al.*, 2013).

h. Identifikasi senyawa ekstrak jamur endofit dengan GC-MS, LC MS-MS dan FTIR

##### 1) Analisis FTIR

Dilakukan Laboratorium Kimia UNP menggunakan alat *Perkin Elmer Frontier FTIR ALD Cambridge Nanotech Savannah S100* dengan setting alat sebagai berikut, Persiapan kaca pengumpul: Kaca pengumpul yang digunakan harus bersih dan kering. Pengukuran: Letakkan sampel jamur endofit pada kaca pengumpul dan tempatkan pada alat FTIR. Mode pengukuran: Gunakan mode pengukuran transmisi atau *attenuated total reflectance (ATR)*. Rentang gelombang: rentang



gelombang yang digunakan untuk analisis senyawa organik adalah  $4000-400\text{ cm}^{-1}$ .

Resolusi: resolusi yang digunakan untuk analisis senyawa organik adalah  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Pengolahan data: Hasil pengukuran FTIR dapat diolah menggunakan perangkat lunak khusus untuk analisis spektrum FTIR.

## 2) Analisis GC-MS

Dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah, Padang menggunakan alat GC-MS

*Thermo Scientific Trace 1310 Gas Chromatograph* dengan setting alat sebagai

beikut, Kolom: Gunakan kolom polar seperti kolom DB-5 atau kolom DB-1 dengan

panjang 30 meter dan diameter dalam kisaran  $0,25-0,32\text{ mm}$ . Suhu kolom: Awal

suhu kolom sekitar  $50^{\circ}\text{C}$  selama 2 menit, kemudian dinaikkan sekitar  $10^{\circ}\text{C}/\text{menit}$  hingga mencapai suhu  $280^{\circ}\text{C}$  dan dipertahankan selama 10-15 menit. Suhu

injektor: Suhu injektor sekitar  $250-280^{\circ}\text{C}$ . Suhu detektor: Suhu detektor sekitar

$280-300^{\circ}\text{C}$ . Mode injeksi: Gunakan mode injeksi splitless dengan volume injeksi

sekitar  $1-2\ \mu\text{L}$ . Gas pembawa: Gunakan helium dengan laju aliran sekitar 1

mL/menit. Waktu retensi: Waktu retensi senyawa yang terdapat pada sampel jamur endofit dapat dilihat pada hasil analisis GC-MS.

## 3) Analisis LC MS-MS

Dilakukan di Laboratorium Forensik Polri, Bogor dengan *Chromatographic*

*Seperation* yaitu LC System: *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC),

*Column*: C18 ( $1.8\ \mu\text{m}\ 2.1\times 100\text{ mm}$ ) HSS, *Temperatur*:  $50^{\circ}\text{C}$  (*Column*),  $25^{\circ}\text{C}$

(*room*), *Mobile phase*: *Water* + 5 mM Amonium Formic (A) and Acetonitril + 0,05

% Formic acid (B), *Flow rate*:  $0,2\text{ ml}/\text{min}$  (*step gradien*) running 23 menit (*see*

*slide moving phase*), *Injection Volume*:  $5\ \mu\text{l}$  sample disaring dengan saring filter  $0.2$

$\mu\text{m}$  dan kondisi *Mass Spectrometry*nya yaitu System: ES (*electrospray ionization*), Mode: Positip Mode, *Mass analysis range*: 50 – 1200 m/z, *Source Temperatur*: 100°C, *Desolvation Temperatur* : 350°C, *Cone gas flow*: 0 L/hr, *Desolvation gas flow*: 793 L/hr, *Collision energi*: 4 Volt (energi rendah), *Rampt Colision energi*: 25 – 60 volt (energi tinggi).

Tabel 1. LC MSMS Analisis Detail

Instrument	Specification	Detail
LC System	ACQUITY UPLC®H-Class System (waters,USA)	UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)
LC Column	ACQUITY UPLC® HSS C18 (1.8 $\mu\text{m}$ 2.1x100 mm) (waters,USA)	UPLC Column HSS (high Streght Silica)
Mass Spectrometer	Xevo G2-S QTof (waters, USA)	Two Generation Stepwave Quadrupole time-of-flight mass spectrmtry

#### 7) Analisis data

Data yang diperoleh berupa kromatogram yang memiliki puncak-puncak yang dapat dianalisis dengan beberapa program, analisis FTIR menggunakan Origin2b ver.2023 dan web *Spectroscopic Tools*, analisis GC-MS menggunakan NIST ver. 2. 5 dan analisis LC-MSMS dapat dianalisis menggunakan MassLynx ver. 4. 1 dan interpretasi hasil diverifikasi melalui beberapa web seperti Chemspider, MassBank, MoNA, HMDB, *teks books*, artikel, disertasi maupun hasil penelitian lain yang bisa dipakai sebagai rujukan. Analisis secara deskriptif dan disajikan dalam bentuk table, gambar maupun grafik.

## BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

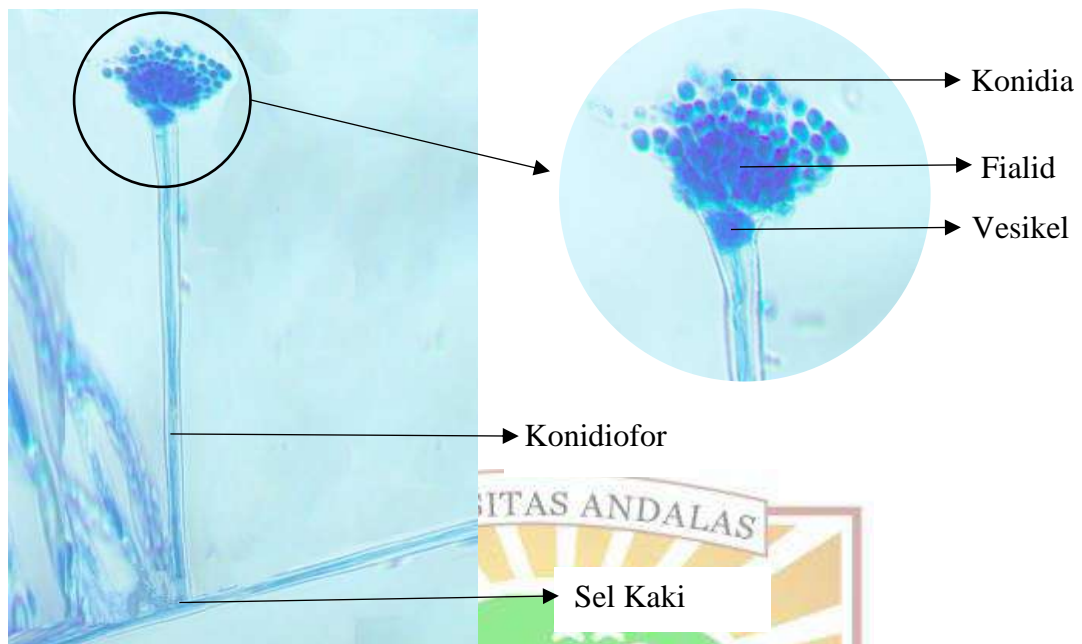
Penelitian yang telah dilakukan mengenai identifikasi molekuler dan potensi metabolit sekunder antioksidan isolat jamur endofit tanaman mangrove (*Rhizophora apiculata*) didapatkan hasil sebagai berikut:

### A. Isolat Jamur Endofit Mangrove EUA-111



Gambar 12. Isolat Jamur Endofit Mangrove EUA-111 (Diameter 9 cm)

Isolat jamur EUA-111 pada Gambar 12 menunjukkan warna koloni berwarna hijau sampai hijau kekuningan dengan bentuk koloni granular dan kompak. Koloni yang masih muda berwarna putih dan warnanya berubah menjadi hijau kekuningan setelah membentuk konidia. Selanjutnya dilihat morfologinya melalui mikroskop menggunakan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) (Tille, 2013). Pewarnaan LPCB adalah metode pewarnaan yang paling sering digunakan untuk mewarnai dan mengamati jamur, penggunaan LPCB untuk mewarnai jamur memungkinkan sampel mudah divisualisasikan mikroskopis (Vignesh *et al.*, 2013). Hasil pengamatan mikroskopis dapat dilihat pada Gambar 13.



Gambar 13. Pengamatan Mikroskopis EUA-111 (perbesaran 100x)

Pada Gambar 13 menunjukkan ciri khas struktur konidia, konidiafora panjang dengan vesikel di terminal, tempat fialid menghasilkan rantai-rantai basipetal konidia. Spesies ini diidentifikasi menurut perbedaan morfologi dalam struktur-struktur tersebut, termasuk ukuran, bentuk tekstrur dan warna konidia (Jawetz, Melnick, dan Adelberg's, 2013). *Aspergillus* merupakan salah satu kapang yang berasal dari class Ascomycota, dapat dikenali dengan adanya struktur konidia yang berbentuk oval, semi bulat, atau bulat. Konidia melekat pada fialid dan fialid melekat pada bagian ujung konidiofor yang mengalami pembengkakan atau disebut vesikel.

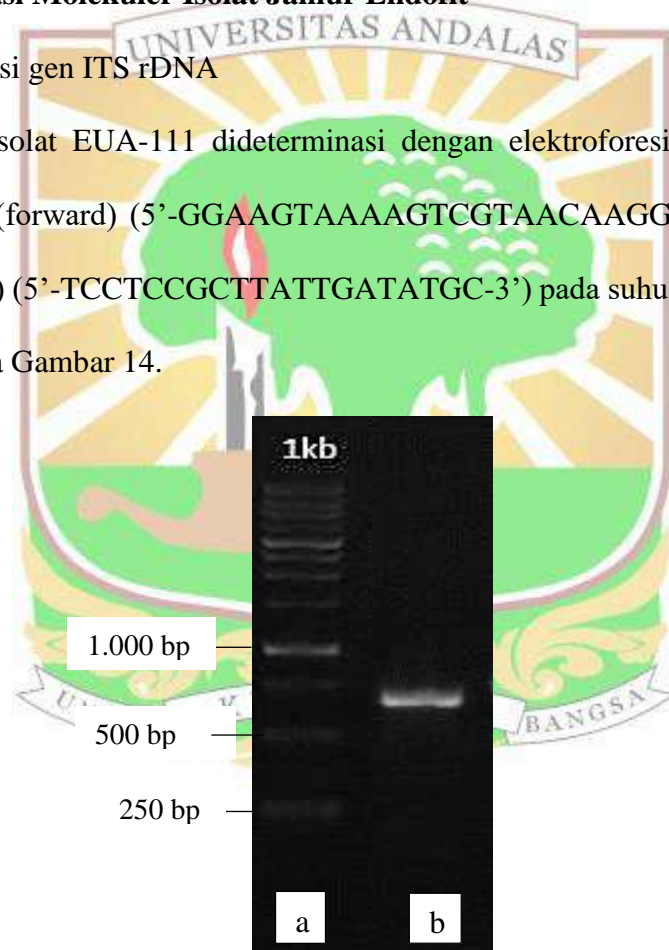
*Aspergillus* adalah spesies yang mudah menyebar luas, karena spora jamur yang mudah disebarkan oleh angin. *Aspergillus* merupakan jamur yang mampu hidup pada medium dengan derajat keasaman dan kandungan gula yang tinggi. *Aspergillus* ada yang bersifat parasit, ada pula yang bersifat saprofit. *Aspergillus* yang bersifat parasit menyebabkan penyakit Aspergillosis. *Aspergillus* sp. sering

ditemukan pada bahan pakan yang disimpan di dalam gudang dengan kelembaban tinggi. *Aspergillus* sp. dianggap patogen karena dapat menyebabkan suatu penyakit saluran pernafasan, radang granulomatosis pada selaput lendir, mata, telinga, kulit, meningen, bronchus dan paru-paru (Hayani *et al.*, 2017). *Aspergillus* merupakan jamur kontaminan umum pada berbagai substrat di daerah tropis maupun subtropis (Mizana, Suharti and Amir, 2016).

## B. Identifikasi Molekuler Isolat Jamur Endofit

### 1. Amplifikasi gen ITS rDNA

Amplifikasi isolat EUA-111 dideterminasi dengan elektroforesis menggunakan primer ITS5 (forward) (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') dan primer ITS4 (reverse) (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') pada suhu *annealing* 45°C disajikan pada Gambar 14.



Gambar 14. Amplifikasi gen ITS rDNA isolat EUA-111  
a. Marker ladder b. Fragmen PCR

Pada Gambar 14 terlihat pita DNA yang diperoleh berupa pita tunggal. Hal ini menandakan bahwa DNA hasil amplifikasi sudah cukup murni (Rahayu *et al.*, 2015). Pasangan primer ITS4 dan ITS5 dapat digunakan untuk mengamplifikasi DNA pada daerah ITS-1 dan ITS-2 rDNA dengan ukuran fragmen PCR berkisar 600 pb (White *et al.*, 1990).

Penelitian terhadap jamur endofit dari (Rakhmana *et al.*, 2015) melakukan Amplifikasi PCR isolat DNA LBKURCC67 dengan pasangan primer ITS5 dan ITS4 memberikan hasil yang baik dengan ditunjukkan adanya pita tunggal DNA dengan hasil amplifikasi PCR isolat fungi endofit LBKURCC67 adalah 583 pb. Penelitian lain oleh (Rahayu *et al.*, 2015) memperoleh DNA hasil amplifikasi PCR isolat LBKURCC69 adalah sebesar 537 pb.

## 2. Analisis sekuen gen ITS rDNA

Analisis sekuen gen ITS rDNA isolate EUA-111 potensi antioksidan diperoleh hasil *contig data forward* dan *reverse* sekuensing DNA sebagai berikut:

```
TGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGTA
GGGTTCTAGCGAGCCCAACCTCCCACCCGTGTTACTGTACCTTAGTTGCTTCGGCGGGCCCGC
CATTTCATGGCCCGGGGGCTCTCAGCCCCGGGCCCGCCCGCCGGAGACACCACGAACTCTG
TCTGATCTAGTGAAGTCTGAGTGTGATTGTATCGCAATCAGTTAAAACCTTTCAACAATGGATCTCT
TGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAGTGTGAATTGCAGAATCCGT
GAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCATCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGTCGTCGTCGCCCTCTCCGGGGGGGACGG
GCCCCAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCGTCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTACCCCGCTCT
GTAGGCCCGGCCGGCGCTTGCCGAACGCAAATCAATCTTTTCCAGGTTGACCTCGGATCAGGT
AGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAA
```

Panjang basa nukleotida yang digunakan yaitu 567 bp, selanjutnya dibandingkan dengan sekuens DNA yang terdapat pada GenBank untuk mengetahui tingkat

similaritas sekuen DNA melalui program BLAST (*Basic Alignment Search Tools*) pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) atau website (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) yang disajikan pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Hasil analisis BLAST isolat EUA-111 dengan isolat-isolat yang terdapat di GenBank

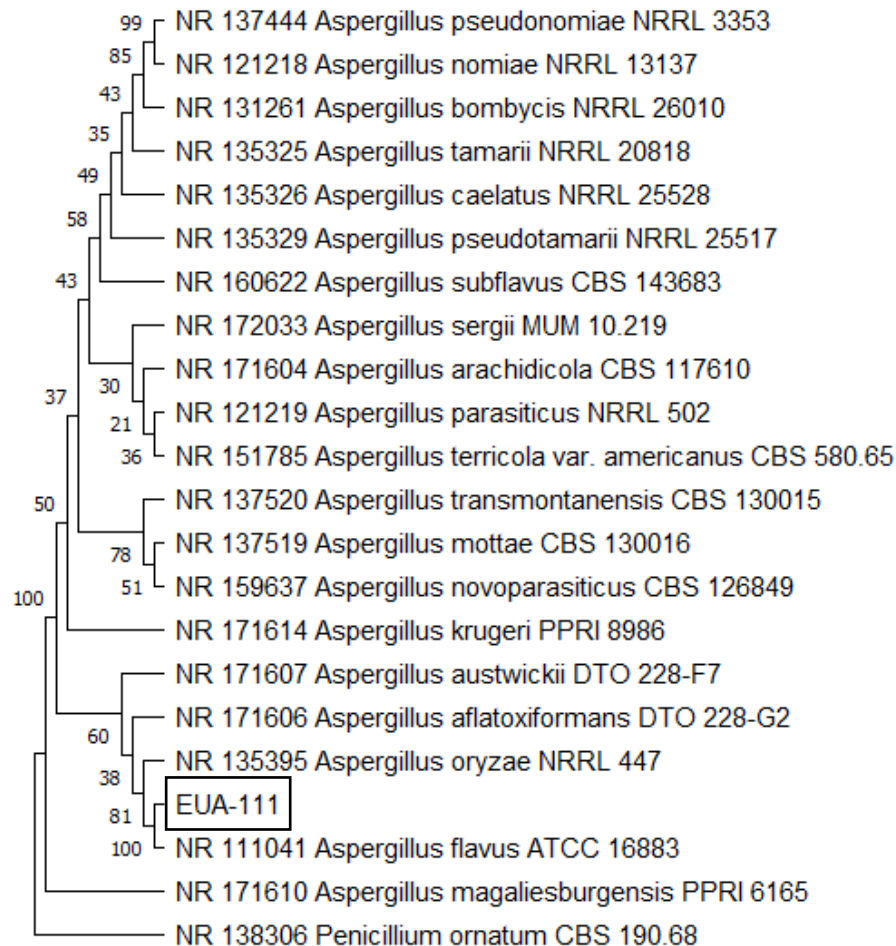
Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 16883	1085	1085	95%	0.0	99.50%	NR_111041.1
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447	1050	1050	92%	0.0	99.48%	NR_135395.1
<i>Aspergillus aflatoxiformans</i> DTO 228-G2	1140	1140	99%	0.0	99.84%	NR_171607.1
<i>Aspergillus austwickii</i> DTO 228- F7	1140	1140	99%	0.0	99.84%	NR_171607.1
<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 502	1016	1016	92%	0.0	98.45%	NR_121219.1
<i>Aspergillus terricola</i> var. <i>americanus</i> CBS 580.65	946	946	86%	0.0	98.34%	NR_151785.1
<i>Aspergillus krugeri</i> PPRI 8986	1099	1099	99%	0.0	98.71%	NR_171614.1
<i>Aspergillus transmontanensis</i> CBS 130015	998	998	90%	0.0	98.59%	NR_137520.1
<i>Aspergillus mottae</i> CBS 130016	1009	1009	90%	0.0	98.94%	NR_137519.1
<i>Aspergillus novoparasiticus</i> CBS 126849	948	948	86%	0.0	98.52%	NR_159637.1
<i>Aspergillus sergii</i> MUM 10.219	1007	1007	91%	0.0	98.60%	NR_172033.1
<i>Aspergillus arachidicola</i> CBS 117610	977	977	89%	0.0	98.39%	NR_171604.1
<i>Aspergillus pseudotamarii</i> NRRL 25517	998	998	92%	0.0	97.77%	NR_135329.1
<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 25528	992	992	92%	0.0	97.59%	NR_135326.1

<i>Aspergillus subflavus</i> CBS 143683	1090	1090	99%	0.0	98.39%	NR_160622.1
<i>Aspergillus tamarii</i> NRRL 20818	992	992	92%	0.0	97.59%	NR_135325.1
<i>Aspergillus bombycis</i> NRRL 26010	990	990	92%	0.0	97.59%	NR_131261.1
<i>Aspergillus pseudonomiae</i> NRRL 3353	959	959	92%	0.0	96.57%	NR_137444.1
<i>Aspergillus nomiae</i> NRRL 13137	953	953	92%	0.0	96.40%	NR_121218.1
<i>Aspergillus magaliesburgensis</i> PPRI 6165	942	942	99%	0.0	94.13%	NR_171610.1
<i>Penicillium ornatum</i> CBS 190.68	815	815	99%	0.0	90.72%	NR_138306.1

Hasil BLAST sekuens nukleotida isolat jamur endofit mangrove penghasil antioksidan dengan 21 isolat yang terdapat pada GenBank menunjukkan nilai kemiripan 90.72% - 99.84%. E-value yang didapatkan bernilai 0.0 yang menunjukkan semakin signifikan penjajaran dengan hasil BLAST. Menurut Sabbathini *et al.* (2017), nilai 0.0 mengartikan sekuens dari isolat tidak memiliki kemungkinan lain pada penjajaran sekuens yang dilakukan. Apabila semakin tinggi nilai E-value maka tingkat homologi antar sekuens semakin rendah, sedangkan semakin rendahnya nilai E-value maka tingkat homologi antar sekuens semakin tinggi. Seluruh sekuen isolat jamur yang telah didapatkan disejajarkan dan dipotong sehingga diperoleh urutan basa yang rapi. Panjang gen hasil pensejajaran dengan sekuen pembanding adalah 537 bp. Komposisi basa penyusun gen ITS rDNA isolat jamur endofit mangrove EUA-111 penghasil antioksidan dengan 21 jamur BLAST yaitu rata-rata persentase T(U)= 22.5%; C= 28.3%; A= 20.7% dan G= 28.5% (Lampiran 3).



Selanjutnya analisis filogenetik dengan menggunakan rekonstruksi pohon filogenetik *Neighbor Joining* (NJ) seperti pada Gambar 15 berikut.



Gambar 15. Pohon filogenetik isolat jamur endofit EUA-111 (Original Tree)

Analisis filogenetik pada Gambar 15 dilakukan berdasarkan metode *Neighbor Joining* (NJ) menggunakan software MEGA (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) versi 11. Isolat jamur endofit EUA-111 penghasil antioksidan memiliki kekerabatan yang sangat dekat dengan isolat *Aspergillus flavus* strain ATCC 16883 dengan nilai similaritas 99,50% (Tabel 2), sehingga isolat EUA-111 teridentifikasi sebagai jamur *Aspergillus flavus*. Hal ini juga didukung oleh data *p-distance* antara isolat EUA-111 dengan jamur *Aspergillus flavus* strain ATCC 16883 di GenBank

tersebut 0,000 (lampiran 4) yang menunjukkan nilai yang kecil yang artinya semakin kecil nilai *p-distance* semakin dekat hubungan evolusi antara dua spesies tersebut. Analisis *Neighbor-Joining* (NJ) menjadi dasar pembuatan pohon filogenetik berdasarkan perbedaan antara dua sekuen dimana pohon filogenetik dengan nilai *bootstrap* tinggi setidaknya diatas 70% merupakan pohon filogenetik yang baik (Muzzazinah, 2017).

*Aspergillus* dibagi menjadi beberapa bagian (*sections*) berdasarkan ciri-ciri morfologi dan filogenetik. Setiap *section* memiliki karakteristik morfologi dan genetik yang membedakannya dari *section* lainnya, membantu dalam identifikasi dan klasifikasi spesies *Aspergillus* secara lebih spesifik. Genus *Aspergillus* terbagi menjadi beberapa section, terdapat 20 section dalam genus *Aspergillus*, yang terdiri dari, section *Aspergillus*, *Flavi*, *Fumigati*, *Nidulantes*, *Circumdati*, *Usti*, *Versicolores*, *Candidi*, *Restricti*, *Clavati*, *Ochraceorosei*, *Cremeri*, *Terrei*, *Nigri*, *Flavipedes*, *Foveolati*, *Tubingensis*, *Cervini*, *Ornati* dan *Cinerecentes*, hingga saat ini, terdapat lebih dari 300 spesies yang telah diidentifikasi dalam genus *Aspergillus* (Frisvad *et al.*, 2019). Setiap *section* memiliki karakteristik morfologi dan filogenetik yang berbeda-beda. Sebagai contoh, section *Aspergillus* memiliki konidial *head* yang uniseriate atau *biseriate*, sedangkan section *Flavi* memiliki konidial *head* yang berwarna kuning-hijau hingga coklat (Samson *at al.*, 2014).

*Aspergillus flavus* tergolong pada section *Flavi*, *Aspergillus flavus* menghasilkan koloni yang berwarna kuning hijau atau coklat pucat, abu-abu hingga kehitaman. Koloni yang nampak berwarna hijau gelap dan nampak seperti pasir. Konidiofornya tidak berwarna, bagian atas agak bulat serta konidia kasar dengan

bermacam-macam warna, berukuran kurang lebih 1 mm dan tepat dibawah vesikel bulat biasanya kasar (Neto *et al.*, 2019). *Aspergillus flavus* dikenal sebagai cetakan beludru, warna koloni kuning sampai hijau atau coklat dengan kekuningan hingga coklat merah. Secara mikroskopis *Aspergillus flavus* memiliki kepala konida biasanya memancar, berdiameter 300-400  $\mu\text{m}$ , kemudian membelah untuk membentuk kolom yang longgar, berbentuk globosa dan subglobosa. Konidiofor bervariasi panjangnya dan tidak berwarna, *A. flavus* menutupi keseluruhan vesikel, dan pialides menunjukkan ke segala arah (Refai, El-yazid and Hassan, 2014). Biseriate, fisikel bulat (spherical) berukuran 26,99  $\mu\text{m}$ , panjang metula 10,75  $\mu\text{m}$  dan panjang fialid 11  $\mu\text{m}$ , bentuk konidia globose, permukaan halus dengan diameter 4,12  $\mu\text{m}$ , metula 5-8  $\mu\text{m}$  (Oramahi *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian yang memperoleh *Aspergillus flavus*, diantaranya Situmorang *et al.*, (2021) yang mengisolasi *Aspergillus flavus* dari mangrove *Avicennia marina*. Selain itu, Ramadan *et al.*, (2018) juga mengisolasi *Aspergillus flavus* dari daun mangrove *Avicennia marina* dan Kiti *et al.*, (2022) mengisolasi *Aspergillus flavus* dari ranting cabang mangrove *Sonneratia alba*. Pratiwi, (2021) juga berhasil mengisolasi *Aspergillus* dari mangrove *Rhizophora apiculata*. Selain dari mangrove *Aspergillus flavus* juga banyak terdapat pada berbagai tumbuhan lainnya seperti pada Rampa *et al.*, (2023) yang mengisolasi *Aspergillus* dari belimbing wuluh dan Akhsan *et al.*, (2021) mengisolasi *Aspergillus flavus* dari bawang merah.

### C. Uji Antioksidan

Sebelum identifikasi senyawa metabolit sekunder jamur endofit EUA-111, dilakukan uji antioksidan dengan menggunakan beberapa pelarut untuk mengetahui pelarut yang menghasilkan aktivitas antioksidan tertinggi berdasarkan nilai  $IC_{50}$ , seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Rata rata hasil uji antioksidan menggunakan beberapa pelarut

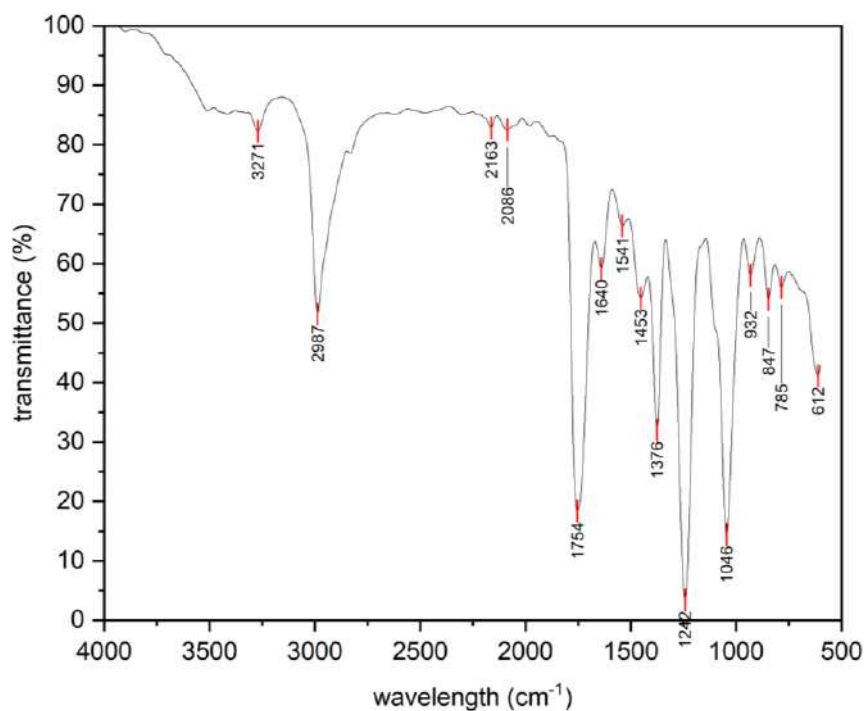
Pelarut	Uji antioksidan		Vitamin C
	$IC_{50}$ (mg/L)	Kategori Antioksidan	
Etil asetat	14,28	Sangat kuat	10,23
Metanol	16,59	Sangat kuat	
n-Heksane	-	-	

Berdasarkan Tabel 3 diperoleh hasil bahwa nilai uji aktivitas tertinggi dihasilkan oleh ekstrak yang menggunakan pelarut etil asetat dengan kategori sangat kuat. Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, memiliki toksisitas rendah (Savitri *et al.*, 2017). Pada penelitian Warni *et al.*, 2022 yang melakukan uji fitokimia menggunakan pelarut ekstrak etil asetat menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung fenolik, tannin, flavonoid, terpenoid, steroid dan alkaloid. Senyawa yang diperoleh tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder, dan hal ini menunjukkan bahwa etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi senyawa metabolit sekunder dan etil asetat juga bersifat semi polar, artinya dapat menarik campuran polar dan non polar, hal ini yang membuat etil asetat lebih berpeluang untuk digunakan dalam ekstraksi (Warni *et al.*, 2022). Sedangkan pelarut metanol merupakan pelarut polar yang umum digunakan dalam ekstraksi untuk mendapatkan senyawa polar dan n-Heksana merupakan pelarut yang baik untuk

mengekstrak senyawa non polar karena cenderung lebih stabil (Constanty & Tukiran, 2021).

#### D. FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

Pembagian pita serapan FTIR berdasarkan wilayah bilangan gelombang (*wavenumber*) dimana pita serapan teramati (Griffiths *et al.*, 2006).



Grafik 1. Spektrum IR metabolit sekunder jamur endofit EUA-111

Sebuah ikatan kimia dideteksi sebagai pita di posisi tertentu yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis kandungan senyawa kimia. Intensitas pita mewakili jumlah penyerapan yang terjadi setelah inframerah melewati sampel. FTIR-ATR telah banyak digunakan dalam analisis senyawa kimia. Beberapa studi menunjukkan bahwa FTIR-ATR mampu menganalisis senyawa metabolit sekunder (Alara *et al.* 2021; Malacarne *et al.* 2018). Senyawa metabolit sekunder seperti fenolik, flavonoid, tanin, alkaloid, dan terpenoid juga dapat diidentifikasi dengan mewakili pita yang muncul pada angka gelombang tertentu.

Berdasarkan spektrum FTIR pada Grafik 1 terdapat beberapa puncak pada Panjang gelombang. Hasil identifikasi gugus fungsi isolat disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil analisis FTIR jamur endofit EUA-111

No.	IR Spektrum	Bilangan Gelombang (cm <sup>-1</sup> )	Serapan	Kelompok
1.	3270,79	3500 – 3200	O – H	Fenolik
2.	2986,55	2850 – 3000	C – H	Terpenoid
3.	2163,03	2150 – 2260	C ≡ C	Flavanoid
4.	2085,42	1990 – 2140	N = C = S	Alkaloid
5.	1753,71	1690 – 1760	C = O	Poliketida
6.	1639,36	1610 – 1680	C = C	Flavanoid
7.	1539,94	1475 – 1600	C = C	Flavanoid
8.	1452,42	1430 – 1460	--CH3	Poliketida
9.	1375,53	1375 – 1450	--CH3	Poliketida
10.	1241,75	1050 – 1300	C – O	Fenolik
11.	1045,47	1050 – 1300	C – O	Fenolik
12.	931,59	650 – 995	C – H	Terpenoid
13.	846,56	650 – 995	C – H	Terpenoid
14.	784,22	650 – 995	C – H	Terpenoid
15.	612,04	515 – 680	C – S	-

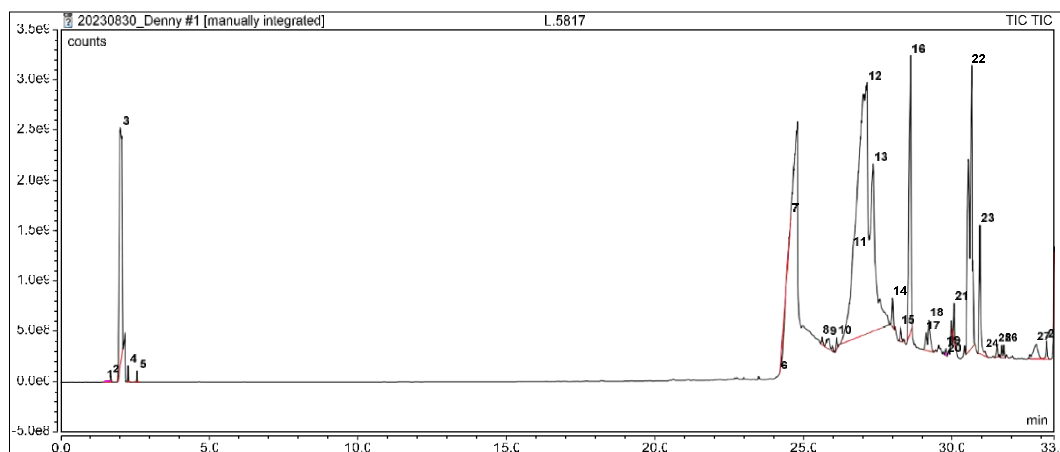
Berdasarkan Tabel 4 Spektrum FTIR menunjukkan serapan dari gugus fungsi ekstrak etil asetat jamur endofit EUA-111 gugus yang terbaca diantaranya adanya gugus hidroksil (O-H), kehadiran ikatan C-H yang deformasi yang berasal dari lipid dan selulosa. Lipid biasanya ditemukan pada tingkat yang sangat rendah, dan ini mungkin karena mengandung antioksidan yang memiliki efek menguntungkan menurunkan kadar kolesterol (Münstedt *et al.*, 2009), gugus karbonil C=O (aldehid, keton, asam karboksilat, ester), gugus hidroksi C-O (alkohol, ester, asam karboksilat, eter) ikatan C-O adalah representasi dari kelompok alkohol yang menunjukkan bahwa hasil analisis sampel menunjukkan kehadiran kelompok alkohol. kelompok alkohol paling mungkin berasal dari senyawa fenolik yang memiliki sifat antibakteri (Kavanagh *et. al.*, 2018) dan gugus alkena C=C.

Fakta ini didukung oleh beberapa referensi analisis senyawa metabolit sekunder bahwa ekstrak jamur endofit mangrove mengandung senyawa polifenol (Cadamuro *et al.*, 2021). Senyawa yang memiliki struktur cincin aromatik dengan gugus hidroksil (OH) yang melekat dan umumnya memiliki aktivitas antioksidan (Luringunusa *et al.*, 2021). Hampir semua senyawa metabolit sekunder memiliki gugus fungsi hidroksida di dalam strukturnya (Asmara, 2017). Kemampuannya membentuk ikatan hidrogen merupakan salah satu faktor yang membantu senyawa aktifnya mudah larut dalam pelarut air serta berinteraksi dengan protein target di dalam sistem organisme (Munde-Wagh *et al.*, 2012). Berdasarkan penelitian Jung *et al.* (2017), gugus C-H, O-H dan NH<sub>3</sub> ikatan yang menunjukkan karbohidrat, asam karboksilat, asam amino bebas, dan fenolik, C=O dan C=C yang mewakili molekul fenol; sementara pada gugus O-H, C-O, C-H, dan C = C yang melambangkan flavonoid dan fenolik dan pada kelompok COH, C-C dan C-O meyakini struktur karbohidrat, dan C-O melambatkan phenolics (Alara *et al.*, 2021) Selain itu, gugus C—C dan C—O termasuk senyawa terpenoids sebagai ikatan fungsional terpenoids. (Mashwani *et al.*, 2016).

Penelitian lainnya dari Purwanti, (2017) melakukan analisis FTIR terhadap jamur endofit SKF 15 dan memperoleh gugus fungsi O-H, C-H, C=O, C=C dan C-O, Berdasarkan hasil spektrum FTIR maka senyawa dari ekstrak jamur endofit SKF 15 termasuk kedalam senyawa flavonoid yang mengandung gugus aromatik, gugus hidroksi, dan karbonil. Selain itu, Choirunnisa, (2018) mendapat gugus fungsi C=O, C=C, -CH<sub>3</sub>, C-O dan C-H. berdasarkan hasil spektrumnya senyawa yang diperoleh dari jamur endofit SF1 mengandung gugus aromatic dan gugus karboksil ester.

### E. GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

Setelah dilakukan uji dengan instrumen FTIR untuk menganalisis gugus fungsi ekstrak etil asetat jamur endofit EUA-111 secara kualitatif, selanjutnya dilakukan uji GC-MS untuk menganalisis struktur, jumlah, dan kuantitas kimia



Grafik 2. Kromatogram GC-MS metabolit sekunder jamur endofit EUA-111

Berdasarkan Grafik 2 diperoleh 29 *peak* yang terdiri dari 17 senyawa karena ada beberapa senyawa yang sama terdeteksi pada waktu dan konsentrasi yang berbeda yang dapat disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil analisis FTIR jamur endofit EUA-111

No.	Peak Name	Rt. (Min)	MS Quant (m/z)	Area (%)	Golongan
1.	Gibberellic acid	1.524	63.052	0.03	Diterpenoid pentasiklik
2.	Acetic acid, methyl ester	1.724	74.057	0.09	Asam Karboksilat
3.	Ethyl Acetate	2.037	89.041	10.52	Asam Karboksilat
4.	Isopropyl acetate	2.306	61.051	0.09	Ester
5.	Formic acid, 1,1-dimethylethyl ester	2.598	59.073	0.08	Asam Karboksilat
6.	n-Hexadecanoic acid	24.185	55.089	0.78	Asam Lemak
7.	n-Hexadecanoic acid	24.563	73.017	0.01	Asam Lemak
8.	cis- $\beta$ -Farnesene	25.604	69.103	0.15	Sesquiterpenoids
9.	n-Hexadecanoic acid	25.831	55.078	0.48	Asam Lemak
10.	9-Hexadecen-1-ol, (Z)-	26.097	67.088	0.19	Alkohol/Hexadecanol
11.	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	26.638	55.085	6.88	Asam Lemak
12.	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	27.127	73.086	36.45	Sesquiterpene-alkaloid



13.	2-Methyl-6-(p-tolyl)hept-2-en-4-ol	27.328	119.084	13.32	Sesquiterpenoids
14.	Glycerol 1-palmitate	27.971	98.100	0.52	Ester
15.	Ricinoleic acid	28.243	55.083	0.31	Asam Lemak
16.	Glycerol 1-palmitate	28.590	116.040	9.06	Ester
17.	Ricinoleic acid	29.090	59.012	0.41	Asam Lemak
18.	Ricinoleic acid	29.192	59.012	0.97	Asam Lemak
19.	7-epi-cis-sesquisabinene hydrate	29.763	119.063	0.11	Sesquiterpenoids
20.	Digitoxin	29.797	55.051	0.00	Digitoksigenin
21.	aR-Turmerone	30.042	83.048	0.42	Sesquiterpenoids
22.	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	30.630	129.029	14.26	Asam Lemak
23.	Octadecanoic acid	30.913	129.024	2.45	Asam Lemak
24.	Digitoxin	31.076	55.071	0.16	Digitoksigenin
25.	Digitoxin	31.484	67.063	0.24	Digitoksigenin
26.	Ricinoleic acid	31.709	55.063	0.38	Asam Lemak
27.	Digitoxin	32.804	55.057	1.02	Digitoksigenin
28.	Digitoxin	33.144	57.057	0.39	Digitoksigenin
29.	Digitoxin	33.416	173.012	0.24	Digitoksigenin

Pada hasil GC MS ditemukan senyawa yang berasal dari beberapa kelompok yang sama, diantaranya kelompok diterpenoid pentasiklik yaitu gibberellic acid, asam karboksilat yaitu Acetic acid, methyl ester, dan ethyl acetate, asam lemak yaitu n-Hexadecanoic acid, 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester, Octadecanoic acid, dan Ricinoleic acid, sesquiterpenoid yaitu cis- $\beta$ -Farnesene, 1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-, 2-Methyl-6-(p-tolyl)hept-2-en-4-ol, 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate, dan aR-Turmerone, alkohol yaitu 9-Hexadecen-1-ol, (Z)-, digitoksigenin yaitu digitoxin dan ester yaitu Isopropyl acetate dan Glycerol 1-palmitate.

Semua senyawa yang diperoleh selanjutnya dilihat aktivitas biologinya terhadap antioksidan pada *software passonline*, seperti yang disajikan pada Tabel 6 berikut. *Potential Activity* (Pa) dan *Potential Inhibitor* (Pi) adalah konsep yang digunakan dalam analisis farmakologi dan bioaktivitas senyawa kimia. *Potential activity* (Pa) dan *potential inhibitor* (Pi) adalah konsep yang digunakan dalam analisis biologi komputerisasi (CADD) untuk prediksi aktivitas biologi dari

molekul Pa merupakan nilai prediksi kegunaan atau aktivitas biologi dari senyawa bioaktif, sementara Pi merupakan prediksi kegunaan senyawa yang tidak aktif (Basanagouda *et al.*, 2010). Dalam konteks ini, Pa dan Pi digunakan untuk menentukan kemungkinan aktivitas atau inhibisi dari senyawa terhadap suatu fungsi biologi tertentu, seperti antioksidan.

Tabel 6. Hasil representasi web *passonline* terhadap 17 senyawa hasil GC-MS

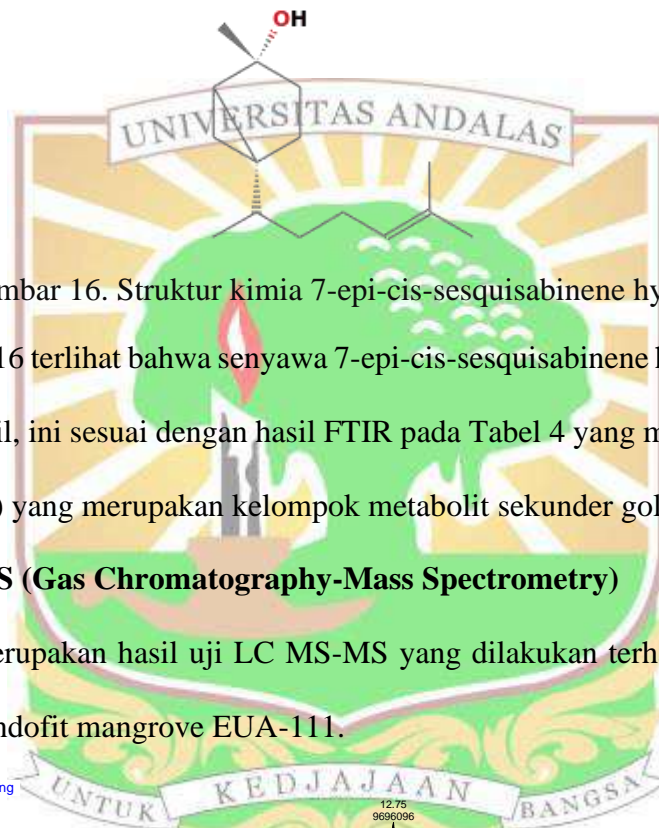
No.	Nama	Formula	Pa	Pi	Aktivitas Biologi
1.	Gibberellic acid	$C_{19}H_{22}O_6$	-	-	-
2.	Acetic acid, methyl ester	$C_2H_4O_2$	0.221	0.045	Antioxidant
3.	Ethyl Acetate	$C_4H_8O_2$	0.206	0.052	Free radical scavenger
4.	Isopropyl acetate	$C_5H_{10}O_2$	0.297	0.031	Antioxidant
5.	Formic acid, 1,1-dimethylethyl ester	$C_6H_{10}O_2$	0.245	0.038	Free radical scavenger
6.	n-Hexadecanoic acid	$C_{16}H_{32}O_2$	0.295	0.032	Free radical scavenger
7.	cis- $\beta$ -Farnesene	$C_{15}H_{24}$	0.142	0.137	Free radical scavenger
8.	9-Hexadecen-1-ol, (Z)-	$C_{16}H_{32}O$	0.222	0.045	Antioxidant
9.	1,6,10-Dodecatrien-3-ol, 3,7,11-trimethyl-	$C_{15}H_{26}O$	0.315	0.027	Free radical scavenger
10.	2-Methyl-6-(p-tolyl)hept-2-en-4-ol	$C_{15}H_{22}O$	-	-	-
11.	Glycerol 1-palmitate	$C_{19}H_{38}O_4$	0.285	0.026	Antioxidant
12.	7-epi-cis-sesquisabinene hydrate	$C_{15}H_{26}O$	0.296	0.031	Free radical scavenger
13.	aR-Turmerone	$C_{15}H_{16}O_3$	0.431	0.010	Antioxidant
14.	9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester	$C_{19}H_{36}O_2$	0.310	0.028	Free radical scavenger
			0.248	0.037	Antioxidant
			0.170	0.105	Free radical scavenger
			0.248	0.037	Antioxidant
			0.170	0.105	Free radical scavenger
			0.775	0.004	Antioxidant
			0.306	0.209	Free radical scavenger
			0.274	0.029	Antioxidant
			0.217	0.063	Free radical scavenger
			0.269	0.030	Antioxidant
			0.380	0.019	Free radical scavenger

15.	Octadecanoic acid	$C_{18}H_{36}O_2$	0.222	0.045	Antioxidant
			0.315	0.027	Free radical scavenger
16.	Ricinoleic acid	$C_{18}H_{34}O_3$	0.354	0.016	Antioxidant
			0.240	0.050	Free radical scavenger
17.	Digitoxin	$C_{41}H_{64}NO_{13}$	0.263	0.032	Antioxidant
			0.166	0.110	Free radical scavenger

Berdasarkan Tabel 6 dapat dilihat bahwa dari 17 senyawa yang diperoleh hanya gibberellic acid dan cis- $\beta$ -Farnesene yang tidak terdeteksi memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan, sedangkan yang lainnya memiliki aktivitas antioksidan dan *free radical scavenger* dengan nilai *potential activity* (Pa) dan *potential inhibitor* (Pi) yang bervariasi. *Prediction of Activity Spectra for Substances* (PASS) digunakan untuk menentukan potensi aktivitas antioksidan yang didasarkan dari hubungan antara struktur senyawa dan aktivitas biologisnya atau *Structure Activity Relationship* (SAR) (Druzhilovskiy *et al.*, 2018). Hasil tes PASS online memberikan informasi nilai Pa dan Pi. Nilai uji PASS Pa > 0.7 berarti senyawa tersebut sangat aktif secara biologis, jika nilai Pa  $0.5 < Pa < 0.7$  senyawa tersebut memiliki bioaktivitas yang cukup tinggi, dan jika nilai Pa < 0,5 senyawa tersebut memiliki aktivitas yang rendah (Yasmin *et al.*, 2022).

Pada Tabel 6 dapat dilihat bahwa senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dengan nilai Pa > 0.7 adalah 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate dengan nilai Pa yaitu 0.775. Senyawa 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate telah ditemukan dalam beberapa tumbuhan, seperti *Artemisia annua* (Altameme *et al.*, 2016), *Zingiber officinale* (Shareef *et al.*, 2016), dan *Cyperus rotundus* (Hotmian *et al.*, 2021). Senyawa ini merupakan golongan senyawa seskuiterpenoid pada jalur asam mevalonate yang memiliki aktivitas sebagai anti-*feedant*, anti kanker, antioksidan,

antimikroba, antibiotik dan toksin serta regulator pertumbuhan tanaman (Sogandi *et al.*, 2020; Barreiro *et al.*, 2022), antidiabetic, hepatoprotektif, dan antiinflamasi, selain itu juga memiliki kegunaan dalam bidang farmasi, kosmetik, (misalnya sampo dan parfum) dan produk non-kosmetik (misalnya deterjen dan pembersih) (Mehla *et al.*, 2021).

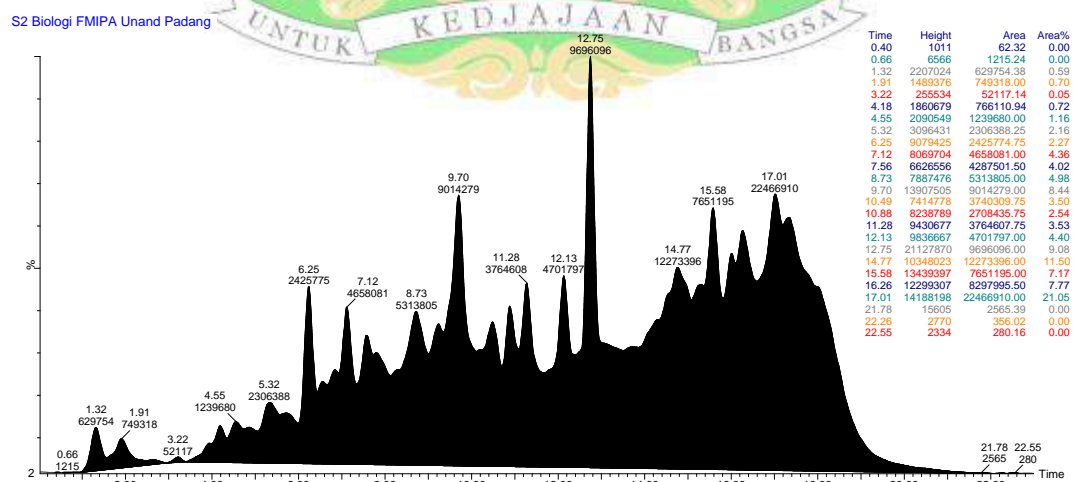


Gambar 16. Struktur kimia 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate

Pada Gambar 16 terlihat bahwa senyawa 7-epi-cis-sesquisabinene hydrate memiliki gugus hidroksil, ini sesuai dengan hasil FTIR pada Tabel 4 yang mendeteksi gugus hidroksil (OH) yang merupakan kelompok metabolit sekunder golongan fenolik.

#### F. LC-MSMS (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

Berikut ini merupakan hasil uji LC MS-MS yang dilakukan terhadap ekstrak etil asetat jamur endofit mangrove EUA-111.



Grafik 3. Kromatogram LC-MSMS metabolit sekunder jamur endofit EUA-111

Berdasarkan Grafik 3 terdapat 16 senyawa yang terdeteksi dari sampel ekstrak etil asetat jamur endofit mangrove EUA-111, seperti pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil interpretasi data dengan LC MSMS

No	Measured Mass	Calculated Mass	Formula	Nama Senyawa	Group
1.	187.0975	187.0977	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub>	2,2'-Bipyridine-4,4'-diamine	Bipyridine/Am inopyridine
2.	120.0815	120.0813	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> N	Indoline	Indole
3.	312.1814	312.1811	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub>	2-[4-(Ethoxycarbonyl) Piperidine-1-Carbonyl]Cyclohexane-1-Carboxylic Acid	Asam Karboksilat
4.	227.1289	227.1283	C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	Dibutyl squarate	Squarate
5.	183.1026	183.1021	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	Mephenesin	Alkohol
6.	368.2086	368.2073	C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub>	Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate	Benzoate
7.	339.0512	339.0505	C <sub>18</sub> H <sub>10</sub> O <sub>7</sub>	versicolorin A	Mycotoxin
8.	225.1609	225.1603	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tert-butyl 4-(cyanomethyl)piperidine-1-carboxylate	Piperidine karboksilat
9.	318.3019	318.3008	C <sub>18</sub> H <sub>39</sub> NO <sub>3</sub>	Phytosphingosine	Sphingosine
10.	337.1556	337.1552	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)isoindoline-1,3-dione	Isoindoline dione
11.	336.1967	336.1964	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>2</sub>	JWH-250	Cannabionoid
12.	352.1914	352.1913	C <sub>22</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	Tamibarotene	Retinoid
13.	698.5210	698.5208	C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> B r <sub>6</sub>	-	-
14.	1006.718 3	1006.7181	C <sub>54</sub> H <sub>91</sub> N <sub>11</sub> O 7	-	-
15.	512.5046	512.5043	C <sub>32</sub> H <sub>65</sub> NO <sub>3</sub>	C14-Dihydroceramide	Ceramide
16.	992.7388	992.7387	C <sub>60</sub> H <sub>111</sub> NS CIBr	-	-

Berdasarkan Tabel 7 dapat dilihat bahwa ada 3 senyawa yang tidak diketahui namanya. Senyawa yang didapat tergolong pada kelompok yang berbeda-beda seperti 2,2'-Bipyridine-4,4'-diamine termasuk kelompok bipyridine, Indoline termasuk kelompok indole, 2-[4-(Ethoxycarbonyl) Piperidine-1-Carbonyl] Cyclohexane-1-Carboxylic Acid termasuk kelompok asam karboksilat, Dibutyl squarate termasuk kelompok squarate, Mephenesin termasuk kelompok alkohol,

Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate termasuk kelompok benzoate, Versicolorin A termasuk kelompok mycotoxin, tert-butyl 4-(cyanomethyl) piperidine-1-carboxylate termasuk kelompok Piperidine karboksilat, Phytosphingosine termasuk kelompok Sphingosine, 2-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl) isoindoline-1,3-dione termasuk kelompok Isoindoline dione, JWH-250 termasuk kelompok Cannabionoid, Tamibarotene termasuk kelompok Retinoid, C14-Dihydroceramide termasuk kelompok Ceramide. Semua senyawa tersebut selanjutnya dilihat aktivitas biologinya terhadap antioksidan pada *software passonline*, seperti yang disajikan pada Tabel 8 berikut.

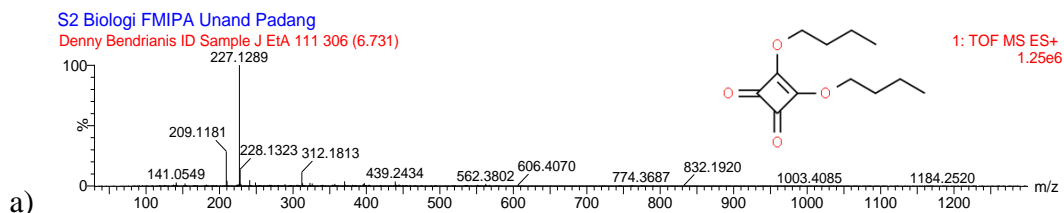
Tabel 8. Hasil representasi web *passonline* terhadap 16 senyawa hasil LC-MSMS

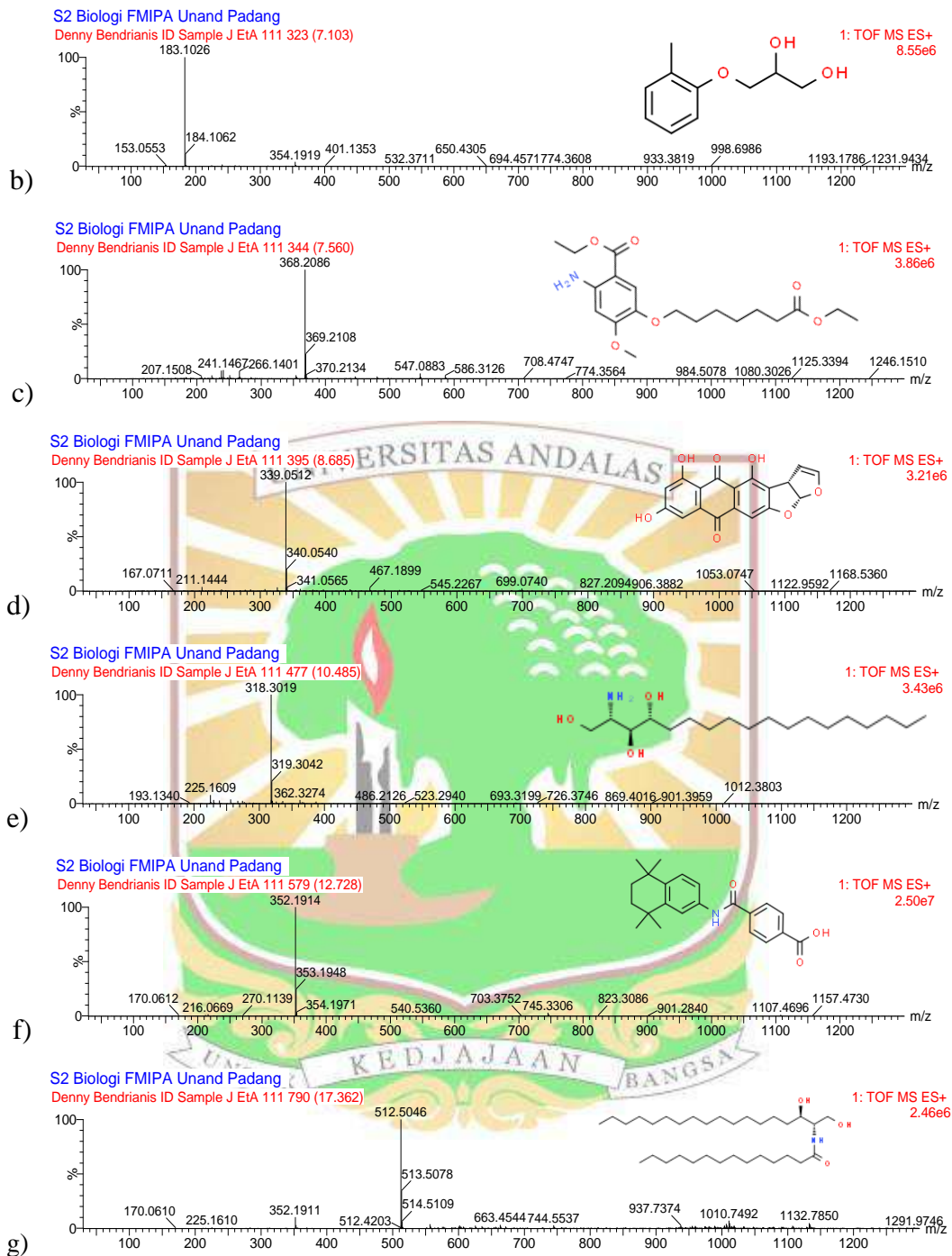
No	Nama senyawa	Rt (Min)	Area (%)	Pa	Pi	Aktivitas biologi
1.	2,2'-Bipyridine-4,4'-diamine	1.32	0.59	-	-	-
2.	Indoline	1.91	0.70	-	-	-
3.	2-[4-(Ethoxycarbonyl)Piperidine-1-Carbonyl]Cyclohexane-1-Carboxylic Acid	3.22	0.05	-	-	-
4.	Dibutyl squarate	4.55	1.16	0.274	0.029	Antioxidant Free radical scavenger
5.	Mephesisin	5.32	2.16	0.226	0.057	Antioxidant Free radical scavenger
6.	Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate	6.25	2.27	0.179	0.070	Antioxidant Free radical scavenger
7.	versicolorin A	7.12	4.36	0.316	0.020	Antioxidant Free radical scavenger
8.	tert-butyl 4-(cyanomethyl)piperidine-1-carboxylate	8.73	4.98	-	-	-
9.	Phytosphingosine	9.70	8.44	0.160	0.091	Antioxidant

				0.165	0.111	Free radical scavenger
10.	2-((4-benzylmorpholin-2-yl)methyl)isoindolin-1,3-dione	10.88	2.54	-	-	-
11.	JWH-250	11.28	3.53	-	-	-
12.	Tamibarotene	12.13	4.40	0.132	0.124	Antioxidant
				0.231	0.055	Free radical scavenger
13.	unknown	12.75	9.08			
14.	unknown	14.77	11.50			
		15.58		0.138	0.117	Antioxidant
15.	C14-Dihydroceramide		7.17	0.170	0.106	Free radical scavenger
16.	unknown	17.01	21.05			

Pada Tabel 8 berdasarkan data dari PASS *online* diperoleh 7 senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan, senyawa yang memiliki aktivitas atau nilai *potential activity* tertinggi yaitu versicolorin A sebesar 0.316. Nilai Pa dari versicolorin A lebih kecil dari 0.5 yang berarti senyawa tersebut memiliki potensi aktivitas antioksidan yang rendah. Versicolorin A merupakan senyawa heteropentasiklik organik yang membawa tiga gugus substituen hidroksil pada posisi 4, 6 dan 8. Serta berperan sebagai agen karsinogenik dan metabolit *Aspergillus*. Versicolorin A adalah produk alami yang ditemukan di *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, dan *Aspergillus parasiticus* (Gauthier *et al.*, 2020).

Berikut ini merupakan kromatogram dari senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan dan gambar struktur masing-masingnya.





Gambar 17. Struktur kimia 17(a) Dibutyl squarate 17(b) Mephenesin 17(c) Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate 17(d) versicolorin A 17(e) Phytosphingosine 17(f) Tamibarotene 17(g) C14-Dihydroceramide

Gugus fungsi pada dibutyl squarate melibatkan dua gugus butil ( $-C_4H_9$ ) yang terikat pada atom karbon, dua gugus oksigen ( $-O$ ) yang terikat pada atom karbon lainnya.



Jadi, secara ringkas, dibutyl squarate memiliki gugus fungsi ester ( $-\text{COOR}$ ) dan gugus butil ( $-\text{C}_4\text{H}_9$ ) (Yoshimasu & Furukawa, 2016). Pada senyawa Mephenesin terdapat gugus hidroksil ( $-\text{OH}$ ). Pada Ethyl 2-amino-5-[(7-ethoxy-7-oxoheptyl)oxy]-4-methoxybenzoate memiliki struktur yang cukup kompleks, diantaranya gugus Etil (Ethyl) ( $\text{C}_2\text{H}_5$ ), gugus Amino (2-amino) menandakan adanya gugus  $\text{NH}_2$  (amino), gugus Eter (7-ethoxy) menunjukkan adanya gugus etoksi ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ ), gugus Karbonil (7-oxoheptyl) menandakan adanya gugus karbonil ( $\text{C}=\text{O}$ ) yang terikat pada heptil ( $\text{C}_7\text{H}_{15}$ ), dan gugus Metoksi (4-methoxy) menunjukkan adanya gugus metoksi ( $\text{CH}_3\text{O}$ ). Pada versicolorin A senyawa ini memiliki struktur anthraquinoid dengan tiga gugus hidroksil dan sistem eter vinil yang terkandung dalam cincin beranggota lima 1 (Gauthier, *et al.*, 2020). Versicolorin A biasa ditemukan pada *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus aflatoxin* dan *Aspergillus flavus* juga merupakan intermediate metabolite dalam jalur biosintesis aflatoxin B1 (Zhang *et al.*, 2022). Pada gugus fungsi Phytosphingosine terdiri dari gugus hidroksil ( $-\text{OH}$ ) dan gugus amina ( $-\text{NH}_2$ ) dan memiliki sifat anti-inflamasi yang menarik terkait dengan sel T dalam model penyakit radang usus (Kondo *et al.*, 2014). Gugus Fungsi pada Tamibarotene yaitu gugus Karboksilat ( $-\text{COOH}$ ) terdiri dari atom karbon (karbon alfa), atom hidrogen (H), dan gugus karboksilat ( $-\text{COOH}$ ) dan gugus Amino ( $-\text{NH}_2$ ) terdiri dari atom nitrogen (N) dan dua atom hidrogen (H). Gugus ini memiliki rumus ( $-\text{NH}_2$ ) (Takeshita *et al.*, 2019). Pada C14-Dihydroceramide gugus fungsi terikat pada atom nitrogen (N), dua gugus hidroksil ( $-\text{OH}$ ) dan rantai karbon dengan 8 atom karbon (oktadekan) yang terikat pada gugus hidroksil (Lachkar *et al.*, 2021).

## BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

### A. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan:

1. Analisis berbasis molekuler dari isolat jamur endofit mangrove EUA-111 memiliki similaritas dengan *Aspergillus flavus* ATCC 16883 ITS *region*.
2. Analisis senyawa menggunakan FTIR diperoleh 15 *peak* dengan 8 serapan atau gugus fungsi yang berbeda; Analisis GC MS diperoleh 29 *peak* yang terdiri dari 17 senyawa berbeda dan 15 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan; Analisis LC MS-MS diperoleh 16 senyawa dan 7 diantaranya memiliki aktivitas biologi sebagai antioksidan.
3. Potensi antioksidan tertinggi yang diperoleh dari GC-MS yaitu senyawa 7-epi-cis-sesquibinene hydrate dengan nilai *potential activity* yaitu 0.775 dan LC-MSMS senyawa potensi antioksidan dengan nilai *potential activity* tertinggi yaitu versicolorin A sebesar 0.316.

### B. Saran

Penelitian selanjutnya dapat dilakukan uji *in vivo*, uji praklinis dan pengembangan prototipe dari senyawa yang potensial antioksidan.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A. (2009). Cowanopsis, a new genus of endophytic Ascomycetes from Rafflesia in Indonesia. *Fungal Diversity*, 38, 1-9.
- Ahary, I., & Kolondam, S. (2020). Identification of Bacterial Isolation using 16S rRNA Gene Sequencing in Microbiology Laboratory, Gorontalo Province. *Planta Tropika Journal of Agro Science*, 8(3), 231-239.
- Akhsan, N., Dewi, R. N., Sofian. (2021). Endophytic Fungi Potential In Plant Shallot (*Allium ascalonicum* L.) Controlling *Allternaria porii*: Case Study Of Bendang Raya Village. *Jurnal Agroekoteknologi Tropika Lembab*. Volume 4, Nomor 1, Halaman : 67-74 DOI.210.35941/JATL
- Alara, O. R., Nour, H. A., Chinonso, I. E. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*. Volume 4, 2021, Pages 200-214. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>
- Altameme, H., Imad, H., Salah, I. (2016). *Artemisia annua*: Biochemical products analysis of methanolic aerial parts extract and anti-microbial capacity. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences* 7(2):1843-1868
- Andini, A., Puspaningrum, N. L., & Nugraha, A. S. (2021). Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy: Principles and applications in food chemistry. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15(2), 575-594.
- Arif, R., Aslam, M., & Amir, R. M. (2014). Evaluation of antioxidant activity using DPPH assay-a review. *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 1(6), 332-351.
- Arifin, R., & Ibrahim, D. (2018). Flavonoid compounds: an overview of antibacterial, antifungal, anti-inflammatory, and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 5(1), 71-75.
- Asmara, A. P., (2017 Uji Fitokimia Senyawa Metabolit Sekunder Dalam Ekstrak Metanol Bunga Turi Merah (*Sesbania grandiflora* L. Pers). *Al-Kimia* 5(1):48-59. DOI:10.24252/al-kimia.v5i1.2856
- Azizah, N. (2017). Mekanisme antioksidan dalam perlindungan sel dari kerusakan oksidatif. *Jurnal Biomedik*, 9(2), 101-107.
- Badriyah, N. (2017). Uji aktivitas antioksidan dan senyawa fenol total etanol daun suruhan (*Peperomia pellucida* (L.) Kunth.) secar diskolorimetri. *Pharmacon*, 6(3), 437-444.
- Bagus. M, M, N. 2022. Identifikasi Isolat Jamur Endofit Akar Mangrove *Avicennia* Sp. Dari Perairan Lampung Yang Memiliki Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen *Aeromonas hydrophila* (Chester, 1901). *Undergraduate thesis*. Universitas Lampung
- Balasubramanian, S., Osuri, A. M., Abd Rasid, M. F., & Ehsanul Hoque, A. K. M. (2015). Altered precipitation regime affects the functional traits of three mangrove species in the coastal areas of northern Borneo. *Regional Environmental Change*, 15(6), 1101-1114.

- Bandaranayake, W. M. (1998). Traditional and medicinal uses of mangroves. *Mangroves and Salt Marshes*, 2(3), 133-148.
- Barreiro, S., Zerrin, S., Fatima, P., Carlos, B., (2022). Biochemistry of Antioxidants: Mechanisms and Pharmaceutical Applications. *Biomedicines Journal*, 10.3390/biomedicines10123051.
- Basanagouda M, Shivashankar K, Kulkarni M V, Rasal VP, Patel H, Mutha SS, Mohite AA .Synthesis and antimicrobial studies on novel sulfonamides containing 4-azidomethyl coumarin. *Eur J Med Chem* 2010; 45(3): 1151–7.
- Bertrand, H., Nalin, R., Bally, R., & Crouzet, J. (2019). Impact of nine antibiotics on soil bacterial diversity. *Environmental Pollution*, 255(Pt 1), 113-121.
- Bintoro, H. A., Hartanti, A. M. D., & Fielea, J. (2017). Potensi saponin pada tiga jenis daun (starfruit, moringa, aloe vera) terhadap persentase dimerkaprol terlarut dan waktu inkubasi. *Jurnal Penelitian Teknologi Industri Pertanian*, 25(3), 171-180.
- Birben, E., Umit M, S., Cansin, S., Serpil, E., Omer, K. 2012. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012 Jan;5(1):9-19. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613. Epub 2012 Jan 13.
- Bizzo, H. R., Gramosa, N. V., Arman, H. D., & Paulino, A. S. (2012). Diversity in coffee beverages: the role of chemical compounds. *Food Research International*, 46(1), 488-495.
- Bottger, E. C. (1989). Rapid determination of bacterial ribosomal RNA sequences by direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 50(1-2), 65-74.
- Budiono, Elfita, Muharni, Yohandini, H., and Widjajanti, H. 2019. Antioxidant Activity of *Syzygium samarangense* L. and their Endophytic Fungi. *Molekul*, 14(1), 48–55.
- Cadamuro, Rafael Dorighello, Isabela Maria Agustini da Silveira Bastos, Izabella Thais Silva, Ariadne Cristiane Cabral da Cruz, Diogo Robl, Louis Pergaud Sandjo, Sergio Alves Jr., Jose M. Lorenzo, David Rodríguez-Lázaro, Helen Treichel, Mário Steindel, dan Gislaine Fongaro. "Bioactive Compounds from Mangrove Endophytic Fungus and Their Uses for Microorganism Control. *BioMed Research International*, vol. 2021, 2021, hal. 1-16. doi: 10.1155/2021/6638826.
- Cadar, A. G., Cioanca, O., & Hancianu, M. (2015). Alkaloids from plant species of traditional Romanian pharmacopeia: distribution, bioactivity, and biotechnological approaches. *Arab Journal of Chemistry*, 8(6), 803-824.
- Carocho, M., Patricia M., Isabel C. (2018). Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in Food Science & Technology Journal*. (71) 107-120. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.008>
- Chen, H., Gu, D., Ye, W., Wu, M., & Li, L. (2020). Analysis of chemical constituents and identification of characteristic components of kudzu root by GC–MS and HPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 58(10), 924-933.
- Choirunnisa, Dini (2018). Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Penghambat Enzim Alfa-Glukosidase Dari Kapang Endofit *Colletotrichum* Sp. Yang

- Bersimbiosis Dengan Spons. *Skripsi*. Univeristas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Constanty, Irene Cornelia & Turkiran. (2021). Aktivitas Antioksidan Dari Fraksi n-Heksana Kulit Batang Tumbuhan Jambu Semarang (*Syzygium samarangense*). *Jurnal Kimia Riset*. Vol. 6. No. 1. <https://doi.org/10.20473/jkr.v6i1.24467>
- Corradini, D., Foglia, P., Giansanti, P., & Gubbiotti, R. (2011). Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. *Natural Products: Phytochemistry, Botany, and Metabolism of Alkaloids, Phenolics, and Terpenes*, 1, 1041-1099.
- Das, S., & Kondaiah, N. (2020). Isolation and characterization of a flavonoid fragment from invasive plant *Chromolaena odorata* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(1), 86-89.
- Druzhilovskiy, A. V. Rudik, D. A. Filimonov, T. A. Glorizova, A. A. Lagunin, A. V. Dmitriev, P. V. Pogodin, V. I. Dubovskaya, S. M. Ivanov, O. A. Tarasova, V. M. Bezhentsev, K. A. Murtazalieva, M. I. Semin, I. S. Maiorov, A. S. Gaur, G. N. Sastry & V. V. Poroikov. (2018). Computational platform Way2Drug: from the prediction of biological activity to drug repurposing. *Russian Chemical Bulletin*. 1832–1841(66).
- Eriani, G., & Usman, A. (2017). Phytochemical screening and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of *Rhizophora apiculata* leaf extracts. *Reaktor*, 17(3), 141-148.
- Ewing, B., L. Hillier., M. C. Wendl., dan P. Green. 1998. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. I. *Accuracy Assessment*. *Genome Res*. 8, 17.
- Frisvad, J. C., V. Hubka, C.N. Ezekiel, S.-B. Hong, A. Novakova, A.J. Chen, M. Arzanlou, T.O. Larsen, F. Sklenar, W. Mahakarnchanaku, R.A. Samson, and J. Houbraken. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section Flavi and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies In Mycology* 93: 1–63
- Gajula, G., Ahire, M., Alagar, M., Singh, V., Han, H., Jang, J. Y., & Kim, Y. H. (2020). Isolation, characterization, and anti-MRSA activity of ornithobacterin, a bacteriocin produced by a newly isolated bacterial strain, *Pantoea* sp. KB1. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 48(2), 189-193.
- Gauthier, T., Carolina, D., Julien, V., Elisa, B. (2020). Versicolorin A, a precursor in aflatoxins biosynthesis, is a food contaminant toxic for human intestinal cells. *Environment International Journal*, 10.1016/j.envint.2020.105568
- Griffiths, P. R., Duchamp, M. J., & Gray, H. B. (2006). Infrared and Raman spectroscopy: Principles and applications. *John Wiley & Sons*.
- Gromov, A. S., Malik, A. E., Pugh, C. J., & Leonenko, Z. (2021). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of atmospheric organic vapors: composition, sources, and atmospheric implications. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 23(4), 739-760.

- Gurudeeban, S., Satyavani, K., & Ramanathan, T. (2015). Ethnobotanical study of medicinal plants used by people in Javadhu hills of Eastern Ghats, Tamilnadu, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 172, 162-178.
- Hadi, A. H. (2016). Species diversity, structural aspect and carbon content of mangrove forest of Balikpapan coastal area. *Biological Forum*, 8(2), 969-972.
- Hadi, Y. (2016). Potensi tumbuhan mangrove sebagai sumber fitofarmaka lokal (kajian terhadap *Rhizophora* spp.). *Hutan Lestari*, 4(1), 45-51.
- Hailemariam, Y., Gurmu, D., Sewsew, G. W., & Mahteme, Y. (2020). Quality assessment of commercially available essential oils for quality control purposes using GC-MS and optical rotation analysis. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 226, 117599.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a User-friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hamed, A., Ibrahim, A. Y., Azad, I. S., Osman, G., & Kamel, M. S. (2015). Bioactive secondary metabolites from the endophytic fungus, *Lissondria* sp. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(5), 582-587.
- Hardiningtyas, S. D., Sri, P., Ekowati, H. 2014. Aktivitas Antioksidan Dan Efek Hepatoprotektif Daun Bakau Api-Api Putih. *Jphpi* 2014, Volume 17 Nomor 1
- Hardoim, P. R., van Overbeek, L. S., & Elsas, J. D. V. (2015). Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology*, 23(6), 331-341.
- Harwati, N. (2019). Potensi jamur endofit sebagai penyerap logam berat pada tanaman *Mikania micrantha* Kunth. *Journal of Ecolab*, 13(1), 35-42.
- Haryani, N. Erina dan Darniati. 2017. Isolasi *Aspergillus* sp. pada paru-paru Ayam Kampung (*Gallus Domesticus*). *Jimvet*. 01 (4) : 638
- Hasanah, M., Maharani, B. dan Murharni, E. 2017. Daya Antioksidan Ekstrak Dan Fraksi Daun Kopi Robusta (*Coffea robusta*) Terhadap Pereaksi DPPH (1,1-difenil-2-pikrihidrazil). *IJPST* : 42-49.
- Hashim, M., Kannan, N., Baharuddin, N., & Zakariya, H. (2010). The economic value of mangroves in Malaysia: Putting a price on conservation. *Forest Policy and Economics*, 12(5), 385-392.
- Hasiani, M., Khoirunnisa, F., & Arief, I. (2015). Metabolites diversity of mangrove endophytic jamur and potential benefits for medicinal and pharmaceutical field. *Procedia Chemistry*, 14, 251-260.
- Heirina, A., Rozirwan, Muhammad, H. 2020. Isolasi dan aktivitas antibakteri jamur endofit pada mangrove *Sonneratia alba* dari tanjung Carat Kabupaten Banyuasin Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains* 22 (1) 2020: 16-24
- Hidayat, I. (2016). Three Quinine and Cinchonidine producing *Fusarium* species from Indonesia. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 6(1), 20-34. <https://doi.org/10.5943/cream/6/1/3>
- Hohmann, J., Barbosa, A., Denham, A., & Evans, L. (2021). Diversifying strategies in a variable climate: effects on plant phenochemistry and bird anti-predatory behavior. *Functional Ecology*, 35(2), 224-237.

- Hotmian, E., Elly, S., Fatimawali, U., Trina, T. (2021). Analisis Gc-Ms (Gas Chromatography - Mass Spectrometry) Ekstrak Metanol Dari Umbi Rumput Teki (*Cyperus rotundus* L.). *Pharmacon* 10(2):849. DOI:10.35799/pha.10.2021.34034
- Hutasoit, E. P., Hartoko, A., & Soedharma, D. (2014). Ekologi Mangrove. *Jurnal Segara Mina*, 10(2), 1-15.
- Illing, K., Tobisch, M., & Müller, WE. (2017). Secondary metabolites. In Encyclopedia of Marine Biotechnology (pp. 1-12). Springer, Dordrecht.
- Istiana, P. 2014. Identifikasi Jamur Endofit Daun Jarum Pinus Radiata Menggunakan Metode Ekstraksi Dna Secara Langsung. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 8(1):31-42
- Jawetz, E., Melnick, J. L., & Adelberg, E. A. (2013). Medical microbiology. *McGraw-Hill Education*.
- Jos, A., Pichardo, S., Puerto, M., Sanchez, E., Grilo, A., Camean, A. M., & Chirino, Y. I. (2011). Antioxidant and pro-oxidant effects in the kidney of zebrafish (*Danio rerio*) acutely exposed to tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 252(1), 62-70.
- Jung, M., David Horgen., Sara Orski., Viviana Rodriguez C (2017). Validation of ATR FT-IR to identify polymers of plastic marine debris, including those ingested by marine organisms. *Marine Pollution Bulletin* 127(8). DOI:10.1016/j.marpolbul.2017.12.061
- Juniarti, A. (2011). Alkaloid dan peranannya dalam kehidupan. *LITERATUS*, 6(2), 1-6.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function, and pharmacological properties. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2(2), 377-392.
- Kavanagh, S., Jessica Gunnoo., Thayse Marques Passos., Jane Stout. (2018). Physicochemical properties and phenolic content of honey from different floral origins and from rural versus urban landscapes. *Food Chemistry* 272. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.08.035
- Khan, A. L., Waqas, M., Kang, S. M., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Hamayun, M., Lee, I. J. (2019). Bacterial endophyte *Sphingomonas* sp. LK11 produces gibberellins and IAA and promotes tomato plant growth. *Journal of Microbiology*, 57(6), 458-463.
- King, A., & Lecomte, C. (2021). A review of recent advances in Fourier transform infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(4), 325-377.
- Kiti, H, M., Cromwell Kibiti, Cosmas Munga, Josiah Odalo. (2022). Molecular characterization and antibacterial activities of mangrove fungal endophytes from coastal Kenya. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics* 5(3):654. DOI:10.5455/jabet.2022.d144
- Knebelberger, T and Stoger, I. 2012. DNA Extraction, Preservation, and Amplification. *DNA Barcodes*, 858.
- Kondo, N., Yusuke, O., Maki, Y., Takashi, O., Naoya, S., Takuya, K., Tatsuro, N., Akio, K. (2014). Identification of the phytosphingosine metabolic pathway leading to odd-numbered fatty acids. *Nat Commun journal*. 10.1038/ncomms6338.

- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7). <http://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Kurnia, D., Muniroh, S., & Ernawati, D. M. (2014). Metabolit sekunder jamur endofit dan manfaatnya terhadap tanaman. *Jurnal Ilmu Dasar*, 15(2), 177-186.
- Kurniawan, A., Fitria, I. P., & Mansur, M. (2021). Ekstraksi, isolasi dan karakterisasi senyawa bioaktif dari ekstrak metanol daun *Rhizophora mucronata* dan uji aktivitas antioksidan. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 19(2), 205-214.
- Lachkar, Floriane., Pascal, F., Febienne, F., (2021). Dihydroceramides: their emerging physiological roles and functions in cancer and metabolic diseases. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 10.1152/ajpendo.00330.2020.
- Lee, J., & Mittal, S. (2020). Biological analysis of phthalate esters: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(14), 1476-1525.
- Liu, L., Xuexiang, C., Weiwei, Z., Yunhao, W., Xiang, D., Lili, C., Dangquan, Z., Wanxi, P. (2018). Systematic characterization of volatile organic components and pyrolyzates from *Camellia oleifera* seed cake for developing high value-added products. *Arabian Journal of Chemistry*. 11 (6) 802-814. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.12.031>
- Lodish, H., S.L. Berk, P. Zipursky, D. Matdusaira, Baltimore and J. Darnell. 2000. *Molecular Cell Biology*, 4th Edition. W H Freeman and Company. New York.
- Loo, A. Y., Jain, K., Darah, I., & Chew, Y. L. (2008). Antioxidant activity of compounds isolated from the pyroligneous acid, *Rhizophora apiculata*. *Food Chemistry*, 107(3), 1151-1160.
- Luringunusa *et al.* (2021). "Senyawa fenolik merupakan salah satu senyawa metabolik sekunder yang memiliki struktur senyawa cincin aromatik dengan adanya salah satu gugus hidroksil (OH)". *Jurnal Ilmiah Platax*, Vol. 11(2), July-December
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., & Stahl, D. A. (2012). *Brock biology of microorganisms*.
- Mahmud, N., Nurhazrina, H., Nurfatehah, W., Rohaya, A., & Mohd, M. F. (2014). Pharmacological activities and phytochemical contents of *Rhizophora apiculata*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research*, 5(11), 4681-4689.
- Malacarne, M., Giampaolo Antonioli, Daniela Bertoldi, Tiziana Nardin, Roberto Larcher. (2018). characterisation of tannins using infrared spectroscopy. *Food Chemistry*. Volume 267, 30 November 2018, Pages 204-209. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.131>
- Mariska, I. (2015). Bioaktifitas dan ekstraksi metabolit sekunder dalam menjaga kualitas minyak ikan. *WARTAZOA*, 25(3), 131-139.



- Mashwani, Z., M. Khan, T. Khan, A. Nadhman. (2016). Applications of plant terpenoids in the synthesis of colloidal silver nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*. DOI:10.1016/j.cis.2016.04.008
- Masruroh, Merlin. 2019. Identifikasi Molekuler Fungi Endofit Daun Kesambi (*Schleichera Oleosa*) dan Ketapang (*Terminalia catappa*) Berdasarkan rDNA Its (Internal Transcribed Spacer). *Undergraduate Theses*. Universitas Jember
- Mehla, N., Aditi, K., Kanishka, K., Shefali, D., Vanshika, M. (2021). Applications of Antioxidants: A Review Applications of Antioxidants: A Review. *Plant Antioxidants and Health Journal*
- Minobe, S., Aizawa, M., Fujimoto, Y., & Mori, A. S. (2010). Classification of mangroves: A self-organizing map approach based on vegetation and soil characteristics. *Ecological Informatics*, 5(6), 407-416.
- Mizana, A., Suharti, R., & Amir, Z. (2016). Identifikasi Pertumbuhan Jamur *Aspergillus* Sp pada Roti Tawar yang Dijual di Kota Padang Berdasarkan Suhu dan Lama Penyimpanan. *Journal Kesehatan Andalas*. DOI: 10.25077/jka.v5i2.521
- Mohd Arrabe, A. B. H. J. O. K., & Noraini, T. (2013). Floristic composition of mangrove tree species in the state of Sarawak, Malaysia. *Journal of Tropical Biology and Conservation*, 10, 39-50.
- Mori, G., Subarnas, A., Pusparini, W., & Sudrajat, A. (2021). Isolation and characterization of secondary metabolite compounds from mangrove endophytic jamur from Karimunjawa Islands. *Advances in Health Sciences Research*, 33, 159-166.
- Muharni, Elfita, dan Masyita. 2015. Isolasi Senyawa Metabolit Sekunder Dari Ekstrak n-Heksana Batang Tumbuhan Brotowali (*Tinosporacrispa* L.) *Molekul*, 10(1), 38–44.
- Munde-Wagh, K. B., Wagh, V.D., Toshniwal, S.S., dan Sonawane, B.R., 2012, Phytochemical, antimicrobial evaluation and determination of total phenolic and flavonoid contents of *Sesbania grandiflora* flower extract, *Int. J. Pharm. Sci.*, 4 (4): 229-232.
- Münstedt, K., Stefan Bogdanov. (2009). Bee products and their potential use in modern medicine. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science* 1(3):57-63. DOI:10.3896/IBRA.4.01.3.01
- Muzzazinah. 2017. Metode Filogenetik pada Indigofera. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi dan Biologi* 25-40.
- Nafiannisa, Tita. 2020. Uji Aktivitas Antioksidan Pada Sediaan Herbal Oil. Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* L.) Dalam Minyak Zaitun Murni (Extra Virgin Olive Oil). *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Neto, R, G, L., Patrice Le Pape., Rejane, P, N. (2019). *Aspergillus* spp. In book: Pocket Guide to Mycological Diagnosis (pp.83-89). DOI:10.1201/b222059
- Ningsih, N., & Zuhasfair, Z. (2016). Skrining fitokimia, isolasi, dan karakterisasi kandungan steroid daun *kappaphycus alvarezii*. *Jurnal Kimia Riset*, 1(1), 34-42.

- Novika, A, P. 2021. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jamur Endofit Akar Mangrove *Avicennia* Sp. Terhadap *Vibrio* spp. *Undergraduet thesis*. Universitas Lampung
- Nugrahani, I., Fitria, S., & Ayuningsih, A. (2016). Penyaringan fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak darah daun pasak bumi (*Eurycoma longifolia* Jack). *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13(2), 16-22.
- Nurhalimah, S., Junianto, & Soelasm. (2021). Aktivitas antioksidan dari metabolit sekunder kapang endofit mangrove *Aegiceras corniculatum*. *Prosiding Seminar Nasional Pengabdian Kepada Masyarakat (SENAPATI)*, 1(1), 68-75.
- Nuryadi, W., Anna, R., Istiana, P., .2016. Isolasi Dan Identifikasi Kapang Endofit Dari Pohon Sengon Provenan Kepulauan Solomon Berdasarkan Morfologi Dan Molekuler (Analisis Rdna Its (Internal Transcribed Spacer). *Jurnal Biologi* Vol 5 No 6 Tahun 2016
- Ofrizal, Adriman, Muhammad Fauzi. 2017. Mangrove Community Structure in the Teluk Buo, Bungus Teluk Kabung Sub-Distrit, Padang Regency, Sumatera Barat. Fisheries and Marine Science Faculty, Riau University
- Okuda, T., & Ito, H. (2011). Tannins of constant structure in medicinal and food plants— hydrolyzable tannins and polyphenols related to tannins. *Molecules*, 16(3), 2191-2217.
- Omodamiro, O. D., Echezona, B. C., Onyeukwu, U., & Anyalewechi, N. A. (2016). Free radicals scavenging activity of solvents extracted from three Nigerian spices. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), 1-8.
- Ong, J. E., Gong, W. K., & Wong, C. H. (2004). Silviculture of mangroves in Southeast Asia. *Forest Ecology and Management*, 201(1-3), 95-109.
- Oramahi, H, A., Christanti Sumardiyono., Nursamsi Pusposendjojo., Haryadi Haryadi. (2006). Identifikasi Jamur Genus *Aspergillus* pada Gapek di Kabupaten Gunung Kidul. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. <https://doi.org/10.22146/jpti.11959>
- Pagare, P., Dashora, N., Bhatt, P., Jadhav, V., & Patel, S. (2015). Secondary metabolites and their medicinal potential in plants. In *Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology* (pp. 117-146). Springer, New Delhi.
- Palanisamy, M., Dhillon, G. S., & Rajasekaran, S. K. (2018). Antioxidant secondary metabolites from endophytic jamur. In E. B. Baghdikian (Ed.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 106, pp. 81-163). Springer.
- Pearson. Manoli, F., Fanelli, G., Mattioli, M., Pomponio, R., & Romeo, I. (2021). Different GC–MS approaches for the metabolic profiling of exhaled breath condensate. *Journal of Breath Research*, 15(4), 046006.
- Pratiwi, D, K., (2021). Isolasi Jamur Endofit Pada Mangrove *Rhizophora apiculata* Dalam Uji Antibakteri Dari Kawasan Mangrove Tanjung Api-Api Kabupaten Banyuasin. *Skripsi*. Univeristas Sriwijaya.
- Pratiwi, D.R., Marisa, B., dan Partomuan, S. 2014. Lelutung Tokak (*Tabernaemontana macrocarpa* Jack) Sebagai Sumber Zat Bioaktif Antioksidan dan Antikanker. *Ilmu Kefarmasian Indonesia* : 267-227.

- Premanathan, M., Kathiresan, K., & Raja, G. (1999). Antibacterial activity of *Rhizophora apiculata* leaf extracts. *Fitoterapia*, 70(4), 391-392.
- Prihatiningtias, E., & Wahyuningsih, T. D. (2011). Fermentation technology of microbial. *Indonesian Biotechnology Journal*, 16(1), 166-174.
- Purnamaningsih, R. W. (2017). Kajian senyawa turunan triterpenoid saponin sebagai antijamur. *Jurnal Penelitian Sains Natural*, 1(2), 22-29.
- Purwanti, Ika Restu. (2017). Aktivitas Antioksidan Dan Sitotoksitas Ekstrak Miselium Dan Filtrat Hasil Fermentasi Kapang Endofit SKF 15 Dari Biota Laut Seroja Kol. *Skripsi*. Univeristas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta.
- Putra, E. T., Romaido, R. T., & Nugroho, A. P. (2020). Peranan jamur endofit dalam meningkatkan pertumbuhan dan produktivitas tanaman: Kajian sistemik jamur endofit. *Jurnal Universitas Batanghari*, 20(2), 214-224.
- Quiroga, L. G., Magallanes-Noguera, C., Paredes, D. R., & Leyton, P. P. (2019). Endophytic bacteria isolated from tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) with the ability to promote plant growth. *Biology Research*, 52(1), 1-11.
- Rachman, R. N., Tjahjono, A. R., & Sukmarini, L. (2018). Isolation and characterization of endophytic jamur from *Polygonum minus* Huds. *Procedia Chemistry*, 25, 215-218.
- Rahayu, F., Saryono, Titania T. Nugroho. (2015). Isolasi Dna Dan Amplifikasi Per Daerah ITS rDna Fungi Endofit Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia variabilis*) LBKURCC69. *JOM FMIPA* Volume 2 No.1
- Rahim, A. A., Rocca, E., Steinmetz, J., Boury, F., & Smadja, J. (2008). Aqueous extract of *Rhizophora apiculata* prevents cell death and alleviates hydroxyl radical-induced DNA damage. *Pharmaceutical Biology*, 46(12), 866-875.
- Rahmayani, U., Priggenies, D. dan Djunaedi, A. 2013. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kasar Kering Bakau (*Telescopium telescopium*) dengan Pelarut yang Berbeda terhadap Metode DPPH (Diphenyl Picril Hidrazil). *Journal of Marine Research* 2(4):36-45.
- Rakhmana, S., Saryono., Titania T. Nugroho. (2015). Ekstraksi Dna Dan Amplifikasi ITS rDna Isolat Fungi Endofit LBKURCC67 Umbi Tanaman Dahlia (*Dahlia Variabilis*). *JOM FMIPA* Volume 2 No. 1
- Ramadan, F., Robert Bara., Fitje Losung., Remy E P Mangindaan. (2018). Substansi anti bakteri dari jamur endofit pada mangrove *Avicennia marina*. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis* 6(1):21. DOI:10.35800/jplt.6.1.2018.20115
- Ramakrishna, R., & Gupta, A. (2019). Chapter 1 - Mass Spectrometry: A Versatile Analytical Technique for the Detection of Explosives. *Analytical Instrumentation*, 1-26.
- Ramos, A. N., Suhendy, H., & Prasasty, R. D. (2020). Analysis of volatile compounds in Bali orange peel oil using FTIR spectroscopy. *Journal of Physics: Conference Series*, 1477(1), 012010.
- Rampa, E., Seflywanti Manurun, Herlando Sinaga. (2023). Isolasi Fungi Endofit dari Buah dan Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Penelitian Kesehatan Suara Forikes*. Vol 14, No 1
- Ravikumar, S., Gnanadesigan, M., Suganthi, P., Ramkumar, R., Balagurunathan, R., & Vijayakumar, R. (2011). Phytochemical analysis and antibacterial

- activity of *Avicennia marina* (Forssk) Vierh. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 3(3), 43-45.
- Refai M, El-Yazid Ha, Hassan Atef 2014. Monograph On *Aspergillus* And Aspergillosis In Man, Animals, And Birds. A Guide For Classification And Identification Of Aspergilli, Disease Caused By Them, Diagnosis And Treatment; 2014.
- Ridlo, A., Isnansetyo, A., & Arachchi, I. D. W. (2017). Free radicals and oxidative stress in human health: A review. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 5(3), 69-76.
- Rochat, B. (2021). LC-MS/MS in drug discovery. In *Drug Discovery* (pp. 185-198). Humana Press.
- Rohringer, W., & Kroutil, W. (2020). Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy: An invaluable analytical tool. *Organic Process Research & Development*, 24(1), 1-16.
- Romadanu, D. F., Mubarak, M. S., & Dwilanawati, D. K. (2014). Antioxidant activities of *Alstonia scholaris* leaf extract. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(5), 466-469.
- Rozirwan., Jainuddin., & Kusmana, C. (2020). Mangrove: Posisi, Potensi, dan Penerapannya. *Media Konservasi*, 25(3), 282-293.
- Rozirwan., Rijiva., Siddiqui, S. Z., & Syarifuddin, K. (2022). Diversity, Structure, and Conservation of Mangrove Vegetation in Palembang, South Sumatra, Indonesia. *Forest and Society*, 6(1), 96-110.
- Ruchi, Widya (2019) Karakteristik Molekuler Jamur Trichoderma yang Diisolasi dari Rizosfer Beberapa Varietas Padi (*Oryza sativa* L.) di Sumatera Barat. *Undergraduated thesis*, Universitas Negeri Padang.
- Sabbathini, G.C., Wijanarka, S. Pujiyanto & P. Lisdiyanti. 2017. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Genus *Sphingomonas* dari Daun Padi (*Oryza Sativa*) di Area Persawahan Cibinong. *Jurnal Biologi* 6(1): 59-64.
- Sadeli, P., Rahardjo, S. B., & Laga, A. (2016). Isolasi dan karakterisasi antioksidan dari ekstrak etanol daun *Calophyllum soulattri* Burm F. dengan metode DPPH. *Media Litbangkes*, 26(2), 65-74.
- Samaddar, S., & Jayakumar, S. (2015). Adaptations of woody plants to environmental stress: Mangroves. *Wood Science and Technology*, 49(5), 903-923.
- Samson RA, Samson RA, Visagie CM, *et al.* (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78: 141–173
- Santoso, M., Farid, M. M., Mahmud, A., Watabe, M., & Fujiwara, K. (2015). *Rhizophora apiculata* seedling growth and physiological responses under seawater and freshwater tidal inundation. *Aquatic Botany*, 125, 41-48.
- Sari JMP, Adrian R, Lubis RB. 2022. Review: endophytic fungus as biocontrol and growth stimulator of food crops and horticulture in suboptimal land. In: Herlinda S *et al.* (Eds.), *Prosiding Seminar Nasional Lahan Suboptimal ke-10 Tahun 2022*, Palembang 27 Oktober 2022. pp. 722-735
- Sathya. J. Jeeva, J. Sunitha, R. Ananthalakshmi, S. Rajkumari, Maya Ramesh, and Ramesh Krishnan. 2015. Enzymatic antioxidants and its role in oral diseases. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015 Aug; 7 (Suppl 2): S331–S333.

- Satyavani, K., Gurudeeban, S., & Ramanathan, T. (2012). *Rhizophora apiculata*: An ethnomedicinal plant with cytotoxic and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2(1), S313-S316.
- Savitri, Irena., Lutfi Suhendra., Ni Made Wartini. ( 2017). Pengaruh Jenis Pelarut Pada Metode Maserasi Terhadap Karakteristik Ekstrak *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. Vol. 5 No. 3 (93-101). <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jtip/article/view/35504>
- Seepana, R., Vemu, B., Le, P. L. B., Aminabhavi, T. M., & Pandey, A. (2016). A comprehensive review of various strategies for enhanced bioavailability of phytochemicals. *Journal of Food Science and Technology*, 53(6), 2219-2234.
- Selim, K., El-Beih, A., & El-Diwany, A. I. (2012). Endophytic jamur: a novel source of bioactive compounds. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, 1(1), 4-10.
- Setyawan, A. D., & Ulumuddin, Y. (2012). Keanekaragaman jenis, hubungan kekerabatan, dan pola distribusi mangrove di pesisir Jawa Timur, Indonesia. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, 4(2), 149-156.
- Shareef, H., Jemal, H., Haider, M., Imad, Hadi. (2016). Antibacterial Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Roscoe and Bioactive Chemical Analysis using Gas Chromatography Mass Spectrum Oriental. *Journal Of Chemistry* 32(2):817-837. DOI:10.13005/ojc/320207
- Sheng, D., & Song, F. (2020). Current development of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in proteomics and metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews*, 39(6), 618-639.
- Sheue, C. R., Liu, H. Y., Yong, J. W. H. (2013). Mangrove *Rhizophora stylosa* Griff. in China: an overview on the morphology, anatomy, function, and ecological services. *Wetlands*, 33(1), 1-9.
- Situmorang, D, A, G., Rozirwan, Muhammad Hendri, (2021). Isolasi dan aktivitas antibakteri jamur endofit pada mangrove *Avicennia marina* dari Pulau Payung Kabupaten Banyuasin Sumatera Selatan. *Jurnal Penelitian Sains* 23(3):125-133. DOI:10.56064/jps.v23i3.661
- Soares, M. A., Souza, A. T., Cruz, R. A., Dantas, T. A., Lima, N. S., & Caetano, F. R. (2019). Endophytic jamur in mangrove trees: a hidden treasure of bioactive compounds. In *Marine jamur* (pp. 135-150). Springer.
- Sobolewska, D., Galanty, A., & Michalak, B. (2020). Biological activity of Saponins from Medicinal Plants. *Postępy Fitoterapii*, 1(21), 32-37.
- Sogandi., Mega, F., Astari, T. (2019). Identifikasi Senyawa Bioaktif Identifikasi Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai Inhibitor *Propionibacterium acne*. *Buletin Penelitian Kesehatan* 48(1). DOI:10.22435/bpk.v48i1.2338
- Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U., & Harper, J. (2004). Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268.
- Suciatmih, T. (2010). Pembuatan medium komersial starter kultur jamur tiram (*Pleurotus ostreatus*) dalam kerapatan yang berbeda. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*, 10(1), 1-8.

- Sukmawaty, R., Darnetty, -, & Zen, L. (2020). Isolation, identification, and characterization of endophytic fungus from *Hoya kerrii* and its bioactive compounds. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), 439-445.
- Suryadi, H. (2013). Peranan radikal bebas dalam berbagai penyakit dan pengaruhnya terhadap kesehatan manusia. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*, 4(3), 137-142.
- Suryanita, Aliyah, Djabir, Y.Y., Wahyudin, E., Rahman, L. dan Yulianty, R. 2019. Identifikasi Senyawa Kimia dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Bali (*Citrus maxima* Merr). *Majalah Farmasi dan Farmakologi* 23(1):16-20.
- Swofford, D. L. (2002). *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Version 4*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02198856>
- Syaifuddin. 2015. Uji Aktivitas Antioksidan Bayam Merah (*Alternanthera amoena* Voss.) Segar Dan Rebus Dengan Metode Dpph (1,1 -diphenyl-2-piclylhydrazyl). *Undergraduate Thesis*. Universitas Islam Negeri Walisongo
- Tadizh, H., & James, E. K. (2013). Endophytic jamur as a rich source of bioactive compounds. *Natural Product Communications*, 8(8), 1357-1360.
- Takeshita, A., Norio, A., Masamitsu, Y., Toru, S. (2019). Tamibarotene As Maintenance Therapy for Acute Promyelocytic Leukemia Improved Long Term Relapse-Free Survival: 7-Year Results from a Randomized Controlled Trial, JALSG-APL204. *Nature Publishing Group.*, Leukemia(Vol. 33, Issue 2). <http://dx.doi.org/10.1038/s41375-018-0233-7>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725-2729.
- Tan, R. X., & Zou, W. X. (2001). Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4), 448-459.
- Tille, P.M. (2013) *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 13th Edition, C.V. Mosby Company, St. Loius, 1056.
- Veronica, V, H., Islamudin, A., Laode, R. 2015. Isolasi Jamur Endofit Dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan Dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 2015. Vol 1. No 4.p-ISSN: 2303-0267, e-ISSN: 2407-6082
- Vignesh R, Swathirajan CR, Solomon S, Shankar EM, Murugavel KG, Paul I, *et al*. Iodine-glycerol as an alternative to lactophenol cotton blue for identification of fungal elements in clinical laboratory. *Indian J Med Microbiol*. 2013;31(1):93-4.
- Vijaya, C. C. (2017). Endophytic jamur as a source of bioactive compounds. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(4), 639-653.
- Vittaya, A., Putri, A. S., & Dewi, R. M. (2022). Comparative analyses of saponin, phenolic, and flavonoid contents in various parts of *Rhizophora mucronata* and *Rhizophora apiculata* and their growth inhibition of aquatic pathogenic bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* Vol. 0(00), pp 001-011, 2022. DOI: 10.7324/JAPS.2022.121113

- Vogelgesang, J., Shah, A. A., & Brusch, K. (2021). Risk analysis of incidents involving hazardous materials in transport by considering hazardous substance characteristics. *Process Safety and Environmental Protection*, 152, 1062-1075.
- Wahyuni, S. (2015). Uji aktifitas antioksidan mentimun (*Cucumis sativus* L.) dengan metode DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Farmasi*, 1(1), 32-38.
- Wardani, H. A., Kusmana, C., & Subiyanto, M. A. (2016). Keanekaragaman Jenis Mangrove di Indonesia. *Jurnal Penelitian Hutan dan Konservasi Alam*, 13(2), 155-170.
- Warni, J., A. Marliah., G. Erida. (2022). Uji Aktivitas Bioherbisida Ekstrak Etil Asetat (*Cyperus rotundus* L.) Terhadap Pertumbuhan Gulma Bayam Duri (*Amaranthus spinosus* L.). *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pertanian*. Vol. 7. No. 2. <https://doi.org/10.17969/jimfp.v7i2.20085>
- White TJ, Bruns T, Lee S, *et al.* (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR protocols: a guide to methods and applications (Innis MA, Gelfand DH, Shinsky TJ, White TJ, eds). *Academic Press Inc*, New York: 315–322.
- Widmer, M., & Kohler, I. (2021). Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in pharmaceutical analysis: An overview. *Analytical Letters*, 54(1-2), 199-219.
- Xu, R., Zhu, L., Wang, S., Duan, L., Zhou, G., Zhang, X., & Chen, C. (2020). Comparison of HS–SPME–GC–MS and HS–GCGC–MS methods for the analysis of volatile compounds in ginger. *Journal of Chromatographic Science*, 58(10), 988-994.
- Yadav, S., Lal, U. R., Jain, J., & Sharma, R. (2014). Terpenoids and their biological significance: a review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6(3), 11-20.
- Yang, J., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2019). Rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria. In *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation* (pp. 207-224). Springer.
- Yasmin, R., Wulan, U., Anggiresti, K., Aulia, N. (2022). Potential of Anti-Cancer and Antimicrobial in Orchid Based on Prediction of Activity Spectra for Substances (Pass) Online. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences* 8(1):2714-5654. DOI:10.19184/ams.v8i1.2684
- Yoshimasu, K., & Furukawa, S. (2016). Modified immunotherapy for alopecia areata. *Autoimmun Reviews*. 15(7):664-7. doi: 10.1016/j.autrev.2016.02.021.
- Zalamah, Siti Zaharani. 2023. Pengaruh pH dan Suhu Terhadap Aktivitas Antioksidasi Isolat Jamur Endofit Mangrove (*Rhizophora apiculata*). *Undergraduate Skripsi*. Unpublished. Universitas Andalas.
- Zhang, H., Zheng, S., Liu, Q., Li, T., Huang, H., & Li, D. (2011). Isolation and identification of Endophytic jamur from medicinal plant *Brucea mollis*. *中国中药杂志 (China Journal of Chinese Materia Medica)*, 36(18), 2521-2524.

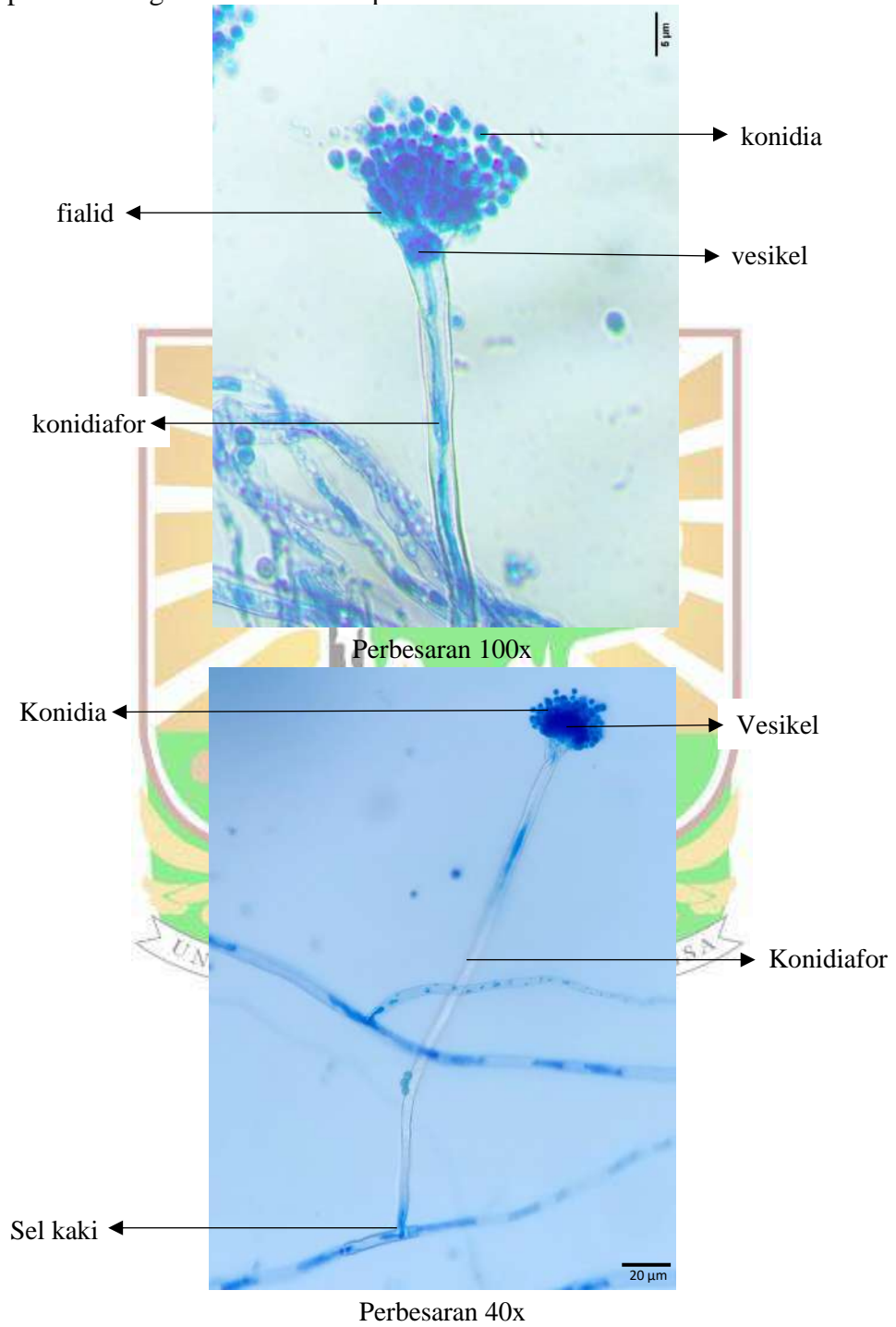
- Zhang, S., Zhi, H., Guo, Z., Hui, T., Fei, C. (2022). *Aspergillus versicolor* as a source of diversified metabolic products with pharmacological activities. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol 74, 225-277. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91099-6.00015-3>
- Zhang, X., Xu, X., Ding, L., & Wang, J. (2021). Principles and applications of liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) in environmental analysis. *Journal of Environmental Sciences*, 100, 1-19.
- Zhou, X., Wei, H., Xia, Y., & Su, Z. (2018). Diversity and antioxidant activities of endophytic jamur isolated from two mangrove plants in China. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1293.
- Zipcodezoo. (2016). *Rhizophora apiculata*. Diakses pada tanggal 14 Oktober 2023, dari [https://zipcodezoo.com/index.php/Rhizophora\\_apiculata](https://zipcodezoo.com/index.php/Rhizophora_apiculata).



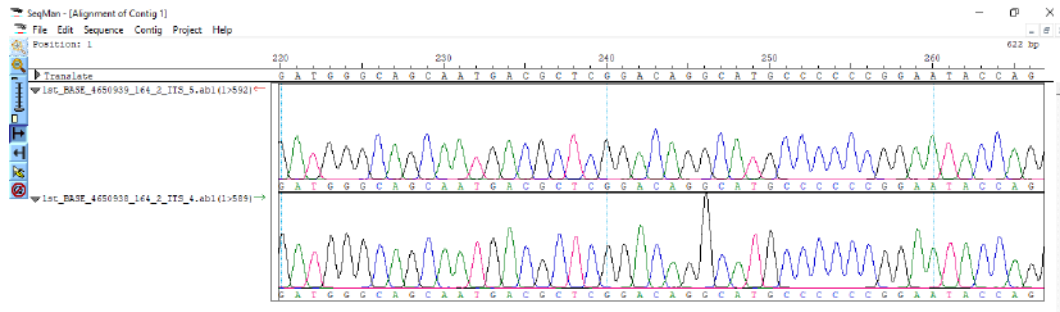


## LAMPIRAN

Lampiran 1. Pengamatan Mikroskopis EUA-111



## Lampiran 2. Contoh elektroforegram hasil sekuensing isolat jamur EUA-111



## Lampiran 3. Komposisi Basa Nukleotida

No.	Nama	T(U)	C	A	G	Total
1	EUA-111	22,5	28,3	20,7	28,5	622
2	<i>Aspergillus austwickii</i> DTO 228-F7	21,5	27,7	21,6	29,2	750
3	<i>Aspergillus aflatoxiformans</i> DTO 228-G2	21,5	27,7	21,6	29,2	750
4	<i>Aspergillus krugeri</i> PPRI 8986	20,9	27,9	21,7	29,5	738
5	<i>Aspergillus subflavus</i> CBS 143683	21,3	27,8	22,2	28,7	680
6	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 16883	22,6	29,0	20,0	28,5	594
7	<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL 447	21,9	28,7	21,3	28,1	616
8	<i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 502	21,4	28,7	21,3	28,6	616
9	<i>Aspergillus mottae</i> CBS 130016	22,4	29,9	19,6	28,1	566
10	<i>Aspergillus sergii</i> MUM 10.219	21,3	29,0	21,0	28,7	606
11	<i>Aspergillus pseudotamarii</i> NRRL 25517	21,3	28,9	21,5	28,4	620
12	<i>Aspergillus transmontanensis</i> CBS 130015	22,3	29,6	19,7	28,4	564
13	<i>Aspergillus caelatus</i> NRRL 25528	21,6	28,5	21,5	28,4	620
14	<i>Aspergillus tamarii</i> NRRL 20818	21,5	28,6	21,6	28,3	619
15	<i>Aspergillus bombycis</i> NRRL 26010	21,4	28,6	21,5	28,5	618
16	<i>Aspergillus arachidicola</i> CBS 117610	21,2	29,4	20,8	28,6	595
17	<i>Aspergillus pseudonomiae</i> NRRL 3353	20,7	29,1	21,6	28,6	619
18	<i>Aspergillus nomiae</i> NRRL 13137	20,5	29,2	21,6	28,6	619
19	<i>Aspergillus novoparasiticus</i> CBS 126849	22,4	30,0	18,7	28,9	536
20	<i>Aspergillus terricola</i> var. <i>americanus</i> CBS 580.65	22,6	30,0	19,1	28,3	544
21	<i>Aspergillus magaliesburgensis</i> PPRI 6165	20,9	28,3	21,4	29,4	742
22	<i>Penicillium ornatum</i> CBS 190.68	20,2	29,3	21,0	29,5	728
	Avg.	21,5	28,8	21,0	28,7	634,6

Lampiran 4. Persentase sekuen divergence (p-distance)

No	Spesies	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	EUA-111																						
2	<i>A. austwickii</i>	0,01																					
3	<i>A. aflatoxiformans</i>	0,01	0,00																				
4	<i>A. krugeri</i>	0,02	0,01	0,01																			
5	<i>A. subflavus</i>	0,02	0,01	0,01	0,01																		
6	<i>A. flavus</i>	<b>0,00</b>	0,01	0,01	0,02	0,02																	
7	<i>A. oryzae</i>	0,01	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01																
8	<i>A. parasiticus</i>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01															
9	<i>A. mottae</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01														
10	<i>A. sergii</i>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01													
11	<i>A. pseudotamarii</i>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,01	0,00												
12	<i>A. transmontanensis</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01											
13	<i>A. caelatus</i>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01										
14	<i>A. tamarii</i>	0,02	0,01	0,01	0,01	0,00	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00									
15	<i>A. bombycis</i>	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,00							
16	<i>A. arachidicola</i>	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01						
17	<i>A. pseudonomiae</i>	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02						
18	<i>A. nomiae</i>	0,04	0,03	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03	0,02	0,01	0,01	0,02	0,00					
19	<i>A. novoparasiticus</i>	0,02	0,02	0,02	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01	0,02	0,00	0,02	0,02	0,02	0,01	0,03	0,03				
20	<i>A. terricola</i> var. <i>americanus</i>	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,03	0,01			
21	<i>A. magaliesburgensis</i>	0,06	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	
22	<i>Penicillium ornatum</i>	0,10	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,11	0,11	0,09	

Lampiran 5. Pohon filogenetik metode NJ dengan boostrap 1000x

