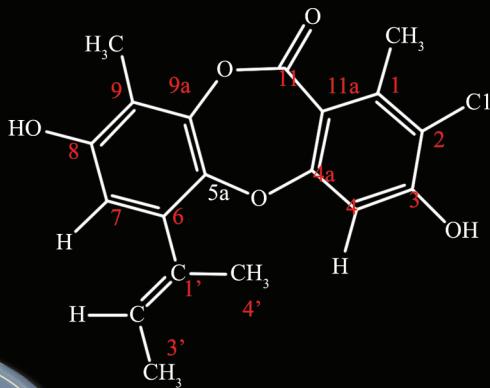


Senyawa AntiBakteri Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) dari Jamur Laut *Aspergillus unguis*



Prof. Dr. Apt. Dian Handayani.
Dr. Ibtisamatul Aminah, S.Si.
Prof. Dr. Apt. Dayar Arbain.
Dr. dr. Andani Eka Putra, M.Sc.

Senyawa Antibakteri Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) dari Jamur Laut *Aspergillus unguis*

**Dian Handayani
Ibtisamatul Aminah
Dayar Arbain
Andani Eka Putra**



Senyawa Antibakteri dari Jamur Laut *Aspergillus unguis*

Penulis:

Dian Handayani
Ibtisamatul Aminah
Dayar Arbain
Andani Eka Putra

Design Cover:

Ivan Zumarano

Tata Letak:

Achmad Faisal

Cetakan Pertama: **Desember, 2022**
Hak Cipta 2022

Hak Cipta Dilindungi Oleh Undang-Undang

Copyright © 2022
by Penerbit Nuansa Fajar Cemerlang Jakarta
All Right Reserved

Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini tanpa izin tertulis dari Penerbit.

PENERBIT:

Nuansa Fajar Cemerlang
Grand Slipi Tower, Lantai 5 Unit F
Jl. S. Parman Kav 22-24, Palmerah
Jakarta Barat
Website: www.nuansafajarcemerlang.com
Instagram: @bimbel.optimal

PRAKATA

Puji syukur penulis panjatkan kepada Allah SWT, atas berkat rahmat karunia-Nya hingga penulis dapat menyelesaikan penulisan buku referensi tentang Senyawa Antibakteri dari Jamur Laut *Aspergillus unguis*. Penyusunan buku ini dilandasi oleh perkembangan pesat resistensi mikroba terhadap antibiotika yang tersedia di pasaran, sehingga mendorong usaha dalam penemuan antibiotik baru yang berguna bagi dunia kesehatan. Hasil penelitian terkait pemanfaatan bahan alam dari jamur laut sebagai bahan bioaktif telah banyak dipublikasikan dan melalui buku ini penulis bertujuan untuk menyusun referensi yang ringkas dan komprehensif yang ditujukan untuk para pembaca yang tertarik pada senyawa kimia bahan alam yang berasal dari jamur laut dengan inangnya invertebrate laut dan tanaman mangrove.

Buku ini terbit atas sebagai luaran tambahan dari hibah penelitian skim Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) batch II (2015–2019) yang telah dilaksanakan dengan sukses dan cemerlang oleh **Ibtisamatul Aminah**. Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada Ristekdikti karena dengan kesempatan ini penulis bisa menerbitkan buku kolaborasi untuk yang pertama kali. Penulis berharap agar buku ini dapat digunakan sebagai pustaka dalam pelaksanaan penelitian dan pengembangan ilmu pengetahuan terutama dalam kajian kimia bahan alam asli Indonesia.

Padang, 17 Oktober 2022

Penyusun

DAFTAR ISI

PRAKATA.....	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Perumusan Masalah	4
1.3. Tujuan.....	4
1.4. Manfaat Kajian	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1. Etnobotani dan Obat Tradisional.....	5
2.2. Penemuan Obat Alami dan Statusnya Saat Ini.....	6
2.3. Status Penelitian Senyawa Kimia Bahan Alam Kelautan Saat Ini.....	10
2.4. Obat dan Kandidat Obat dari Laut	13
2.5. Jamur yang Berasal dari Laut	18
2.5.1. Jamur yang Berasal dari Spons Laut	20
2.5.2. Jamur yang Berasal dari Alga Laut.....	24
2.5.3. Jamur yang Berasal dari Koral Laut	26
2.5.4. Jamur Endofit dari Mangrove	28
2.6. Spons Laut <i>Acanthostrongylophora ingens</i>	31
2.6.1. Spons.....	31
2.6.2. <i>Acanthostrongylophora ingens</i>	32
2.7. Asosiasi Mikroorganisme pada Spons Laut.....	33
2.7.1. Asosiasi Jamur pada Spons Laut	35
2.8. Jamur <i>Aspergillus unguis</i>	38
2.8.1. Kandungan Senyawa Kimia Bahan Alam dari Jamur <i>A. unguis</i>	38
2.9. <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	41

2.9.1.	Gambaran umum <i>Staphylococcus aureus</i>	42
2.9.2.	Mekanisme Resistensi Bakteri <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA).....	43
2.10.	Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri.....	45
2.11.	Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Antibakteri	48
2.12.	Karakterisasi dan Penentuan Struktur Senyawa Antibakteri.....	53
2.13.	Peranan Bioinformatika.....	61
2.13.1.	Alat bantu dalam bioinformatika	62
2.13.2.	Autodock	64
2.13.3.	AutoDock Vina.....	64
2.13.4.	PyMOL.....	64
2.14.	Studi Docking	64
BAB 3 METODOLOGI		67
3.1.	Bahan Alat dan Penelitian	67
3.2.	Prosedur Penelitian	68
3.2.1.	Kerangka Operasional Penelitian	68
3.2.2.	Koleksi Sampel Penelitian	70
3.2.3.	Isolasi Jamur dari Sampel	70
3.2.4.	Kultivasi Isolat Jamur.....	71
3.2.5.	Ekstrasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Jamur.....	71
3.2.6.	Skrining Aktivitas Antibakteri.....	71
3.2.7.	Kultivasi dan Isolasi Senyawa Antibakteri	72
3.2.8.	Karakterisasi dan Penentuan Struktur Senyawa Antibakteri	72
3.2.9.	Deteksi bakteri MRSA.....	72
3.2.10.	Analisis Sel Bakteri MRSA Menggunakan SEM (Murtey and Ramasamy, 2016) (dimodifikasi)	75
3.2.11.	<i>Molecular Docking</i> Senyawa Anti-MRSA secara in silico (Dallakyan and Olson, 2015).....	75

BAB 4 HASIL DAN PEMBAHASAN	77
4.1. Isolasi dan Identifikasi Jamur <i>A. unguis</i> IB151 dari Spons Laut <i>A. ingens</i>	77
4.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Jamur <i>Aspergillus unguis</i> IB151	81
4.3. Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Jamur <i>A. unguis</i> IB151	82
4.3.1. Penentuan Struktur Senyawa IB-01.....	82
4.3.2. Penentuan Struktur Senyawa IB-02.....	89
4.3.3. Senyawa Nidulin.....	95
4.4. Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Isolasi	100
4.5. Analisa <i>in silico</i> Senyawa Hasil Isolasi Jamur <i>A. unguis</i> ..	104
4.5.1. Target Protein PBP2a.....	105
4.5.2. Target Protein BlaR1 dan MecR1.....	108
4.6. Hubungan Struktur dengan Aktivitas Senyawa Hasil Isolasi.....	113
4.7. Morfologi Dinding Sel Bakteri MRSA setelah Perlakuan Senyawa.....	115
BAB 5 PENUTUP	121
5.1. Kesimpulan	121
5.2. Saran.....	121
DAFTAR PUSTAKA	123
GLOSARIUM	163
INDEKS	177
PROFIL PENULIS	183

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur morfin (1), kina (2), klorokuin (3), meflokuin (4), arteether (5) dan artemisinin (6)	8
Gambar 2.2	Struktur paclitaxel (Taxol®) (7), vinblastine (VLB) (8), vincristine (VCR) (9), penisilin G (10) dan siklosporin (siklosporin A, CsA) (11)	10
Gambar 2.3	Entitas senyawa kimia baru dari 1981 hingga 2014 (Newman dan Cragg, 2016)	10
Gambar 2.4	Variasi jumlah senyawa kimia bahan alam laut baru pada tahun 1985-2012 (Hu et al., 2015a)	11
Gambar 2.5	Bioaktivitas Senyawa Kimia Bahan Alam Kelautan (*PHVD: Prevention of head and vascular disease, **PN/NT: Protection of neurons/ neurotoxicity)	12
Gambar 2.6	Struktur trabectedin (ET-743) (12), brentuximab vedotin (SGN-35) (13), eribulin mesylate (E7389) (14), asam lemak omega-3 etil ester (15), ziconotide (16), vidarabine (Ara-A) (17) dan sitarabin (Ara-C) (18).....	15
Gambar 2.7	Senyawa Baru dari Jamur yang berasal dari Laut dibagi dengan sumber Strain Jamur (Jin et al., 2016)..	20
Gambar 2.8	Jumlah total senyawa baru yang diisolasi dari berbagai jenis sumber laut, 2001-2010 (Mehbub et al., 2014)	20
Gambar 2.9	Struktur trichoharzin (19), gymnastatins A-C (20-22) dan sorbicillactone A (23).....	21
Gambar 2.10	Struktur radicinin (24), culvularin (25), sydowinin B (26), dan sterigmatocystin (27)	23
Gambar 2.11	Struktur oksisterigmatocystin J (28), K (29), L (30) dan aspergillicin A (31).	24

Gambar 2.12 Struktur plinabulin (32), arisugacin K (33), 6 β -9 α -dihydroxy-14-pnitrobenzoylcinnamolide (34), varioloid A dan B (35 dan 36) dan varioxepine A (37)	.26
Gambar 2.13 Struktur pseudopterosin A-D (38-41), oksalikumon D dan E (42 - 43), territrem D dan E (44 dan 45), 11 α , dehydroxyisoterreulactone A (46) dan isobutyrolactone II (47)27
Gambar 2.14 Struktur camptothecin (48), pestalamina A (49) dan flavipesin A (50).....	.29
Gambar 2.15 Struktur Cytochalasin A-D (50-53), H (54) dan Beauvericin (55)31
Gambar 2.16 Spons <i>Acanthostrongylophora ingens</i>32
Gambar 2.17 Senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari spons <i>Acanthostrongylophora ingens</i>33
Gambar 2.18 Diagram skematik hubungan simbiotik antara spons dan mikroorganisme. A. eksosimbiosis ekstraseluler; B. endosimbiosis ekstraseluler; C. simbiosis intraseluler; dan D. simbiosis intranuklear (Lee, Lee and Lee, 2001).34
Gambar 2.19 Persentase distribusi senyawa yang dihasilkan oleh (a) assosiasi bakteri dan fungi pada spons, (b) Assosiasi fungi (Thomas, Kavlekar and LokaBharathi, 2010)35
Gambar 2.20 Gambaran mikroskopis A. unguis, (A) Kepala konidia (B) Hipa (Eltem et al., 2004)38
Gambar 2.21. Senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari jamur A. unguis41
Gambar 2.22 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> pada media mueller hinton agar (A), Gambaran dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) (B) (Murtey and Ramasamy, 2016)43

Gambar 2.23	Sistem regulasi yang mengontrol ekspresi β -lactamase dan PBP2a (Wilke, Hills, Zhang, et al., 2004)	44
Gambar 2.24	A. Perkolator, B. Sokletasi, C. Destilasi uap	49
Gambar 2.25	Metode pemisahan campuran dengan kromatografi kolom	50
Gambar 2.26	Penentuan Retention Faktor (Rf) pada plat KLT	52
Gambar 2.27	Metode penentuan profil KLT	53
Gambar 2.28	Bagian dasar alat spektrometer massa yang paling umum digunakan	54
Gambar 2.29	Spektrum elektromagnetik inframerah (IR), dan daerah sekitarnya	55
Gambar 2.30	Spektrum UV-Vis	58
Gambar 2.31	Daftar Nilai Pergeseran Kimia NMR	60
Gambar 2.32	Daftar Nilai Pergeseran Kimia NMR	61
Gambar 3.1	Alur penelitian penentuan MIC dan MBC senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> IB151 terhadap MRSA	68
Gambar 3.2	Alur penelitian gambaran kerusakan dinding sel bakteri MRSA akibat senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> IB151	69
Gambar 3.3	Alur penelitian molecular docking antara senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> IB151 dan protein target MRSA	70
Gambar 4.1	Isolat Jamur Simbion Spon <i>A. ingens</i> ; IB101 (A), IB102 (B), IB121 (C), IB131 (D), IB141 (E), IB142 (F), IB151 (G) dan IB161 (H)	77
Gambar 4.2	Gambar makroskopi dan mikroskopi <i>A. unguis</i> . A. Koloni pada media SDA. B. Morfologi <i>A. unguis</i> ; konidia (1), konidiofor (2)	80

Gambar 4.3	Pohon filogenetik berdasarkan urutan sekuen gen 18S rRNA jamur IB151 yang diisolasi dari spon laut <i>A. ingens</i> menggunakan metode <i>Neighbor Joining</i> (NJ) dengan bootstrap 1000x.	81
Gambar 4.4	Spektrum Ultra Violet Senyawa IB-01	83
Gambar 4.5	Spektrum LC Senyawa IB-01.....	83
Gambar 4.6	Spektrum LC-MS Senyawa IB-01	84
Gambar 4.7	Spektrum proton ^1H NMR senyawa IB-01	85
Gambar 4.8	Spektrum karbon ^{13}C NMR senyawa IB-01	85
Gambar 4.9	Spektrum HSQC senyawa IB-01.....	87
Gambar 4.10	Spektrum HMBC senyawa IB-01.....	87
Gambar 4.11	Senyawa 2-chlorounguinol.....	89
Gambar 4.12	Spektrum Ultra Violet Senyawa IB-02	89
Gambar 4.13	Spektrum LC-MS Senyawa IB-02	90
Gambar 4.14	Spektrum LC-MS Senyawa IB-02	90
Gambar 4.15	Spektrum proton ^1H NMR senyawa IB-02	91
Gambar 4.16	Spektrum karbon ^{13}C NMR senyawa IB-02	92
Gambar 4.17	Spektrum HSQC senyawa IB-02	93
Gambar 4.18	Spektrum HMBC senyawa IB-02.....	93
Gambar 4.19	Struktur Unguinol.....	95
Gambar 4.20	Spektrum Ultra Violet Nidulin	96
Gambar 4.21	Spektrum Infra Merah Nidulin	96
Gambar 4.22	Spektrum ^1H NMR Nidulin.....	98
Gambar 4.23	Spektrum HSQC Nidulin	98
Gambar 4.24	Spektrum HMBC Nidulin	99
Gambar 4.25	Struktur Senyawa Nidulin	100
Gambar 4.26	Diagram persentasi tingkat penurunan jumlah koloni bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> dengan variasi konsentrasi. Senyawa (A) 2-chlorounguinol (B) unguinol (C) nidulin	102

Gambar 4.27 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> dengan protein target PBP2a. A: (E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) benzoic acid (native ligand), B: 2-chlorounguinol, C: unguinol, D: nidulin	107
Gambar 4.28 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> dengan BlaR1. A: Imipenem (<i>native ligand</i>), B: 2-chlorounguinol, C: unguinol, D: nidulin.....	110
Gambar 4.29 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur <i>A. unguis</i> IB151 dengan MecR1. A: Oxacilin (native ligand), B: 2-chlorounguinol, C: unguinol, D: nidulin .	112
Gambar 4.30 SEM micrograph bakteri MRSA (normal)	116
Gambar 4.31 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian 2-chlorounguinol	117
Gambar 4.32 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian unguinol	117
Gambar 4.33 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian nidulin	118

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Perspektif Kandidat Obat Laut.....	15
Tabel 2.2	Media Tumbuh, Suhu, Masa Inkubasi, dan Ukuran Inokulum yang dipersyaratkan oleh Standar CLSI.....	45
Tabel 2.3	Daftar pita karakteristik IR beberapa gugus fungsional...57	
Tabel 3.1	Pengaturan Program Mesin PCR.....	72
Tabel 4.1	Zona hambatan Ekstrak Etil asetat jamur spons A. ingens terhadap beberapa bakteri patogen.....	78
Tabel 4.2	Aktivitas antituberkulosis terhadap Mycobacterium tuberculosis H37Rv ekstrak jamur turunan dari spons laut A. ingens	78
Tabel 4.3	Data perbandingan pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC Senyawa IB-01 (DMSO-d₆ - 600 MHz) dengan senyawa 2-clorounguinol.....	88
Tabel 4.4	Data perbandingan pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC Senyawa IB-02 (DMSO-d6 - 600 MHz) dengan senyawa unguinol	95
Tabel 4.5	Data Spektrum Infra Merah Nidulin	97
Tabel 4.6	Data Pergeseran Kimia $^{13}\text{C NMR}$, $^1\text{H NMR}$ dan HMBC Senyawa A1 (Nidulin) (600 MHz, DMSO-d6) dan Literatur Nidulin (Sureram et al, 2012)	99
Tabel 4.7	Rata-rata jumlah koloni bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur A. unguis IB151 dengan variasi konsentrasi.....	101
Tabel 4.8	Nilai MIC dan MBC Senyawa-senyawa dari jamur A. unguis terhadap bakteri uji MRSA	102
Tabel 4.9	Informasi makromolekul dan ligan kristalografi	104

Tabel 4.10 Hasil docking ligan/senyawa hasil isolasi jamur A. <i>unguis</i>	105
Tabel 4.11 Interaksi senyawa hasil isolasi jamur A. <i>unguis</i> dengan PBP2a	107
Tabel 4.12 Hasil docking ligan senyawa hasil isolasi jamur A. <i>unguis</i>	109
Tabel 4.13 Interaksi senyawa hasil isolasi jamur A. <i>unguis</i> dengan protein target BlaR1 dan MecR1	112

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Atas penemuan penisilin sebagai antibiotik pertama di dunia, Alexander Fleming menerima Hadiah Nobel di bulan Desember 1945 dalam bidang kedokteran. Saat pidato penerimaan Nobel tersebut, beliau telah menjelaskan fenomena resistensi antibiotik yang tidak dapat dihindari berdasarkan pengamatannya di laboratorium. Dalam pidatonya disampaikan bahwa menjadikan mikroba resisten penisilin tidak sulit. Hanya dengan memberikan penisilin dalam konsentrasi yang tidak cukup untuk membunuhnya, atau dengan mengurangi dosisnya, maka akan membuat bakteri resisten penisilin (A. Flemming, Nobel Lecture, 11 Desember 1945). Prediksi Fleming ternyata terbukti akurat yaitu penggunaan antibiotik yang salah, terkadang penyalahgunaannya dapat mempercepat perkembangan dan penyebaran bakteri menjadi resisten (Terreni *et al.*, 2021).

Belajar dari kasus penisilin sebagai contoh, jika bakteri diberi antibiotik dengan kadar tidak mematikannya, maka mereka menggunakan sebagi suatu sinyal pemicu fungsi pengaturan pertahanan dirinya. Bakteri dapat menghasilkan dan melepaskan enzim β -laktamase, yang bekerja menghidrolisis ikatan amida dari cincin β -laktam, sehingga mengakibatkan cincin terbuka dan inaktivasi antibiotik β -laktam (Terreni *et al.*, 2021).

Resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik telah menjadi masalah besar di seluruh dunia dengan konsekuensi yang serius pada pengobatan penyakit infeksi (Shaikh *et al.*, 2015). Keberadaan bakteri patogen resisten terhadap sebagian besar antibiotik yang tersedia di pasaran telah menyebabkan tingkat kematian akibat penyakit meningkat lebih dari 2 juta per tahun. *Staphylococcus aureus* merupakan organisme yang menyebabkan berbagai infeksi pada manusia dan dapat beradaptasi dengan kemampuan yang dapat menyebabkan resistensi terhadap berbagai antibiotik. Lebih dari 50% kasus *Staphylococcus* di seluruh dunia diketahui disebabkan oleh Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Craft *et al.*, 2019).

Masalah infeksi MRSA telah meningkat di seluruh dunia, terutama di negara-negara Asia. Penyebaran infeksi tersebut dapat melalui kontak langsung

maupun tidak langsung terhadap pasien yang telah dirawat ataupun telah terinfeksi MRSA. Infeksi nosokomial yang disebabkan oleh MRSA di Taiwan juga meningkat dari 26,3% pada tahun 1986 menjadi 77% pada tahun 2001 (Fang *et al.*, 2004). Survei MRSA di India oleh komunitas Surveillance of Antimicrobial Resistance (INSAR) juga melaporkan semakin tinggi tingkat infeksi yang disebabkan oleh MRSA (Kumar *et al.*, 2013). MRSA juga telah diidentifikasi pada hewan (Juhász-Kaszanyitzky *et al.*, 2007) atau terkait dengan produk hewani, seperti babi dan sapi (Tavakol *et al.*, 2012).

Antibiotik β -laktam merupakan obat yang paling umum digunakan dalam pengobatan berbagai infeksi bakteri, tetapi sebagian besar diantaranya tidak lagi efektif dalam mengobati infeksi MRSA. Hal ini disebabkan karena adanya mekanisme resistensi yang spesifik dikembangkan MRSA sendiri terhadap antibiotik β -laktam (Jia *et al.*, 2009). Resistensi antibiotik β -laktam terjadi karena perubahan atau mutasi gen penyandi protein (*Penisillin binding protein*, PBP) yang bertanggung jawab pada biosintesis peptidoglikan dan sintesis dinding sel. Pengikatan dapat menyebabkan penghambatan sintesis dinding sel bakteri sehingga sel mengalami lisis. Adanya perubahan PBP2 menjadi PBP2a yang dikode oleh gen *mecA* mengakibatkan afinitas ikatan terhadap β -laktam berubah dan menjadi rendah, akibatnya bakteri tetap hidup karena sintesis dinding sel masih dapat berlangsung (Pantosti, Sanchini and Monaco, 2007).

Gen *mecA* merupakan bagian elemen *Staphylococcus cassette mec* (SCCmec) yang ditemukan pada semua strain MRSA. Ekspresi resistensi pada beberapa galur MRSA diatur oleh homolog dari gen pengatur. Gen pengatur tersebut berupa gen *mecI* dan *mecR1* yang berfungsi mengatur respon *mecA* terhadap antibiotik β -laktam (Hiramatsu *et al.*, 1992; Arêde *et al.*, 2012). Gen *mecR1* dan *mecI* masing-masing mengkodekan protein MecR1 dan Mecl (Sharma *et al.*, 1998). MecR1 dan Mecl masing-masing memiliki homologi sekuen protein tinggi dengan protein *blaR1* dan *blaI*. Gen pengkode *blaR1* dan *blaI* merupakan gen regulator yang masing-masing terlibat dalam ekspresi yang diinduksi dari gen β -laktamase (*blaZ*) pada plasmid *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2001). Gen *blaZ* memiliki struktur dan mekanisme yang serupa dengan gen *mecA* (Song *et al.*, 1987). Wilayah operator cukup mirip untuk memungkinkan *BlaI* untuk mengatur ekspresi PBP2a (Gregory *et al.*, 1997). Akibatnya, kehadiran plasmid yang membawa gen pengatur *blaZ* dapat membuat ekspresi PBP2a diinduksi di bawah kendali *BlaR1* dan *BlaI*, sebuah situasi yang umumnya terjadi pada isolat klinis MRSA (Hackbarth and Chambers, 1993). Protein ini dengan demikian bertindak sebagai peralatan efektif pada bakteri yang super untuk mencegah serangan dari antibiotik β -laktam.

Banyak peneliti di seluruh dunia saat ini telah melakukan usaha penemuan dan pengembangan molekul baru antibakteri yang digunakan untuk

mengendalikan bakteri resisten (Hu *et al.*, 2015). Dengan adanya ketersediaan urutan protein yang diprediksi dari beberapa strain genome MRSA, struktur protein yang ditentukan secara eksperimen, alat bioinformatika untuk mengidentifikasi protein homolog, protein yang berinteraksi, program komputer untuk pemodelan protein struktur tiga dimensi dan *docking* senyawa kimia molekul kecil, maka usaha untuk memprediksi target obat dan menemukan obat baru yang potensial menjadi lebih mudah (Sridhar, Fakhraei and Getoor, 2016). Mengidentifikasi target protein untuk ligan/senyawa yang ditemukan juga merupakan aspek penting dari penemuan obat (Ji *et al.*, 2009). Hasil penelitian Kimia Bahan Alam Kelautan menunjukkan bahwa metabolit sekunder alami dari laut berperan penting dalam penemuan senyawa baru untuk pengembangan obat. Invertebrata laut dan mikroba, terutama spons laut, jamur dan aktinobakteria, merupakan produsen alami laut yang paling melimpah sebagai penghasil senyawa alami yang aktif melawan bakteri patogen yang resistan (Kersten and Dorresteijn, 2009).

Spons merupakan salah satu biota laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia termasuk perairan Pulau Mandeh, Sumatera Barat. Proses interaksi antara spons dan mikroba simbionnya belum sepenuhnya diketahui. Beberapa teori mengemukakan bahwa proses rekrutmen mikroba simbion dilakukan spons pada saat proses *filter feeder*, dan masuk ke dalam *mesophyl*. Selain itu, beberapa penelitian juga melaporkan mikroba episimbion melekat pada bagian permukaan spon selama masa pertumbuhan (Chelossi *et al.*, 2004). Beberapa bakteri dan jamur juga diwariskan secara genetis dalam tubuh spons (Maldonado *et al.*, 2005). Mikroba simbion spons, selain berperan dalam produksi senyawa bioaktif, juga memiliki peran menjaga kestabilan pertumbuhan dan kesehatan spons. Simbion-simbion tersebut memiliki peran penting dalam penyediaan energi dan nutrisi serta sebagai pelindung terhadap radiasi sinar ultraviolet dan penghasil enzim antioksidan (Steindler *et al.*, 2005).

Penelitian lain menunjukkan bahwa mikroba simbion memiliki peranan dalam produksi senyawa bioaktif yang berfungsi dalam adaptasi ekologi spons (Proksch *et al.*, 2003; Thakur and Müller, 2004; Zheng *et al.*, 2005). Sebagian besar spons mengandung mikroba simbion dalam jumlah besar termasuk jamur. Jamur yang bersimbiosis dengan spons merupakan produsen senyawa bioaktif yang berperan penting dalam penghambat aktivitas mikroorganisme penyebab penyakit infeksi pada manusia (Rozas *et al.*, 2017). Handayani dan Aminah 2017 telah melakukan isolasi jamur dari spons laut *Acanthostrongylophora ingens* dan menskrining aktifitas antibakteri yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidemidis*, *Salmonella typosa* dan *Escherichia coli*. Berdasarkan hasil penelitian ini telah ditemukan jamur

Aspergillus unguis IB151 yang memiliki potensi dalam menghasilkan senyawa antibakteri.

Dalam buku ini dipaparkan bagaimana mengisolasi, karakterisasi serta menentukan potensi senyawa antibakteri dari *Aspergillus unguis* IB151. Isolasi senyawa antibakteri dilakukan menggunakan metode kromatografi. Karakterisasi senyawa antibakteri dilakukan menggunakan metode spektroskopi ultraviolet, infra merah, resonansi magnetik inti dan spektroskopi massa. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan secara *in vitro* dan serta mempelajari mekanisme aktivitasnya terhadap MRSA melalui kajian molekuler (*in silico*).

1.2. Perumusan Masalah

Berdasarkan hasil isolasi jamur dari spons laut diatas, dan hasil skrining aktivitas antibakteri ekstrak jamur serta studi literatur maka rumusan masalah tulisan ini sebagai berikut:

1. Apakah jamur *Aspergillus unguis* IB151 dari spons laut *Acanthostrongylophora ingens* dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA?
2. Bagaimana pengaruh senyawa bioaktif yang diisolasi dari jamur dan *Aspergillus unguis* IB151 terhadap pertumbuhan bakteri MRSA dengan menentukan *Minimum Inhibitor Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacteriocidal Concentration* (MBC)?
3. Bagaimana interaksi yang terjadi antara molekul senyawa yang diisolasi dari jamur *Aspergillus unguis* IB151 dengan sisi aktif protein target MRSA secara *in silico*?
4. Bagaimana mekanisme aktivitas senyawa yang diisolasi dari jamur *Aspergillus unguis* IB151 terhadap MRSA?

1.3. Tujuan

Tulisan ini bertujuan memberikan informasi tentang metode penemuan dan penentuan potensi senyawa antibakteri dari jamur *Aspergillus unguis* IB151 yang berasal dari spons laut *A. ingens* secara *in vitro*, dan mekanisme aktivitas penghambatan terhadap bakteri MRSA.

1.4. Manfaat Kajian

Melalui tulisan diharapkan kandungan metabolit sekunder potensial jamur *Aspergillus unguis* IB151 dari spons *A. ingens* dapat dikembangkan menjadi kandidat obat anti-MRSA baru yang lebih aman dan efektif.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Etnobotani dan Obat Tradisional

Secara historis, umat manusia telah tertarik dengan kekuatan dan potensi tumbuhan di alam. Teks-teks kuno membuktikan perkembangan pengetahuan yang diturunkan dari generasi ke generasi tentang hal-hal menguntungkan dari tanaman. Pengetahuan tentang cara mengekstrak bahan-bahan alami sebagai makanan, obat-obatan, dan penambah suasana hati berkembang jauh sebelum kita mengetahui cara kerja bahan kimia itu sendiri. Pada masa Renaisans dan melalui masa Reformasi, baru ditemukan alat-alat untuk mengeksplorasi senyawa kimia bahan alam.

Saat ini, kita merangkul ilmu etnobotani, yang merupakan studi ilmiah tentang hubungan yang ada antara manusia dan tumbuhan. Disiplin ilmu ini membutuhkan berbagai keterampilan, seperti: botani (identifikasi dan pelestarian spesimen tanaman); antropologi (untuk memahami konsep budaya seputar persepsi tumbuhan) dan kimia bahan alam. Sebagai sumber produk kesehatan, sebagian besar penduduk di dunia masih sangat bergantung pada pengobatan herbal untuk perawatan kesehatan utama.

Peradaban kuno Cina dan India telah menghasilkan banyak pengetahuan tentang penggunaan obat-obatan tradisional. Pengobatan Tradisional Cina (TCM) telah digunakan selama ribuan tahun. Dasar dan filosofi TCM yang berpusat pada *qi* tidak dipahami dengan baik dalam praktik Barat. Umumnya formula TCM adalah campuran herbal, digunakan dalam kombinasi dan disajikan sebagai teh. Ada juga penggunaan berbagai jamur sebagai obat. Salah satu contohnya adalah jamur *Ganoderma lucidum*, yang dikenal juga sebagai *Reishi* dan *Ling Zhi*, yang telah digunakan dalam TCM selama ribuan tahun sebagai tonik herbal.

Pengobatan Ayurveda digunakan di India. Ayurveda menekankan penggunaan obat-obatan dan perawatan herbal. Ratusan obat herbal digunakan, termasuk dua rempah yang umum digunakan: kapulaga dan kayu manis.

Obat Kampo digunakan di Jepang dan sebagian besar asalnya berasal dari formula TCM. Mereka juga sangat menghormati jamur obat mereka. Contohnya adalah jamur *Agaricus blazei*, obat yang sangat populer yang digunakan oleh hampir 500.000 orang, terutama oleh pasien kanker. Obat kedua yang paling banyak digunakan berasal dari jamur lain, isolat dari jamur shiitake (*Lentinula edodes*).

Afrika diberkahi dengan banyak tanaman penyembuhan tradisional yang dapat digunakan untuk tujuan pengobatan. Dari sekitar 6400 spesies tanaman yang digunakan di Afrika tropis, lebih dari 4000 digunakan sebagai tanaman obat. Contohnya *pygeum* (*Prunus africana*) untuk meningkatkan buang air kecil dan mengurangi peradangan serta menurunkan timbunan kolesterol. Kulit kayunya dijadikan teh. Dalam praktik tradisional Afrika, *Momordica balsamina* dikenal dapat menurunkan kadar glukosa darah.

Penduduk asli Amerika juga memiliki sejarah panjang penggunaan obat-obatan tradisional. Mereka menggunakan sage, yang dipercaya dapat menyembuhkan berbagai masalah pada sistem pencernaan. Obat untuk pilek termasuk ginseng Amerika; herbal untuk sakit dan nyeri termasuk Pennyroyal dan hop; dan dogwood dan kulit pohon willow adalah obat untuk demam (Cooper and Nicola, 2015).

2.2. Penemuan Obat Alami dan Statusnya Saat Ini

Senyawa kimia bahan alam adalah senyawa kimia yang berasal dari mahluk hidup, seperti tumbuhan, hewan, serangga, dan mikroorganisme yang banyak digunakan untuk mengobati penyakit. Tumbuhan dan mikroba menghasilkan zat bioaktif yang unik, menyediakan akses ke berbagai jenis senyawa model. Senyawa kimia bahan alam telah lama menjadi sumber obat-obatan tradisional, dan saat ini masih dianggap sebagai *supplier* terbaik yang berperan sebagai senyawa model (*lead structure*) potensial, dengan jumlah lebih dari satu juta kimia baru yang ditemukan hingga saat ini (Carter, 2011; Dias et al. 2012). Lebih dari 60% obat yang beredar di pasaran berasal dari bahan alam (Molinari, 2009).

Senyawa kimia bahan alam sangat beragam dan sering memberikan aktivitas biologis yang sangat spesifik, yang telah menjadi dasar pengobatan penyakit manusia dan sumber utama obat baru. Banyak obat yang sukses di pasaran saat ini disintesis untuk meniru aksi molekul yang awalnya ditemukan di alam (Feher dan Schmidt, 2003). Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) memperkirakan pada tahun 1985, sekitar 65% penduduk dunia sebagian besar mengandalkan obat tradisional yang berasal dari tumbuhan untuk perawatan kesehatan utama mereka (Farnsworth et al., 1985).

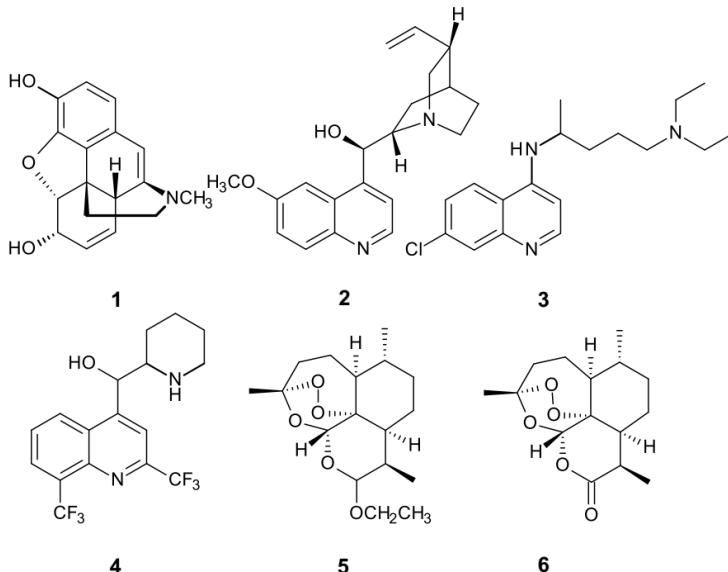
Selain itu, senyawa kimia bahan alam adalah bagian terpenting dari armamentarium untuk agen antikanker dan antiinfeksi. Lebih dari 60% kandidat aplikasi obat (*New Drug Application/NDA*) yang disetujui dan pra-baru adalah produk alami atau derivat terkait dengannya, tidak termasuk produk biologis seperti vaksin dan antibodi monoklonal (Cragg *et al.*, 1997). Sejumlah senyawa metabolit alami telah mencapai pasar tanpa modifikasi kimia, hal ini merupakan bukti kemampuan mikroorganisme yang luar biasa untuk menghasilkan molekul kecil seperti obat (Zhang dan Demain, 2005). Di era penemuan obat modern ada tiga sumber utama senyawa baru: produk alami asli, senyawa yang diturunkan secara semi-sintetis dari produk alam dan senyawa sintetis kombinatorial berdasarkan model produk alami (Cragg *et al.*, 1997; Feher dan Schmidt, 2003; Newman *et al.*, 2003).

Sebagian besar penelitian senyawa kimia bahan alam dilakukan karena beberapa alasan seperti; (i) Kebutuhan obat yang tidak terpenuhi, (ii) Keragaman struktur kimia dan bioaktivitas yang luar biasa, (iii) Utilitas sebagai probe biokimia, (iv) Metode pengujian baru dan sensitive, (v) Perbaikan dalam proses isolasi, pemurnian dan karakterisasi, dan (vi) Metode produksi baru (Clark, 1996).

Metabolit alami adalah sumber model obat yang paling sukses dan terus memberikan keragaman struktural yang lebih besar daripada kimia kombinasi standar, dan peluang besar untuk menemukan molekul obat baru. Di bidang penemuan obat modern, senyawa model akan terus menjadi penting sebagai target untuk pengembangan dan produksi obat dengan pendekatan bioteknologi, sumber senyawa model dari struktur kimia baru, dan sebagai bahan aktif pengobatan yang berguna, yang berasal dari sistem pengobatan tradisional (Harvey, 1993).

Senyawa kimia bahan alam banyak yang telah menjadi kandidat obat saat ini (Dias *et al.*, 2012). Keberadaannya telah berkontribusi untuk mengidentifikasi dan memahami jalur kimia baru dan terbukti tidak hanya menyediakan obat-obatan yang berharga tetapi juga alat penting dalam biokimia dan biologi sel molekuler (Grabley dan Sattler, 2003). Senyawa kimia alami banyak berperan sebagai obat yang efektif. Contoh sejarah dari senyawa obat alami yang pertama diidentifikasi adalah morfin. Saat ini morfin merupakan obat komersial penting (1) dari *Papaver somniferum* L. (opium poppy), pertama kali dilaporkan pada tahun 1803 (Benyhe 1994; Der Marderosian dan Beutler, 2002). Contoh penting lainnya adalah obat antimalaria, kina (2) yang menjadi dasar untuk sintesis obat antimalaria yang saat ini umumnya digunakan; klorokuin (3) dan meflokuin (4) (Gambar 2.1). Senyawa tersebut awalnya diisolasi pada tahun 1820 oleh seorang Apoteker dari Prancis; Caventou dan Pelletier dari kulit *Cinchona succirubra* Pav. ex Klotsh, yang telah digunakan selama berabad-abad untuk pengobatan

malaria, demam, gangguan pencernaan, penyakit mulut dan tenggorokan dan kanker (Kremsner *et al.*, 1994). Arteether (**5**) diperkenalkan pada tahun 2000 sebagai Artemotil® berasal dari artemisinin (**6**) (diperkenalkan pada tahun 1987 sebagai Artesmisinin) yang diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* dan keduanya merupakan obat antimalaria saat ini (Newman dan Cragg, 2007).

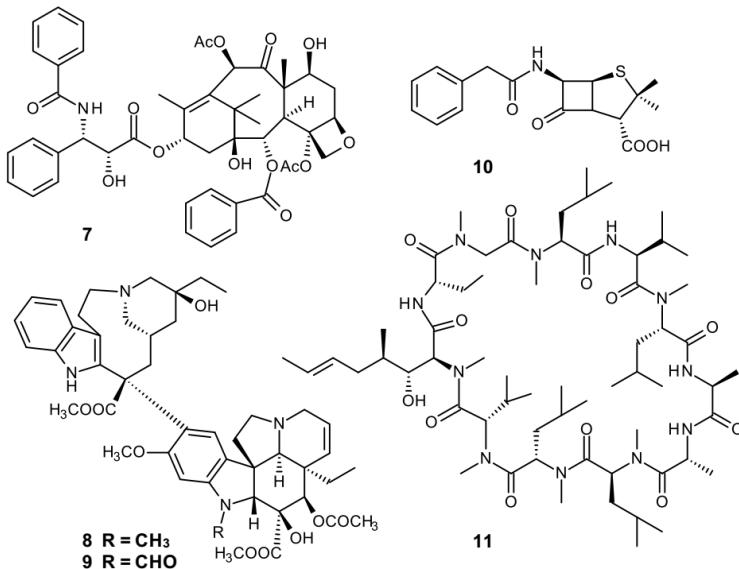


Gambar 2.1 Struktur morfin (**1**), kina (**2**), klorokuin (**3**), meflokui (**4**), arteether (**5**) dan artemisinin (**6**)

Contoh lain adalah paclitaxel (Taxol®) (**7**) yang awalnya diisolasi dari kulit pohon yew Pacific; *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), dikumpulkan di Negara Bagian Washington sebagai bagian dari program pengumpulan acak NCI oleh Departemen Pertanian AS (USDA) (Cragg, 1998; Wani *et al.*, 1971). Struktur paclitaxel diketahui pada tahun 1971 dan secara klinis diperkenalkan ke pasar AS pada awal 1990-an. Senyawa ini secara signifikan aktif terbukti dapat melawan kanker ovarium, kanker payudara stadium lanjut, kanker paru-paru sel kecil dan non-kecil (Rowinsky *et al.*, 1992). Contoh lain dari obat antikanker yang berasal dari tumbuhan adalah alkaloid bis-indole vinblastine (VLB) (**8**) dan vincristine (VCR) (**9**), yang diisolasi dari tanaman periwinkle Madagaskar; *Catharanthus roseus*. Vinblastine (VLB) dan vincristine (VRE) terutama digunakan dalam kombinasi dengan obat kemoterapi kanker lainnya untuk pengobatan berbagai jenis kanker seperti leukemia, limfoma, testis, kanker payudara, paru-paru, dan sarkoma Kaposi (Cragg dan Newman, 2005b).

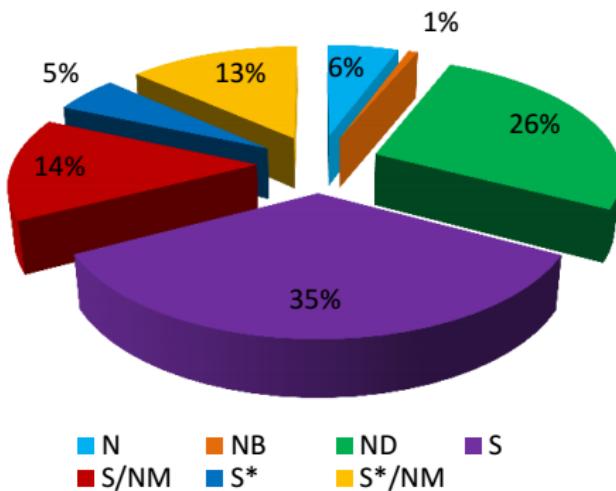
Di antara sumber-sumber alam, potensi mikroorganisme dalam penemuan obat baru-baru ini telah dimanfaatkan. Banyak obat-obatan terutama antibiotik berasal dari mikroorganisme. Penisilin, antibiotik pertama yang ditemukan dari jamur *Penicillium notatum* pada tahun 1928 oleh Alexander Fleming. Satu decade kemudian, obat ini diproduksi dan dikomersialisasi. Pada tahun 1940, merupakan awal revolusi besar dalam penemuan dan penelitian obat yang dikenal sebagai "Zaman Keemasan Antibiotik".

Penisilin G (**10**) pertama kali digunakan dalam skala besar selama Perang Dunia II untuk mengobati tentara yang terluka di medan perang dalam mencegah infeksi (Hussain *et al.*, 2014). Siklosporin (siklosporin A, CsA) (**11**) adalah senyawa golongan *undecapeptide* siklik yang mengandung asam amino baru bersama dengan beberapa asam amino N-metilasi (Petcher *et al.*, 1976; Rüegger *et al.*, 1976; Zhou *et al.*, 2009). Senyawa tersebut ditemukan dari jamur *Tolypocladium inflatum* pada tahun 1970 (Kobel dan Traber, 1982). Siklosporin memiliki kemampuan imunosupresif yang efektif dalam transplantasi organ dan berhasil dipasarkan sebagai obat imunosupresan (Borel *et al.*, 1977). Selain itu, siklosporin terbukti efektif sebagai anti-inflamasi, antijamur, dan antiparasit, serta potensial terhadap beberapa jenis kanker yang resisten (Sallam *et al.*, 2005). Semua senyawa atau turunan obat tersebut masih digunakan sebagai obat hingga saat ini (Butler, 2004). Pada tahun 2019, siklosporin adalah obat yang paling sering diresepkan di Amerika Serikat (ClinCalc., 2021).



Gambar 2.2 Struktur paclitaxel (Taxol®) (7), vinblastine (VLB) (8), vincristine (VCR) (9), penisilin G (10) dan siklosporin (siklosporin A, CsA) (11)

Pada tahun 2016, Newman dan Cragg melaporkan bahwa 77,5% dari senyawa entitas kimia baru (*New Chemical Entity; NCE*) yang ditemukan dari tahun 1981 hingga 2014 terinspirasi dari senyawa kimia bahan alam (Gambar 2.3). Ini termasuk: 6% produk alami (N), 26% produk alami modifikasi semi-sintetik (ND), 5% senyawa sintetis total berdasarkan farmakofor produk alami (S*), dan 27% produk alami sintetis/semisintetik (S*/NM dan S/NM). Selain itu, lebih dari 73% antibakteri dan 83% antikanker ditemukan didasarkan pada, atau berasal dari produk alami (Newman dan Cragg, 2016). Hingga saat ini, banyak obat terlaris dengan bidang terapi seperti antibakteri, antijamur, antiparasit, antikoagulan, imunosupresan dan antikanker berasal dari senyawa kimia bahan alam (Newman dan Cragg, 2007).



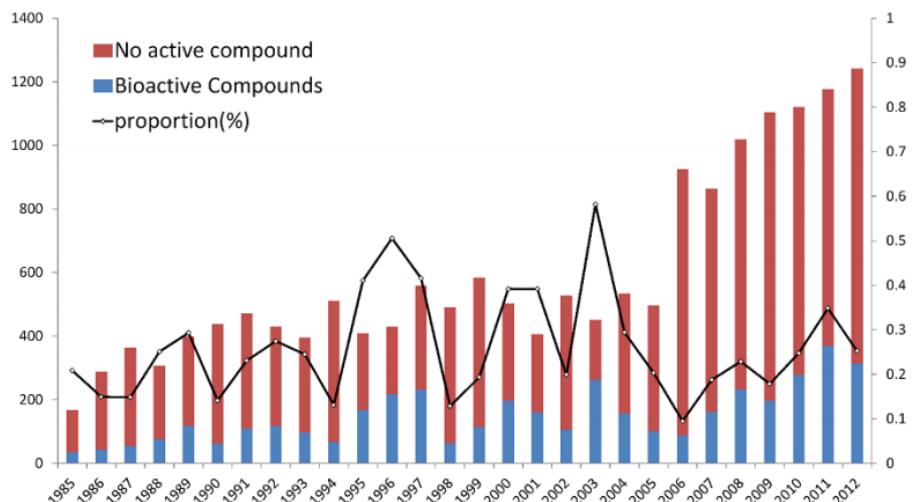
Gambar 2.3 Entitas senyawa kimia baru dari 1981 hingga 2014
(Newman dan Cragg, 2016)

2.3. Status Penelitian Senyawa Kimia Bahan Alam Kelautan Saat Ini

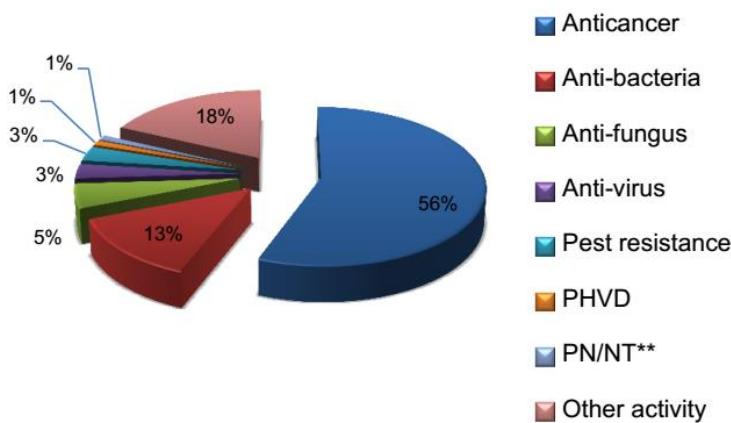
Lebih dari 22.000 metabolit sekunder yang beragam secara struktural telah diisolasi dan dikarakterisasi dari berbagai organisme laut yang berbeda selama lima puluh tahun terakhir (Blunt *et al.*, 2013; Gerwick dan Fenner, 2013; Hill, 2013; Hu *et al.*, 2011). Di lingkungan laut, di mana transkriptom, proteasom, dan metabolism berbeda memungkinkan organisme untuk bertahan hidup, sehingga muncul spekulasi bahwa metabolit sekunder yang berbeda diduga

merupakan hasil dari keadaan khusus untuk beradaptasi dengan lingkungan yang ekstrem (Firn dan Jones, 2000).

Hampir semua bentuk kehidupan di laut telah diselidiki kandungan metabolit sekundernya, dan merupakan sumber senyawa baru yang berharga dengan potensi besar untuk obat-obatan, suplemen, nutrisi, kosmetik, bahan kimia pertanian dan enzim, banyak di antaranya memiliki potensi nilai pasar yang besar. (Blunt *et al.*, 2013; Kijjoa dan Sawangwong, 2004). Sebelum tahun 1980-an, hasil alam laut yang ditemukan setiap tahun kurang dari 100, namun jumlah senyawa laut baru meningkat pesat setelah tahun 1985, dan kemudian stabil sekitar 500 per tahun pada akhir tahun 1990-an (Hu *et al.*, 2015a). Gambar 2.4 menunjukkan variasi jumlah hasil senyawa kimia bahan alam laut baru yang diisolasi dari tahun 1985-2012 serta proporsi senyawa bioaktif dan nonaktif untuk setiap tahun. Penulis yang sama juga telah merangkum pada Gambar 2.5 bioaktivitas senyawa kimia bahan alam laut baru yang diisolasi selama periode ini menjadi beberapa kelompok. Salah satu hal yang menarik dari data tersebut adalah, senyawa dengan aktivitas antikanker merupakan kelompok utama (56%), diikuti oleh antibakteri (13%) dan antijamur (5%). Selain itu, senyawa kimia bahan alam laut baru, meskipun dalam persentase kecil, juga ditemukan memiliki aktivitas lain seperti, antivirus, pestisida, pencegahan penyakit kepala dan pembuluh darah, dan perlindungan neuron/neurotoksisitas (Hu *et al.*, 2015a).



Gambar 2.4 Variasi jumlah senyawa kimia bahan alam laut baru pada tahun 1985-2012 (Hu *et al.*, 2015a)



Gambar 2.5 Bioaktivitas Senyawa Kimia Bahan Alam Kelautan (*PHVD: Prevention of head and vascular disease, **PN/NT: Protection of neurons/ neurotoxicity)
(Hu *et al.*, 2015a)

Meskipun persentase metabolit sekunder bahan alam laut yang dapat dikembangkan menjadi obat masih rendah sejauh ini, namun terdapat tanda-tanda bahwa senyawa bioaktif laut yang disetujui untuk pengobatan penyakit manusia cenderung semakin banyak (Haefner, 2003; Liu *et al.*, 2012; Nastrucci *et al.*, 2012). Untuk mencapai tujuan ini, pendekatan penelitian yang melibatkan keahlian interdisipliner dan manipulasi inovatif sangat dibutuhkan untuk meningkatkan kajian bioaktivitas obat baru. Produk alami laut menunjukkan berbagai aktivitas biologis, dan berperan penting dalam penemuan pengembangan obat penyakit manusia (Newman dan Cragg, 2012). Kajian tentang senyawa kimia bahan alam laut telah menjadi subdisiplin ilmu kimia bahan alami (Faulkner, 2000a). Berdasarkan potensi bioaktivitas seperti anti-tumor, anti-mikrotubulus, anti-proliferasi, fotoprotektif, antibiotik dan anti-infeksi, senyawa kimia bahan alam laut bernilai ekonomi tinggi, yang menarik untuk dikembangkan dalam industri farmasi, sehingga semakin banyak perusahaan farmasi berinvestasi di bidang ini (Berdy, 2005; Mishra dan Tiwari, 2011; Molinski *et al.*, 2009; Pettit *et al.*, 1982; Schumacher *et al.*, 2011; Sudek *et al.*, 2007).

Sekitar 30.000 produk alami yang beragam secara struktural dengan beragam bioaktivitas, telah ditemukan dari organisme laut termasuk mikroba, alga, dan invertebrata (Radjasa *et al.*, 2011; Salomon *et al.*, 2004) dan saat ini

tersedia obat komersial untuk berbagai pengobatan (Cragg dan Newman, 2005a; Li dan Vederas, 2009). Bahkan, beberapa penelitian melaporkan bahwa organisme laut menyediakan lebih banyak produk alami bioaktif daripada organisme darat. Mengenai produk alam laut, menarik untuk memverifikasi bahwa sebagian besar minat telah diarahkan ke organisme laut dari daerah beriklim sedang dan tropis, sementara organisme kutub masih belum banyak dieksplorasi (Avila *et al.*, 2008; Blunt *et al.*, 2014; Lebar *et al.*, 2007).

Mayoritas senyawa baru dari organisme laut, sekitar 75% diisolasi dari invertebrata terutama dari filum Porifera (spons) tetapi juga dari Coelenterate (kebanyakan karang). Selain itu, alga dan mikroorganisme juga merupakan sumber utama metabolit sekunder baru (Hu *et al.*, 2011). Di antara mikroorganisme laut, jamur telah memperoleh peran penting sebagai sumber metabolit sekunder baru bioaktif sebagai antitumor, antibakteri, antivirus, antijamur, antiinflamasi, dan antikanker serta inhibitor enzim (Gamal-Eldeen *et al.*, 2009; Samuel *et al.*, 2017).

2.4. Obat dan Kandidat Obat dari Laut

Organisme laut memproduksi beragam metabolit sekunder seperti poliketida, alkaloid, peptida, protein, lipid, glikosida, isoprenoid, dan turunannya (Mayer *et al.*, 2011; Rateb dan Ebel, 2011). Metabolit alami laut yang pertama kali ditemukan berasal dari spon laut, yaitu arabinosil nukleosida, spongouridine dan spongothymidine. Kedua nukleosida tersebut secara resmi dilaporkan pada awal 1950 dari spon *Tethya crypta* asal Karibia oleh Bergmann (Bergmann dan Stempien Jr, 1957).

Pada akhir tahun 1970, ditetapkan bahwa tumbuhan dan hewan laut secara genetik dan biologis unik. Sekitar 15.000 senyawa kimia bahan alam telah dideskripsikan dan diantaranya 30% berasal dari spon (Murti dan Agrawal, 2010). Pada periode 1981 hingga 2008, sekitar 68% dari semua obat yang digunakan untuk mengatasi infeksi, senyawa antibakteri, antivirus, antiparasit dan antijamur dan 63% obat antikanker berasal dari alam (Cragg *et al.*, 2009).

Saat ini, ada 13 senyawa turunan laut dalam jajaran klinis yang berada pada tahap uji klinis yang berbeda, sebagian besar senyawa turunan laut dalam jalur pengujian praklinis juga. Tiga obat turunan laut yang disetujui oleh *Food and Drug Administration* (FDA) yang saat ini digunakan di Amerika Serikat adalah cytarabine (Cytosar-UW, DepocytW), vidarabine (Vira-AW), dan ziconotide (PrialtW).

Tabel 2.1 menunjukkan senyawa turunan laut yang telah disetujui oleh FDA (Mayer *et al.*, 2010). Trabectedin (Yondelis®, ET-743) (**12**) (Gambar 2.6) adalah alkaloid tetrahydroisoquinoline, awalnya diisolasi dari koloni *Ecteinascidia tunicata*. Senyawa ini adalah agen antikanker pertama yang

disetujui di Uni Eropa untuk pengobatan sarkoma jaringan lunak dan dalam kasus kambuhan kanker ovarium sensitif platinum (Verweij, 2009; Yap *et al.*, 2009).

Brentuximab vedotin 63 (Adcetris®) (**13**) (Gambar 2.6) adalah agen antikanker yang didasarkan pada analog molekul dolastatin 10 yang sepenuhnya sintetis. Dolastatin 10 diisolasi pada tahun 1972 dari keong laut *Dolabella auricularia* (Pettit *et al.*, 1987). Saat ini obat laut yang berhasil masuk ke pasar dan disetujui untuk pengobatan Hodgkin dan limfoma sel besar anaplastik sistemik (Firsova *et al.*, 2017).

Eribulin mesylate (Halaven®) (**14**) (Gambar 2.6) adalah agen target mikrotubulus dari laut yang merupakan analog sintetis halichondrin B yang disederhanakan secara structural, yang awalnya diisolasi untuk pertama kalinya pada tahun 1986 dari spons laut *Halichondria okadai* dan ditemukan menjadi sangat sitotoksik dalam sel leukemia murine. Senyawa ini telah disetujui oleh FDA pada tahun 2010 dan EMEA pada tahun 2011, untuk mengatasi kanker payudara metastatik (Dumontet dan Jordan, 2010; Huyck *et al.*, 2011).

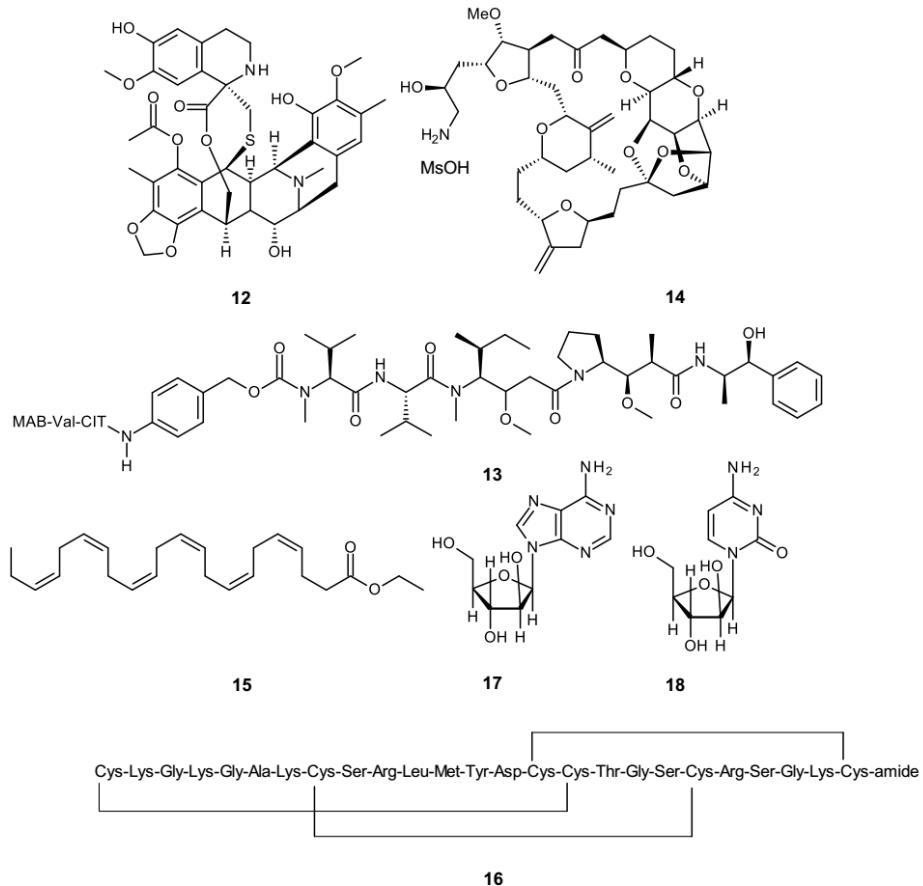
Lovaza® (sebelumnya dikenal sebagai omacor) (**15**) (Gambar 2.6) adalah nama merek untuk obat anti-hipertrigliseridemia yang terdiri dari etil ester beberapa asam lemak omega-3 yang diisolasi dari minyak ikan. Asam lemak omega-3 yang berasal dari laut terbukti menurunkan trigliserida dan kolesterol berdensitas rendah serta meningkatkan kolesterol berdensitas tinggi dalam darah dan bersifat terapeutik bila dikombinasikan dengan diet dan statin (Pettit *et al.*, 1987).

Ziconotide (Prialt®) (**16**) (Gambar 2.6) adalah versi sintetis dari conotoxin, peptida alami yang diisolasi dari siput kerucut *Conus magus*. Senyawa ini adalah obat analgesik intratekal pertama yang disetujui setelah morfin, menerima persetujuan FDA pada tahun 2004 dan persetujuan EMEA pada tahun 2005 dan saat ini diberi label untuk pengelolaan pasien nyeri kronis dan parah penderita kanker atau AIDS (Rauck *et al.*, 2009; Staats *et al.*, 2004).

Vidarabine (arabinofuranosyladenine atau adenine arabinoside, Ara-A) (**17**) (Gambar 2.6) adalah nukleosida purin sintetis yang dikembangkan dari spongouridine, pertama kali diisolasi dari spons Karibia *Tethya crypta* (Newman *et al.*, 2009). Spongouridine saat ini diperoleh dari fermentasi antibiotik *Streptomyces* (Hong *et al.*, 1986). Senyawa ini disetujui oleh FDA untuk digunakan pada keratitis epitel berulang yang disebabkan oleh virus *Herpes simpleks* tipe 1 dan 2, kerato-konjungtivitis akut, dan juga untuk keratitis superfisial (Mayer *et al.*, 2010).

Sitarabin (arabinosyl cytosine atau cytosine arabinoside, Ara-C) (**18**) (Gambar 2.6) merupakan senyawa antikanker turunan laut yang merupakan nukleosida pirimidin sintetis yang dikembangkan dari spongothymidine yang

pertama kali diisolasi dari spons Karibia *Tethya crypta* (Newman *et al.*, 2009). Senyawa ini disetujui pada tahun 1969 dan terutama digunakan dalam berbagai jenis leukemia, termasuk leukemia myelocytic akut, leukemia limfositik, leukemia meningeal dan fase krisis ledakan leukemia myelogenous kronis (Absalon dan Smith, 2009; Thomas, 2009).



Gambar 2.6 Struktur trabectedin (ET-743) (**12**), brentuximab vedotin (SGN-35) (**13**), eribulin mesylate (E7389) (**14**), asam lemak omega-3 etil ester (**15**), ziconotide (**16**), vidarabine (Ara-A) (**17**) dan sitarabin (Ara-C) (**18**)

Tabel 2.1 Perspektif Kandidat Obat Laut
(<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>)

Clinical status	Compound name	Marine organism	Chemical class	Disease area
FDA Approved	Trabectedin (ET-743)	Tunicate	Alkaloid	Cancer
	Brentuximab vedotin (SGN-35)	Mollusk/ cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer, lymphoma
	Eribulin mesylate (E7389)	Sponge	Macrolide	Breast cancer
	Omega-3-fatty acid ethyl esters	Fish	Omega-3-fatty acid	Hypertriglyceridemia
	Ziconotide	Cone snail	Peptide	Pain
	Vidarabine (Ara-A)	Sponge	Nucleoside	Anti-viral
	Cytarabine (Ara-C)	Sponge	Nucleoside	Cancer
Phase III	Pinabulin (NPI-2358)	Fungus	Diketopiperazine	Cancer
	Plitidepsin	Tunicate	Depsipeptide	Cancer
	Squalamine lactate	Dogfish Shark	Aminosterol	Neovascular Diseases
	Tetrodotoxin	Pufferfish	Guanidinium alkaloid	Chronic pain
	Glembatumumab vedotin	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Chronic pain

Clinical status	Compound name	Marine organism	Chemical class	Disease area
Phase II	ABT-414 EGFRvIII-MMAF	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAF)	Cancer
	DMXBA (GTS-21)	Worm	Alkaloid	Schizophrenia, Alzheimer Disease, Attention Deficit Hyperactivity Disorder, Endotoxemia, Sepsis, Vagal Activity
	SGN-CD19A	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAF)	Cancer
	Lurbinectedin (PMO1183)	Tunicate	Alkaloid	Cancer
	AGS-16C3F	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAF)	Cancer
	Lifastuzumab vedotin (DNIB0600A)	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAF)	Cancer
	Pinatuzumab vedotin (DCDT-2980S)	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Non-Hodgkin Lymphoma, chronic lymphocytic leukemia
	Polatuzumab vedotin (DCDS-4501A)	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer

Clinical status	Compound name	Marine organism	Chemical class	Disease area
Phase I	GSK2857916	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAF)	Cancer
	ABBV-085	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	ABBV-399	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	ABBV-221	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	ABBV-838	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	ASG-67E	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	ASG-15ME	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	Enfortumab Vedotin ASG-22ME	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	Bryostatin	Bryozoa	Macrolide lactone	Cancer
	Tisotumab Vedotin	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	Marizomib (Salinosporamide A; NPI-0052)	Bacterium	Beta-lactone-gamma lactam	Cancer
	MLN-0264	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer
	PM060184	Sponge	Polyketide	Cancer
	SGN-LIV1A	Mollusk/cyanobacterium	ADC (MMAE)	Cancer

ADC: Antibody Drug Conjugate; Ara-A: 9-β-D-arabinofuranosyladenine; Ara-C: Cytosine Arabinoside; DMXBA: 3-(2, 4-Dimethoxybenzylidene)-Anabaseine; ET: Ecteinascidin; EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor; MMAE: Monomethylauristatin E; MMAF: Monomethylauristatin F

*<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm> with permission from Professor Alejandro M.S. Mayer, PhD. (Department of Pharmacology, Chicago College of Osteopathic Medicine Midwestern University).

2.5. Jamur yang Berasal dari Laut

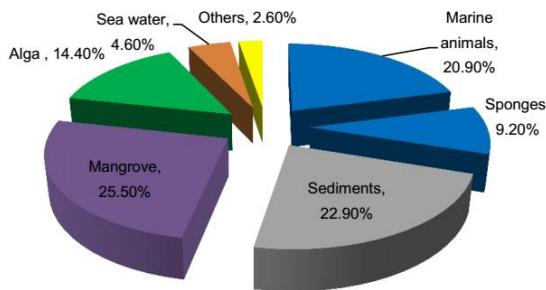
Lautan yang menutupi lebih dari 70% permukaan bumi dan lebih dari 95% biosfer bumi menampung berbagai organisme laut. Karena kondisi fisik dan kimia khusus di lingkungan laut, hampir setiap kelas organisme laut menampilkan berbagai molekul dengan fitur struktural yang unik. Saat ini, ribuan senyawa yang unik secara struktural dan aktif secara biologis telah dilaporkan dari jamur laut (Jin *et al.*, 2016).

Definisi ekologi jamur laut yang diterima secara umum adalah, "Jamur laut obligat adalah mereka yang tumbuh dan secara eksklusif ditemukan di habitat laut atau muara; jamur laut fakultatif adalah mereka yang berasal dari lingkungan air tawar atau darat yang dapat tumbuh dan mungkin juga bersporulasi di lingkungan laut" (Kohlmeyer dan Kohlmeyer, 1979).

Jamur yang berasal dari laut diketahui menghasilkan metabolit sekunder yang unik secara struktural karena adaptasi terhadap serangkaian tekanan lingkungan yang sangat berbeda dari lingkungan laut, dan sejak awal 1990-an, peningkatan tajam dan eksponensial dalam jumlah metabolit aktif biologis relevan yang dilaporkan terjadi (Bhadury *et al.*, 2006; Gomes, 2014).

Distribusi jamur yang berasal dari laut di daerah tropis belum dieksplorasi secara menyeluruh seperti di daerah beriklim sedang (Blunt *et al.*, 2009; Blunt *et al.*, 2005; Kohlmeyer, 1984). Namun demikian, data inventarisasi jamur laut yang diteliti di beberapa negara tropis seperti Thailand (Chaeprasert *et al.*, 2010), Kepulauan Palau (Kohlmeyer, 1984), Singapura (Sundari, 2010), Brunei (Hyde, 1988), Malaysia (Zainuddin *et al.*, 2010) dan Pulau Siargao, Filipina (Besitulo *et al.*, 2002) tersedia. Namun, banyak daerah tropis yang sebagian besar masih belum dijelajahi, seperti kepulauan Indonesia.

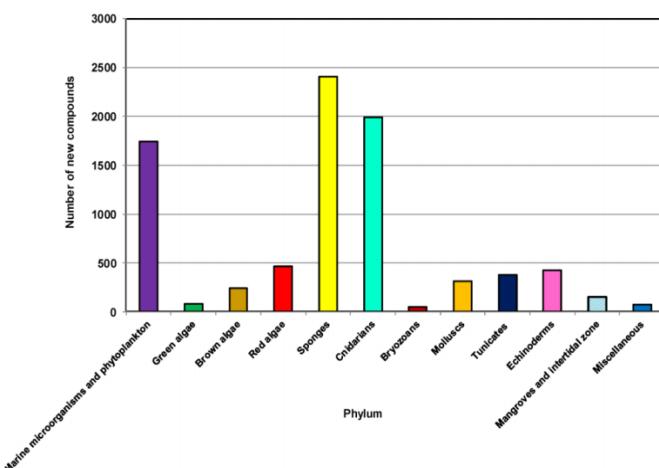
Jin *et al.* (2016) melaporkan bahwa sekitar tiga perempat dari semua senyawa kimia baru jamur laut berasal dari mahluk hidup seperti, invertebrata laut (30,1%), tumbuhan laut (42,5%), sedangkan sisanya diperoleh dari sumber yang tidak hidup, terutama sedimen (22,9%). Dalam kelompok individu, habitat mangrove (25,5%), alga (14,4%) dan terumbu karang (9,2%) merupakan sumber utama keanekaragaman kimia bahan alam jamur (Gambar 2.7). Menurut Bugni dan Irlandia (2004) spons laut adalah sumber terkaya kajian jamur laut. Di sisi lain, Kelecom (2002) melaporkan bahwa jumlah senyawa yang memiliki aktivitas antitumor dan antibakteri yang diisolasi dari bakteri sama dengan yang berasal dari jamur. Namun, jamur ditemukan menjadi sumber antikanker yang kaya daripada metabolit antibakteri. Dari jumlah senyawa baru yang diterbitkan setiap tahun, terbukti bahwa jumlah produk alam dari jamur yang berasal dari laut terus meningkat pesat dan masih belum mencapai klimaksnya (Rateb dan Ebel, 2011).



Gambar 2.7 Senyawa Baru dari Jamur yang berasal dari Laut dibagi dengan sumber Strain Jamur (Jin et al., 2016)

2.5.1. Jamur yang Berasal dari Spons Laut

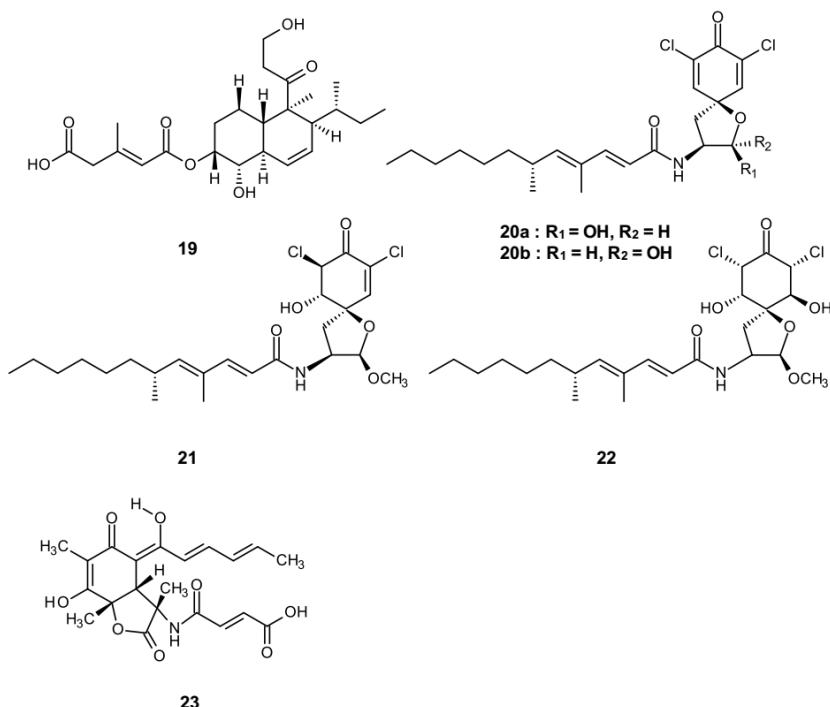
Invertebrata laut adalah salah satu kelompok utama organisme yang memberikan sejumlah metabolit sekunder dengan sifat farmakologis dan leader dalam formulasi obat baru. Di antara invertebrata laut, spon menjadi sumber dominan metabolit bioaktif baru (Hu et al., 2011). Jika dibandingkan dengan invertebrata laut lainnya, spon laut (Porifera) diakui sebagai sumber terkaya (Mehbub et al., 2014). Gambar 2.8 menunjukkan distribusi hasil alam laut baru dari berbagai jenis sumber laut, termasuk mikroorganisme dan fitoplankton yang ditemukan dari 2001-2010 (Mehbub et al., 2014).



Gambar 2.8 Jumlah total senyawa baru yang diisolasi dari berbagai jenis sumber laut, 2001-2010 (Mehbub et al., 2014)

Secara khusus, jamur yang berasosiasi dengan spon telah menghasilkan metabolit baru dengan aktivitas antibakteri dan antikanker yang kuat (Jensen dan Fenical, 2000). Trichoharzin (**19**), senyawa yang diisolasi dari *Trichoderma harzianum* yang berasosiasi dengan spon *Mycale cecilia*, adalah metabolit baru pertama dari jamur yang berasosiasi dengan spon (Kobayashi *et al.*, 1993), sedangkan gymnastatins A (**20a, b**), B (**21**) dan C (**22**) adalah metabolit sitotoksik novel pertama dari galur *Gymnasella* dan kaliensis, yang diisolasi dari spon *Halichondria japonica* (Amagata *et al.*, 1998).

Sorbicillactone A (**23**) adalah agen antileukemik lain yang diproduksi oleh *Penicillium chrysogenum* yang berasal dari spon laut *Ircinia fasciculata*. Senyawa **23** juga diketahui memiliki sifat antivirus dan neuroprotektif (Bringmann *et al.*, 2007), dan karena sifat antileukemiknya, senyawa ini juga memenuhi syarat untuk uji coba pada manusia (Thakur dan Thakur, 2006).



Gambar 2.9 Struktur trichoharzin (**19**), gymnastatins A-C (**20-22**) dan sorbicillactone A (**23**)

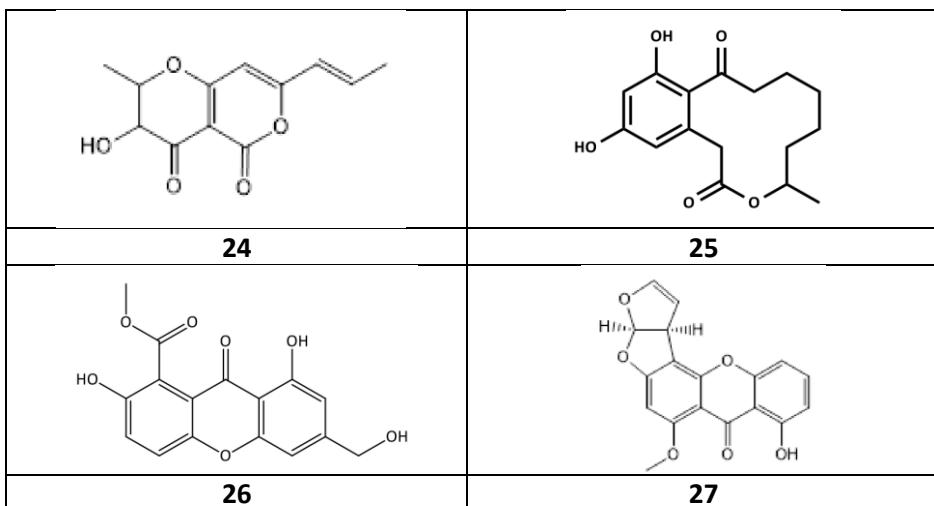
Dari jamur laut *Cochliobolus geniculatus* WR12 yang berasal dari spons laut asal Pulau Mandeh, di Pesisir Selatan Sumatera Barat *Halliclona fascigera* diperoleh Radicinin (**24**). Senyawa ini menunjukkan aktivitas sitotoksik dengan nilai IC₅₀ 60,68, 30,89, dan 87,89 g/mL terhadap sel kanker WiDr, T47D, dan Hela, tetapi tidak toksik terhadap sel Vero (nilai IC₅₀ 607,31 g/mL). Radicinin menunjukkan aktivitas sitotoksik yang lebih tinggi terhadap kultur sel T47D (IC₅₀ = 25,01 ppm) dibandingkan dengan doksorubisin (IC₅₀ = 33,49 ppm). Hasil pengujian aktivitas antibakteri, senyawa ini menunjukkan konsentrasi hambat minimum (KHM) sebesar 125 g/cakram terhadap MRSA (Handayani et al., 2020a). Senyawa ini dikenal sebagai senyawa fitotoksik dan antibakteri (Robeson dan Strobel, 1982; Aldrich, et al., 2015; Li, et al., 2014). Meskipun sedikit diketahui tentang aktivitasnya melawan bakteri resisten, namun mekanisme kerjanya ditentukan oleh mekanisme yang melibatkan inaktivasi protease (Aldrich, et al., 2015).

Dari spons laut yang sama juga diperoleh jamur *Penicillium oxalicum* WR3. Dari jamur ini diisolasi dua metabolit sekunder, culvularin (**25**) dan sydowinin B (**26**). Senyawa ini menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), serta aktivitas sitotoksik terhadap kultur sel kanker Hela, T47D, dan WiDR. Berdasarkan hasil uji antibakteri, keduanya senyawa menunjukkan penghambatan yang relatif lemah terhadap kedua strain bakteri yang diuji pada konsentrasi 125 g/cakram dan 500 g/cakram. Selanjutnya, culvularin menunjukkan sitotoksitas ringan terhadap manusia garis sel kanker, T47D dan HeLa, dengan nilai IC₅₀ masing-masing 142,66 ppm dan 164,88 ppm (Handayani et al., 2020b).

Culvularin **25** juga dilaporkan dapat menghambat aktivitas protein 90 (HSP90). HSP90 merupakan protein pendamping molekul yang terlibat dalam pensinyalan sel, proliferasi, dan kelangsungan hidup (Aly, et al., 2010). Oleh karenanya, senyawa ini dapat menjanjikan dalam pengobatan kanker, serta antibiotik potensial. Curvularin **25** telah berulang kali dilaporkan dari berbagai spesies jamur dari genus *Penicillium*, *Curvularia*, dan *Alternaria* (Raistrick dan Rice, 1971; Kobayashi, et al., 1988; Kjer, et al., 2010). Studi mengenai senyawa sydowinin B **26** juga telah melaporkannya dari beberapa spesies jamur yang berasal dari laut, seperti *A. sydowii* PSU-F154 (Trisuwan, et al., 2011), *Engyodontium album* DFFSCS021 (Yao, et al., 2014), *Aspergillus* sp. SC5IO Ind09F01 (Tian, et al., 2015), *Scopulariopsis* sp. dan *Arthrinium* sp. (Elnaggar et al., 2016).

Ekstrak EtOAc jamur *Aspergillus sydowii* DC08 yang berasal dari spon laut *Dactylospongia* sp mengandung senyawa sterigmatocystin (**27**) yang berhasil diekstraksi. Senyawa ini menunjukkan aktivitas sedang terhadap bakteri

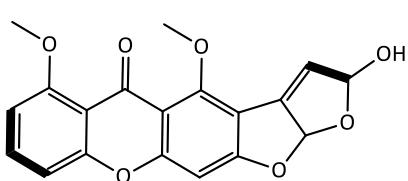
Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MDR-PA), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai MIC masing-masing sebesar 64, 128, 16, 32, dan 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Handayani, et al., 2022). Namun disisi lain, beberapa studi melaporkan bahwa sterigmatocystin **27** bersifat sitotoksik bagi manusia tergantung pada waktu dan dosis dalam berbagai lini sel seperti sel BEAS-2B epitel bronkial, sel Het-1A epitel esofagus, sel GES-1 epitel lambung, dan sel HepG2 hepatis (Gao, et al., 2015).



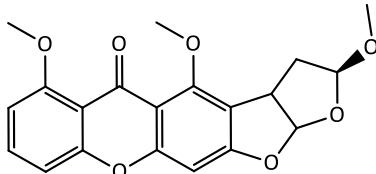
Gambar 2.10 Struktur radicinin (**24**), culvularin (**25**), sydowinin B (**26**), dan sterigmatocystin (**27**)

Aspergillus nomius NC06 berhasil diisolasi dari spons laut *Neopetrosia chaliniformis* yang dikulturkan pada media beras dan menghasilkan empat senyawa termasuk tiga oksisterigmatocystins baru, yaitu, J, K, dan L (**28-30**), dan satu senyawa yang diketahui, aspergillicin A (**31**). Senyawa **28**, **29**, dan **31** menunjukkan aktivitas sitotoksiknya terhadap sel kanker usus besar HT 29 dengan nilai IC₅₀ masing-masing sebesar 6,28, 15,14, dan 1,63 μM . Hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa **28** dan **29** mampu menginduksi apoptosis dan kematian sel pada sel HT 29 (Artasasta, et al., 2021).

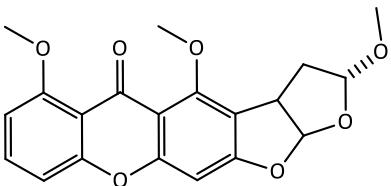
Oleh karena itu, spon laut dianggap sebagai sumber yang kaya keanekaragaman kimia dan manfaat kesehatan untuk mengembangkan calon obat, kosmetik, suplemen gizi dan probe molekul yang dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan rentang hidup sehat manusia.



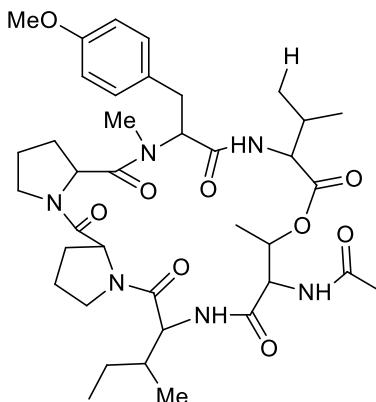
28



29



30



31

Gambar 2.11 Struktur oksisterigmatocystin J (**28**), K (**29**), L (**30**) dan aspergillicin A (**31**).

2.5.2. Jamur yang Berasal dari Alga Laut

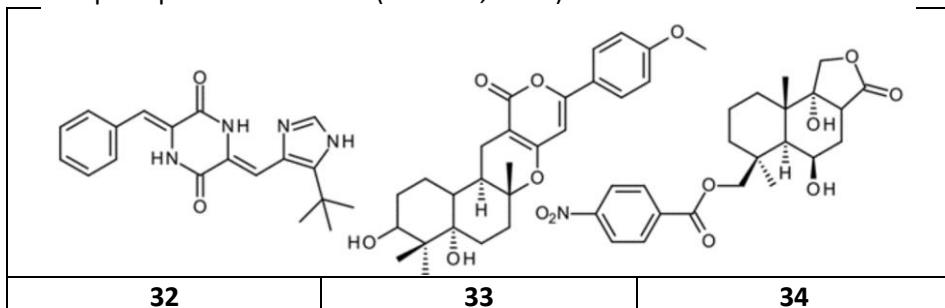
Alga merupakan sumber penting jamur laut dengan hampir sepertiga dari semua jamur laut tingkat tinggi yang diketahui berasosiasi dengan alga (Kohlmeyer dan Kohlmeyer, 1979). Selain itu, alga adalah salah satu sumber yang paling umum dari jamur yang berasal dari laut untuk studi kimia (Rateb dan Ebel, 2011). Sejumlah penelitian telah menunjukkan bahwa jamur yang menghuni alga bertanggung jawab atas produksi banyak metabolit sekunder bioaktif, yang sebelumnya dikaitkan dengan inang (Flewelling *et al.*, 2015).

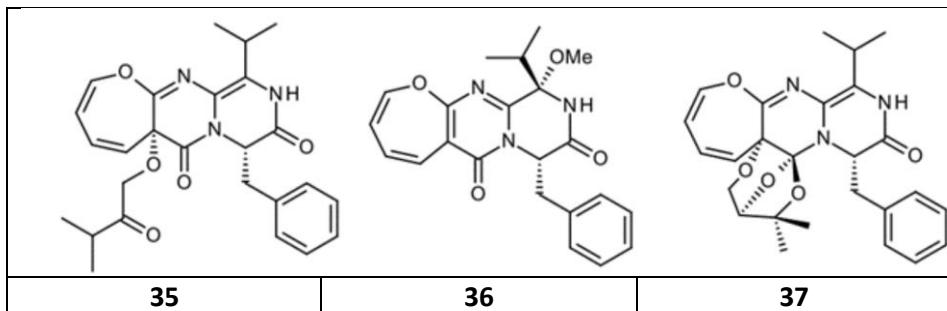
Produk Alami yang diisolasi dari jamur yang berasal dari ganggang laut telah menjadi subyek banyak laporan kimia dalam beberapa dekade terakhir terutama selama tahun 2002 hingga pertengahan 2015. Sejumlah senyawa baru telah diisolasi dan diidentifikasi, dengan berbagai sifat biologis termasuk aktivitas antikanker, antibiotik, antivirus, antioksidan, dan antikinase (Zhang *et al.*, 2016). Contoh senyawa bioaktif adalah plinabulin (NPI-2358) (**32**), yang diisolasi dari alga laut *Aspergillus* sp. CNC-139 (Kanoh *et al.*, 1997). Senyawa ini

menghambat sintesa tubulin dan bertindak sebagai agen pengganggu pembuluh darah yang mengacaukan struktur endotel pembuluh darah tumor dan menyebabkan kerusakan sel (Nicholson *et al.*, 2006). Contoh lain adalah meroterpene baru arisugacin K (**33**), diisolasi dari galur jamur *Penicillium echinulatum* pt-4, yang diisolasi dari alga merah laut *Chondrus ocellatus*. Senyawa ini menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Escherichia coli* dengan diameter penghambatan 8 mm pada 30 µg/disk (Li *et al.*, 2014).

Sebuah nitrobenzoyl sequiterpenoid baru, 6 β -9 α -dihydroxy-14 pnitrobenzoylcinnamolide (**34**) diisolasi dari jamur turunan laut *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17, yang berasal dari alga laut *Coelarthurum* sp. Senyawa **34** menunjukkan sitotoksitas yang signifikan terhadap 10 sel kultur kanker manusia (K562, H1975, U937, Molt-4, BGC-823, HL60, MCF-7, A549, Hela, dan Huh-7) dengan nilai IC₅₀ mulai dari 1,95 µM hingga 6,35 µM, selain aktivitas antivirus terhadap virus influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2) dan enterovirus manusia 71 (EV71) (Fang *et al.*, 2014). Dua alkaloid diketopiperazine baru yang mengandung oxepine: varioloids A (**35**) dan B (**36**) dari jamur *Paecilomyces variotii* EN-291, yang diisolasi dari alga merah laut *Grateloupia turuturu* ditemukan menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap jamur patogen *Fusarium graminearum* dengan nilai MIC masing-masing 8 dan 4 µg/mL (Zhang *et al.*, 2015).

Selain itu, alkaloid unik yang mengandung 3H-oxepine, varioxepine A (**37**), yang diisolasi dari jamur endofit turunan alga laut *Paecilomyces variotii* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri patogen air dan manusia *Aeromonas hydrophila*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio anguillarum*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahemolyticus* dengan nilai KHM berkisar antara 16 hingga 64 µg/mL serta jamur patogen tanaman *Fusarium graminearum* dengan nilai KHM µ4 g/mL (Zhang *et al.*, 2014). Senyawa **32-37** tidak terwakili dengan baik dalam kandidat obat-obatan dan tidak satupun dari mereka saat ini ada di pasaran. Hanya pinabulin (**32**), analog peptida siklik sintetis dari halimida, dalam uji klinis fase II untuk pengobatan kanker paru-paru non-sel kecil (Jin *et al.*, 2016).





Gambar 2.12 Struktur plinabulin (**32**), arisugacin K (**33**), 6 β -9 α -dihydroxy-14-pnitrobenzoylcinnamolide (**34**), varioloid A dan B (**35** dan **36**) dan varioxepine A (**37**)

2.5.3. Jamur yang Berasal dari Koral Laut

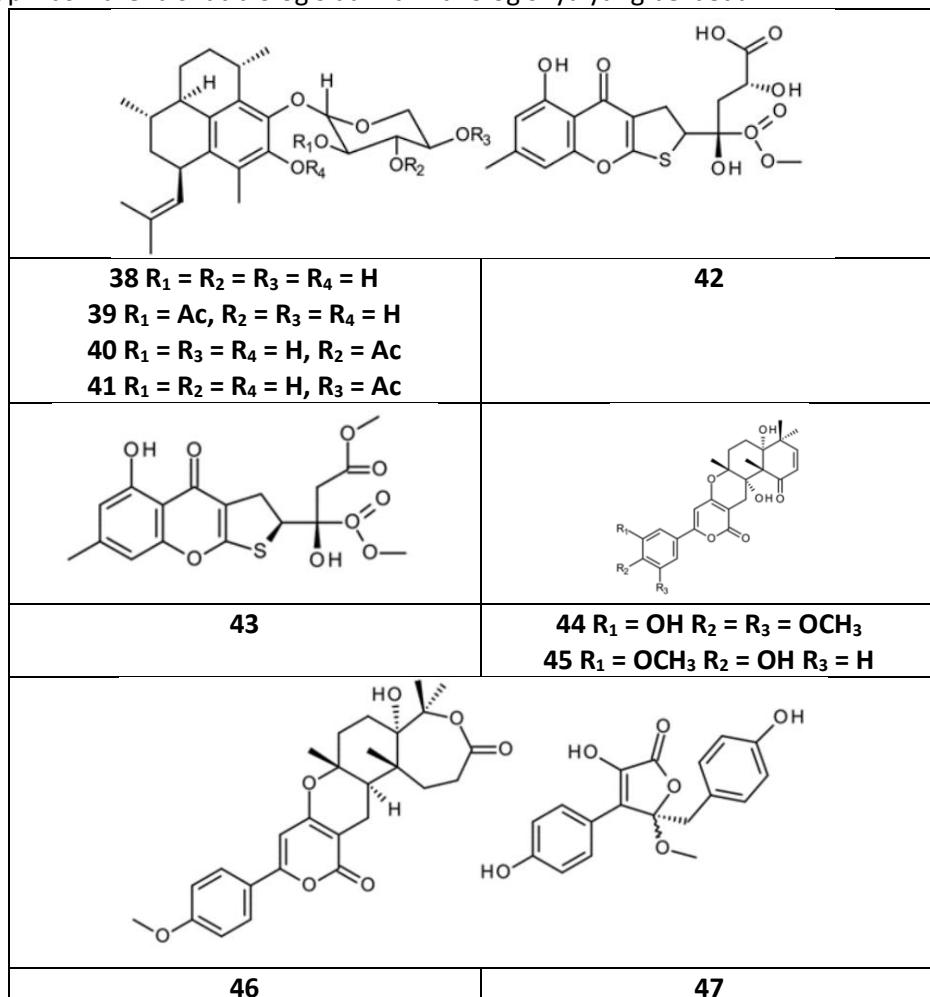
Karang adalah invertebrata laut sesil yang umumnya dikategorikan ke dalam organisme jenis keras, lunak atau gorgonian. Karang lunak (*soft coral*) laut diketahui menghasilkan beragam metabolit sekunder, terutama diterpenoid dan steroid, yang sering dicirikan oleh fitur struktural yang tidak umum dan bioaktivitas yang kuat (Putra dan Murniasih, 2016).

Glikosida diterpen pseudopterosins A-D (**38-41**) (Gambar 2.13) yang diisolasi dari karang gorgonia Karibia *Pseudopterogorgia elisabethae*, menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan berada dalam uji klinis fase II (Yuan et al., 2006). Selain itu, senyawa ini efektif dalam mencegah kerusakan akibat sinar matahari pada kulit dan memiliki kandungan nutrisi pada kulit. Karena aktivitas anti-inflamasi dan analgesiknya yang sangat baik, pseudoterosin A-D (**38-41**) saat ini dimasukkan ke dalam persiapan perawatan kulit (Pomponi, 1999).

Menariknya, keberadaan jamur yang terkait dengan karang menunjukkan bahwa interaksi yang menguntungkan antara jamur dan karang terakumulasi dan tantangan saat ini termasuk penjelasan metabolit (Yarden, 2014). Metabolit yang unik secara struktural dengan aktivitas biologis dan farmakologis oxalicumones D dan E (**42** dan **43**) diisolasi dari kultur jamur laut gorgonian *Penicillium oxalicum* SCSGAF 0023. Senyawa **42** dan **43** menunjukkan sitotoksitas yang signifikan terhadap beberapa kultur sel karsinoma dengan IC₅₀ kecil dari 10 μ M (Bao et al., 2014).

Strain jamur *Aspergillus terreus* SCSGAF0162, yang diisolasi dari karang gorgonian *Echinogorgia aurantiaca* menghasilkan tiga lakton termasuk turunan territrem, territrem D (**44**), territrem E (**45**), 11 α , dehydroxyisoterreulactone A (**46**) dan isobutyrolactone II (**47**). Senyawa **44** dan **45** menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap asetilkolinesterase dengan IC₅₀ 4,2 ± 0,6 dan

$4,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$, masing-masing. Sedangkan senyawa **46** dan **47** menunjukkan aktivitas antivirus terhadap HSV-1 dengan IC_{50} masing-masing $16,4 \pm 0,6$ dan $21,8 \pm 0,8 \text{ g/mL}$, senyawa **44** menunjukkan aktivitas antifouling yang kuat dengan $\text{EC}_{50} 12,9 \pm 0,5 \text{ g/mL}$ terhadap larva *Balanus amphitrite* (Nong *et al.*, 2014). Oleh karena itu, banyak senyawa yang diisolasi dari berbagai spesies jamur yang berasosiasi dengan karang laut dapat dieksplorasi dalam berbagai aplikasi karena sifat biologis dan farmakologisnya yang berbeda.



Gambar 2.13 Struktur pseudopterosin A-D (**38-41**), oksalikumon D dan E (**42 - 43**), territrem D dan E (**44** dan **45**), 11α , dehydroxyisoterreulactone A (**46**) dan isobutyrolactone II (**47**)

2.5.4. Jamur Endofit dari Mangrove

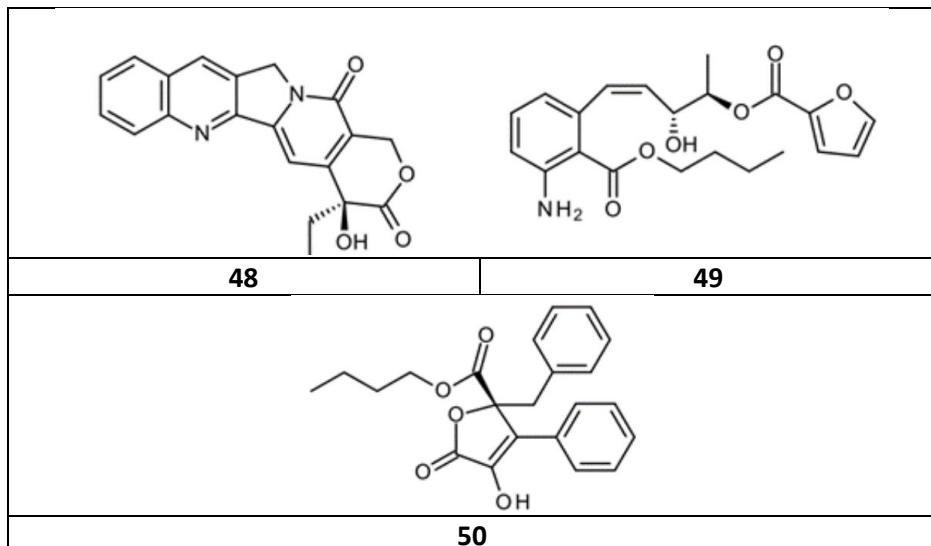
Mangrove adalah hutan lahan basah tropis dan subtropis yang menyimpan keragaman besar jamur laut (Shearer *et al.*, 2007). Jamur yang berasal dari mangrove merupakan kelompok ekologis terbesar kedua dari jamur laut dan banyak diantaranya adalah spesies baru atau belum cukup dideskripsikan (Sridhar, 2004). Banyak jamur yang berasal dari mangrove ditemukan menghasilkan bahan kimia dengan fungsi dan struktur baru (Kobayashi dan Tsuda, 2004). Sekitar 90% mangrove tersebar di Asia Tenggara, Amerika dan Afrika (Shearer *et al.*, 2007). Menurut Kohlmeyer dan Kohlmeyer (1979), jamur laut yang ditemukan di habitat mangrove hidup pada akar, batang dan ranting yang terendam air sedangkan jamur terrestrial mendiami batang bawah, cabang dan bagian atas akar di atas permukaan air. Jamur yang berasal dari mangrove dapat dikategorikan menjadi jamur saprofit, parasit dan simbiosis (Thatoi *et al.*, 2013). Di antara berbagai kelompok jamur turunan mangrove, jamur endofit mangrove dianggap memiliki potensi besar untuk aplikasi dalam industri farmasi dan nutraceutical untuk menghasilkan antibiotik, antidiabetik, antivirus, antiinflamasi, antikanker, antioksidan dan obat imunosupresif dan agen terapeutik (Balagurunathan dan Radhakrishnan, 2007).

Lebih dari dua puluh tahun setelah Taxol (paclitaxel) (7) ditemukan dari kulit pohon *Taxus brevifolia*. Strobel *et al.* mengisolasi taksol baru yang memproduksi jamur endofit, *Taxomyces andreanae*, dari *Taxus brevifolia* (Strobel *et al.*, 1993). Pada tahun-tahun berikutnya, jamur endofit lebih lanjut seperti *Pestalotiopsis microspore* (Strobel *et al.*, 1996), *Seimatoantlerium tepuiense* (Strobel *et al.*, 1999), *Periconia* sp. (Li *et al.*, 1998), juga telah dilaporkan sebagai produsen taksol dan turunannya.

Alkaloid indole kuinolin, camptothecin (CPT) (48), yang dieksplorasi secara komersial sebagai agen antikanker, pertama kali diisolasi dari kulit dan batang *Camptotheca acuminata*, tanaman yang digunakan dalam pengobatan tradisional. Kemudian, camptothecin dan analognya ditemukan diproduksi oleh kultur jamur endofit *Camptotheca acuminata* (Kusari *et al.*, 2009). Sebuah amina aromatik baru pestalamina A (49), diisolasi dari jamur endofit yang berasal dari bakau *Pestalotiopsis vaccinii* menunjukkan aktivitas sitotoksik moderat terhadap kultur sel kanker manusia MCF-7 (kanker payudara), HeLa (kanker serviks), dan HepG2 (karsinoma hati) dengan Nilai IC₅₀ masing-masing 40,3, 22,0, dan 32,8 µM (Zhou *et al.*, 2014).

Selain itu, butyrolactone aromatik baru, flavipesin A (50), diisolasi dari jamur endofit dari laut *Aspergillus flavipes* AIL8, yang diisolasi dari bagian dalam daun tanaman bakau *Acanthus ilicifolius*, menunjukkan aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus subtilis* dengan nilai MIC masing-masing sebesar 8,0 dan 0,25 µg/mL, dan juga menunjukkan

aktivitas antibiofilm yang unik dengan menurunkan jumlah sel hidup yang tertanam dalam nilai OD matriks biofilm dari 390,6 menjadi 97,7 $\mu\text{g/mL}$ ($p<0,01$). Senyawa **50** dapat menembus matriks biofilm dan membunuh bakteri hidup di dalam biofilm *S. aureus* (Bai *et al.*, 2014).

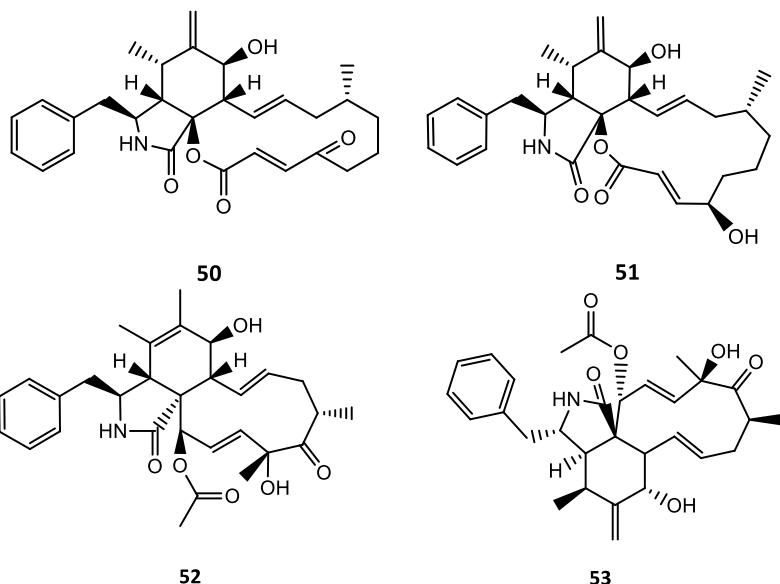


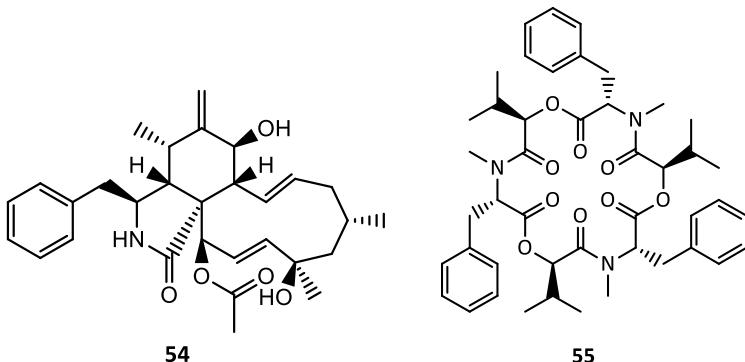
Gambar 2.14 Struktur camptothecin (**48**), pestalamina A (**49**) dan flavipesin A (**50**)

Cytochalasin A dan B (**50,51**) pertama kali diisolasi pada tahun 1966 sebagai metabolit jamur *Helminthosporium dematioideum*, sedangkan cytochalasin C dan D (**52,53**) diisolasi dari jamur *Metarrhizium anisopliae* (Pendse, 1974). Cytochalasin H pertama kali diisolasi pada tahun 1977 dari jamur *Phomopsis paspali* (Li, *et al.*, 2014). Senyawa ini juga telah diisolasi dari *Phomopsis* sp IFB-E060, jamur endofit pada kulit batang *Vaticamangachapoi* (Fu, *et al.*, 2011), dari *Phomopsis* sp By254, jamur endofit yang berasal dari akar *Gossypium hirsutum* (Tao, *et al.*, 2008), dan dari *Phomopsis* sp ZZF08, jamur endofit dari kulit kayu bakau, yang dikumpulkan di Zhanjiang, Laut Cina Selatan (Artasata, *et al.*, 2019). Cytochalasin H (**54**) dari Diaporthe amygdali SgKB4, suatu endofit strain jamur yang diisolasi dari tanaman bakau Sumatera Barat *Sonneratiagriffithii* Kurz memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen; *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228, *B. subtilis* ATCC 6633, *E. coli* ATCC 25922, *V. cholerae* Inaba, *S. typosa* NCTCC 786, and MRSA (Handayani, *et al.*, 2020c).

Dari jamur endofit *Fusarium proliferatum* AED3 berasal dari tanaman mangrove *Ardisia elliptica*, diperoleh beauvericin (**55**). Aktivitas sitotoksik dari

senyawa diuji menggunakan uji 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromida (MTT) terhadap sel kanker T47D dengan nilai IC₅₀ 112,2 g/mL (Handayani et al., 2021). Mekanisme sitotoksik beauvericin 48 terhadap sel kanker yang dilaporkan melibatkan induksi ROS (*Reactive Oxygen Species*), yang memicu peningkatan stres oksidatif dan menyebabkan sel apoptosis (Ferrer, et al., 2009). Senyawa ini juga menghasilkan sinyal Ca²⁺ ekstraseluler ke dalam sitosol, yang meningkatkan intraseluler Ca²⁺ dan menghasilkan kematian sel melalui jalur apoptosis atau nekrotik (Wang dan Xu, 2012; Wu, et al., 2002). Memanfaatkan hasil alam yang berasal dari ekosistem unik, seperti mangrove adalah upaya yang diperlukan untuk menemukan agen kanker baru. Oleh karena itu, jamur endofit dapat mewakili sumber struktur model baru yang menarik untuk aplikasi farmasi dan agrokimia.





Gambar 2.15 Struktur Cytochalasin A-D (50-53), H (54) dan Beauvericin (55)

2.6. Spons Laut *Acanthostrongylophora ingens*

2.6.1. Spons

Spons adalah hewan yang termasuk dalam filum Porifera yang secara harfiah berarti "menyangga pori" (Kingdom Animalia). Spons merupakan metazoa tertua yang hadir di semua kedalaman air, dari zona pasang surut ke wilayah terdalam (zona abyssal) (Müller, 1998). Spons Calcarea dan Demospongiae ditemukan di habitat sublittoral bawah yang berbatu, sedangkan spons Hexactinellida terutama ditemukan di habitat berlumpur bagian terdalam dari lautan (Van Soest *et al.*, 2012). Menariknya, spons dari famili Spongillidae (kelas Demospongiae) diadaptasi ke perairan sungai dan danau. Saat ini, ada 8.603 spesies yang telah diidentifikasi (Van Soest *et al.*, 2012).

Permukaan luar spons ditutupi dengan pori-pori kecil, yang menyaring air yang berada di sekitar lingkungannya ke dalam tubuh spons (Van Soest *et al.*, 2012). Pori-pori ini mengarah ke sistem kanal internal, di mana aliran air yang terus-menerus dipertahankan oleh sel-sel khusus yang menyediakan oksigen dan nutrisi ke spons. Lapisan kanal-kanal ini khusus untuk menjaga aliran air yang terus menerus melalui spons untuk mendapatkan dan menghilangkan karbon dioksida dan limbah (Müller *et al.*, 1999). Tubuh spons terdiri dari mesohil seperti jeli antara lapisan sel kerucut (choanocytes) dan lapisan sel pipih (pinacocytes), yang bertanggung jawab untuk mempertahankan struktur dan ukurannya (Müller, 1982). Spons tidak memiliki sistem saraf, pencernaan, atau peredaran darah (Müller *et al.*, 1999).

Kerangka mereka terdiri dari zat termineralisasi (berkapur atau mengandung silika) atau protein tipe kolagen yang disebut spongin. Spikula adalah satuan zat termineralisasi yang tersebar di seluruh spon dan fungsinya adalah untuk membantu perlindungan atau dukungan (Uriz *et al.*, 2003).

Berdasarkan struktur rangkanya, spons dibagi menjadi Demospongiae, Calcarea, Hexactinellida, dan Homoscleromorpha (Müller, 2006). Demospongiae dan Hexactinellida (atau spon kaca) memiliki spikula yang tersusun dari silika dan benang spongin (Bergquist, Lavis and Cambie, 1986). Di sisi lain, Calcarea memiliki kerangka yang terbuat dari kalsit, yang merupakan bentuk kalsium karbonat (Bergquist, Lavis and Cambie, 1986). Homoscleromorpha sebelumnya dianggap sebagai anggota kelas Demospongiae. Namun, atas dasar studi filogenetik molekuler baru-baru ini, Homoscleromorpha diakui sebagai kelas spons baru (Gazave *et al.*, 2012). Berbeda dengan Demospongiae, kerangka Homoscleromorpha adalah amorf dan tidak terorganisasi dengan baik yang menunjukkan tidak adanya struktur protein tersier (Gazave *et al.*, 2012).

2.6.2. *Acanthostrongylophora ingens*

Acanthostrongylophora ingens adalah spesies spons yang tergolong dalam kelas Demospongiae. Spesies ini juga merupakan bagian dari genus *Acanthostrongylophora* dan famili Petrosiidae. Nama ilmiah spesies ini pertama kali diperkenalkan pada tahun 1899 oleh Thiele. Seperti spons pada umumnya, spesies ini memiliki tubuh yang berpori dan permukaan yang keras seperti batu. Spons *A. ingens* membentuk kolom tebal tidak teratur dengan permukaan kasar (Gambar 2.16). Oskulum berdiameter beberapa millimeter dengan konsistensi kuat, mampat, dan rapuh serta berwarna coklat. Kerangka ini terdiri dari retikulasi traktus spikula tebal dengan diameter rata-rata 75 µm, membentuk jerat bulat agak persegi dengan diameter 200-280 µm (Hooper and Van Soest, 2002).

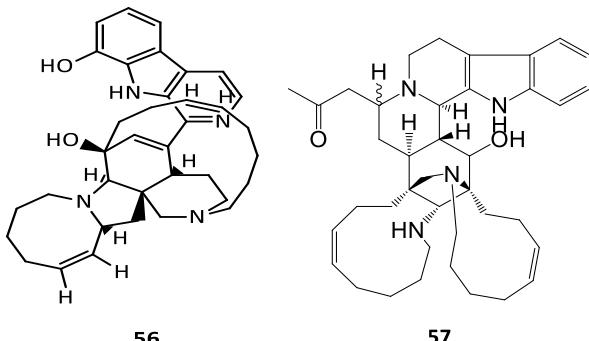


Gambar 2.16 Spons *Acanthostrongylophora ingens*

2.6.2.1. Kandungan Kimia dan Bioaktivitas dari Spons *Acanthostrongylophora ingens*

Ekstrak metabolit dari spons *A. ingens* telah diketahui mengandung senyawa bioaktif yang mempunyai aktivitas seperti: anti neuritogenik terhadap sel neuro 2a, sitotoksik, antimikroba, anti-malaria, antiviral, dan antikanker terhadap sel Hela (Zhang *et al.*, 2008; Dewi *et al.*, 2014; El-Desoky *et al.*, 2014; Ibrahim and Mohamed, 2016).

Senyawa (+)-8-hydroxymanzamine A (**56**) yang diisolasi dari spon *Acanthostrongylophora ingens* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium intracellulare* (Samoylenko, Ashfaq, *et al.*, 2009). Sedangkan senyawa Manadomanzamina A-B (**57**) yang diisolasi dari spon *Acanthostrongylophora* sp. dengan cincin indol pada strukturnya menunjukkan aktivitas *in vitro* yang baik melawan *Mycobacterium tuberculosis* dengan nilai konsentrasi penghambatan minimum (MIC) masing-masing 1,9 dan 1,5 µg/ mL (Peng *et al.*, 2003).



56

57

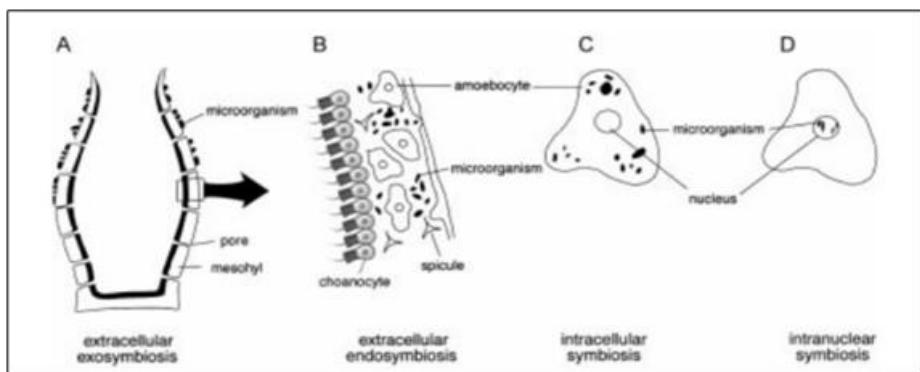
Gambar 2.17 Senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari spons *Acanthostrongylophora ingens*

2.7. Asosiasi Mikroorganisme pada Spons Laut

Spons menghasilkan senyawa bioaktif yang mampu melumpuhkan mikroba yang terperangkap. Mikroba yang resisten terhadap senyawa bioaktif tersebut akan bertahan dan hidup bersimbiosis di dalam tubuh spons (Ćetković and Lukić-Bilela, 2003). Proses interaksi antara spons dan mikroba simbionnya belum sepenuhnya diketahui. Beberapa teori mengemukakan bahwa proses rekrutmen mikroba simbion dilakukan spons pada saat proses filter feeder, dan masuk ke dalam mesohyl. Simbion menetap pada intra dan ekstra seluler (Gambar 2.18), dan masing-masing mikroorganisme simbion tampaknya memiliki habitat tertentu dalam spons inang.

Simbion ekstraseluler hadir pada lapisan luar spons sebagai eksosimbion (Gambar 2.18A) atau di mesohyl sebagai endosimbion (Gambar 2.18B). Simbol

intraseluler atau intranuklear secara permanen berada di sel inang atau inti (Gambar 2.18C, 2.18D) (Lee, Lee and Lee, 2001). Namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa selain mikroba episimbion yang melekat pada bagian permukaan spons selama masa pertumbuhan (Chelossi *et al.*, 2004), beberapa bakteri dan khamir (jamur) diturunkan secara genetis dalam tubuh spons (M. Maldonado *et al.*, 2005).

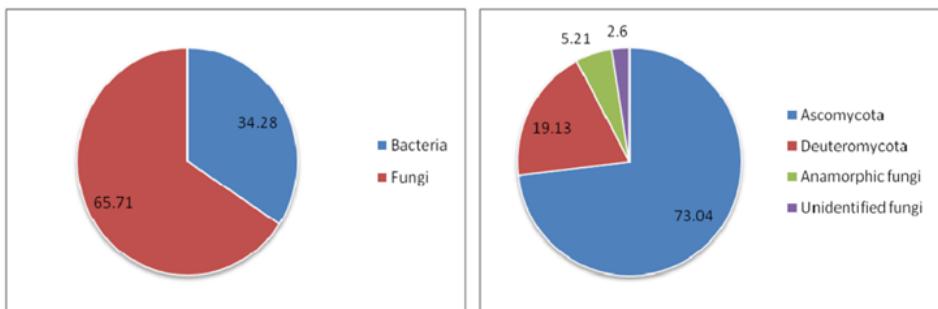


Gambar 2.18 Diagram skematik hubungan simbiotik antara spons dan mikroorganisme. **A.** eksosimbiosis ekstraseluler; **B.** endosimbiosis ekstraseluler; **C.** simbiosis intraseluler; dan **D.** simbiosis intranuklear (Lee, Lee and Lee, 2001).

Permukaan atau ruang internal spons laut lebih kaya nutrisi daripada air laut dan sedimen; oleh karena itu spon menawarkan makanan dan habitat yang aman untuk simbion mereka. Di sisi lain, mikroorganisme simbiotik juga membantu dalam proses nutrisi oleh pencernaan intraseluler atau dengan translokasi metabolit termasuk fiksasi nitrogen, nitrifikasi dan fotosintesis. Mikroorganisme juga menstabilkan kerangka spons dan berpartisipasi dalam sistem pertahanan kimia inang terhadap pemangsa dan biofouling (Lee, Lee and Lee, 2001), serta sebagai pelindung terhadap radiasi sinar ultraviolet dan penghasil enzim antioksidan (Steindler *et al.*, 2005). Bakteri yang dikumpulkan dari spon telah memungkinkan isolasi senyawa antimikroba, yang menunjukkan bahwa bakteri ini dapat berperan dalam mekanisme pertahanan invertebrata ini (Lee, Lee and Lee, 2001).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa simbion-simbion tersebut memiliki peranan dalam produksi senyawa bioaktif yang berfungsi dalam adaptasi ekologi spons (Proksch *et al.*, 2003; Thakur and Müller, 2004; Zheng *et al.*, 2005). Sebagian besar spons mengandung mikroba simbion dalam jumlah besar yang termasuk jamur (Gambar 2.19) (Thomas, Kavlekar and LokaBharathi, 2010; Rozas *et al.*, 2011). Dari beberapa penelitian telah dilaporkan bahwa

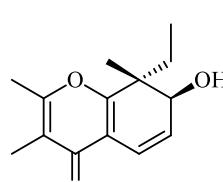
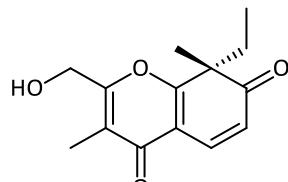
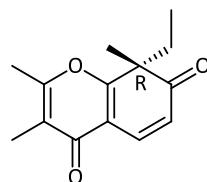
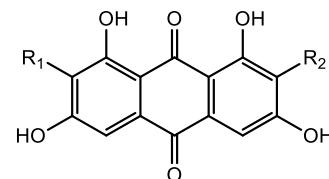
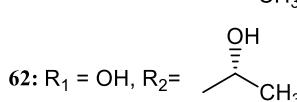
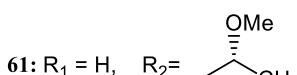
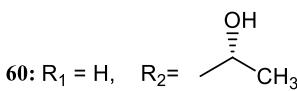
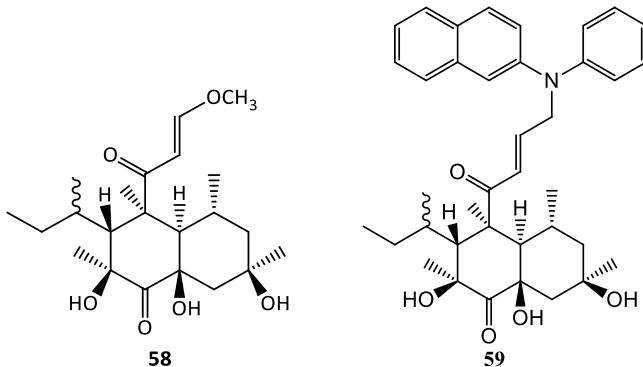
jamur yang bersimbiosis dengan spons merupakan produsen senyawa bioaktif yang berperan penting dalam penghambat aktivitas mikroorganisme penyebab penyakit infeksi pada manusia (Thomas, Kavlekar and LokaBharathi, 2010).



Gambar 2.19 Persentase distribusi senyawa yang dihasilkan oleh (a) assosiasi bakteri dan fungi pada spons, (b) Assosiasi fungi (Thomas, Kavlekar and LokaBharathi, 2010)

2.7.1. Asosiasi Jamur pada Spons Laut

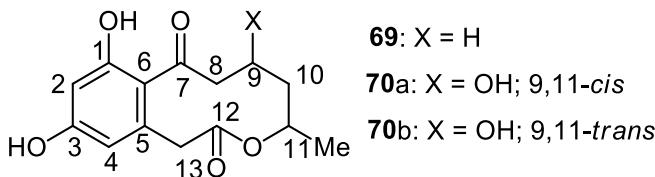
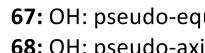
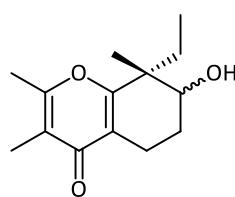
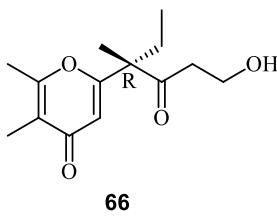
Bukti keterlibatan mikroorganisme dalam biosintesis produk alam laut dapat ditunjukkan pada spons. Spons yang berasosiasi dengan jamur telah berulang kali terbukti memperlihatkan sumber bioaktif metabolit sekunder baru yang menarik. Metabolit jamur yang tidak biasa termasuk hortein, sebuah poliketida baru dari jamur *Hortaea werneckii* yang diisolasi dari spons *Aplysina aerophoba*, turunan betaenone (**58,59**) dan antrakuinon (**60-62**) dari jamur *Microsphaeropsis* sp juga diisolasi dari spons *A. aerophoba*, turunan spisiferon (**63-68**) dari jamur *Drechslera hawaiiensis* berasal dari spons *Callyspongia aerizusa* dan xestodekalakton (**69,70**) diproduksi oleh jamur *Penicillium montanense* yang diisolasi dari spons *Xestospongia exigua* (Brauers *et al.*, 2000; Edrada *et al.*, 2000). Terdapat pula dua senyawa bioaktif dari jamur *Exophiala* sp. yang berasal dari spons *Halichondria panicea* yaitu senyawa Chlorohydroaspyrones A (**71**) dan B (**72**) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan nilai MIC 62,5 µg/mL (Zhang *et al.*, 2008).

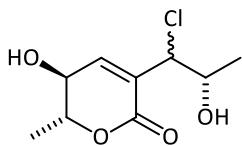


63

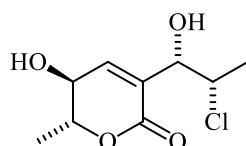
64

65



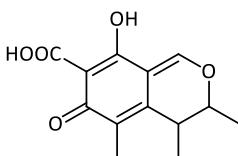


71

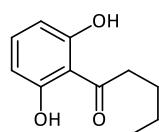


72

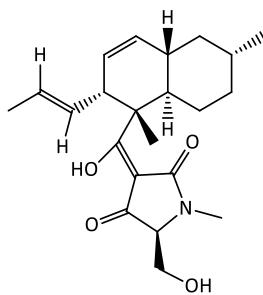
Senyawa citrinin (**73**) dari jamur simbiotik *Penicillium* sp. pada spons *Melophus* sp. telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, rifampicin-resistant *S. aureus*, wild type *S. aureus* dan vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* dengan nilai MIC masing-masing sebesar 3,90, 0,97, 1,95 dan 7,81 µg/mL (Subramani *et al.*, 2013). Bioaktivitas metabolit antimikroba 1-(2,6-dihydroxyphenyl) pentan-1-one (**74**) aktif terhadap bakteri patogen dengan nilai IC₅₀ berkisar antara 18-30 µg/mL dan aktif terhadap *Pseudomonas fluorescens* dengan nilai IC₅₀ sebesar 6 µg/mL. Kedua metabolit tersebut diisolasi dari *Cryptopsoriopsis* sp. yang merupakan jamur endopitik pada spon *Clidamia hirta* (Zilla *et al.*, 2013). Wiese *et al.* (2011) telah menemukan beberapa jamur simbion dari spon *Tethya aurantium* asal Jerman yang menghasilkan senyawa antibakteri yaitu Equisetin (**75**) dari jamur *Fusarium equiseti* dan *Fusarium heterosporum*, Sydonic acid (**76**) dari jamur *Aspergillus sydowii*, 2',3' -dihydrosorbicillin (**77**) dari jamur *Penicillium notatum* dan *Verticillium intertextum*, dan bionectin B (**78**) dari jamur *Bionectria byssicola*.



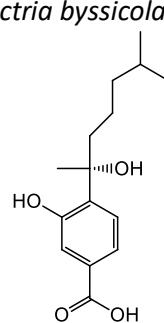
73



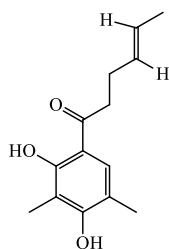
74



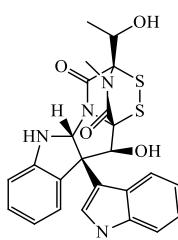
75



76



77



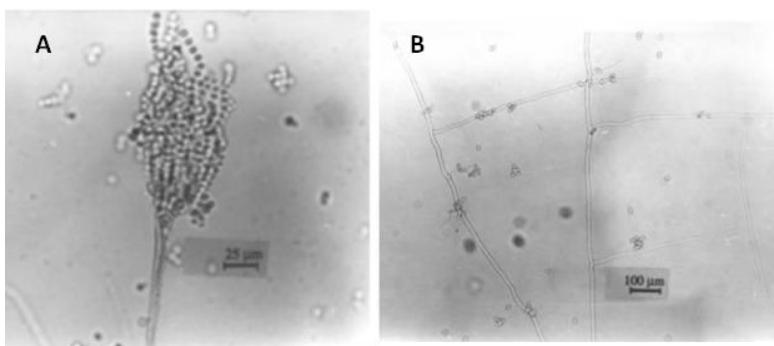
78

2.8. Jamur *Aspergillus unguis*

Aspergillus unguis termasuk anggota genus *Aspergillus* dalam filum Ascomycota. *A. unguis* berkembang biak terutama di tanah tropis dan substropis, tapi juga telah diisolasi dari berbagai habitat laut dan air (Rajasree et al., 2013). Sinonim dari spesies ini, termasuk *Sterigmatocystis unguis*, *Aspergillus laokianensis* dan *Aspergillus mellinus* (Brandt et al., 2014).

Secara makroskopis karakteristik koloni *A. unguis* berwarna kuning terang dibagian tengah dan hijau hingga hijau gelap disekelilingnya. Koloni dibagian tengah ini akan berubah menjadi berkerut setelah hari ke-13 di dalam media Czapek-zox pada suhu 20 °C. Kepala konidia pada awalnya berbentuk bulat memancar (*radiate*), tapi kemudian berubah bentuk kolom (*columnar*). Pada media *malt extract agar* (MEA) dengan kondisi yang sama, koloni berwarna hijau dan diameter 3-4 cm (Eltem et al., 2004).

Secara mikroskopis *A. unguis* di dalam media Czapek-zox, konidiofora berbentuk halus dan berwarna kuning kecoklatan, berukuran 45-60 x 3-3,5 µm pada sel dasar, dinding tebal dan kasar, terdapat hipa spikular. Vesikel hialin berbentuk setengah bulat dengan diameter 7,0-12 µm. Sel konidiogen menghasilkan konidia dari ujung berbentuk biseriate dengan ukuran 6-7 x 2,5-3 µm, ukuran metula 5-6 x 2,5-3 µm. Konidia berbentukbulat hingga hamper bundar serta kasar dan diameternya 2,5-3,0 µm. Panjang rantai konidia 150 µm (Eltem et al., 2004).



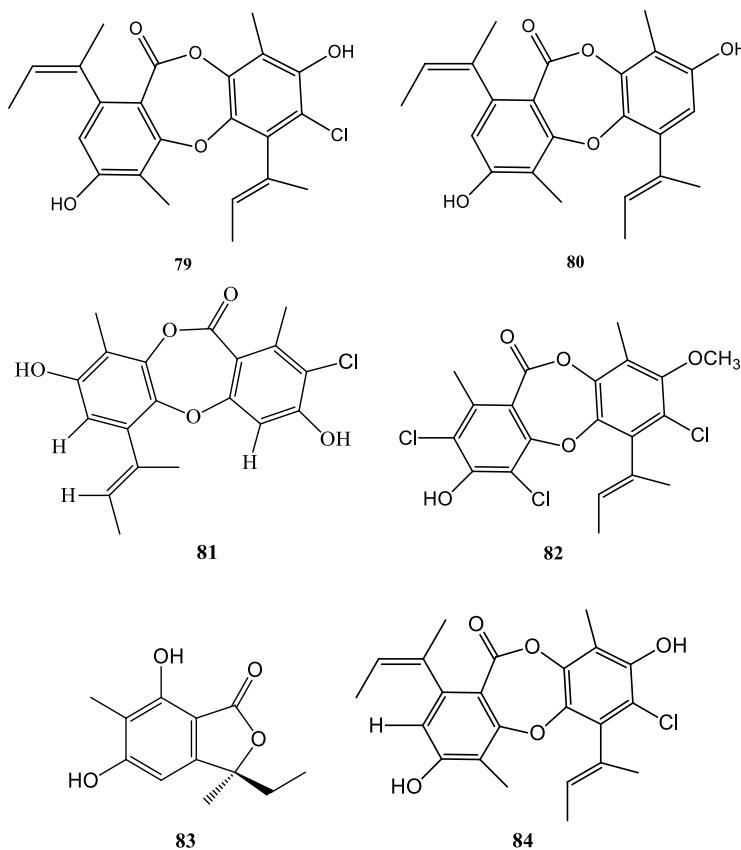
Gambar 2.20 Gambaran mikroskopis *A. unguis*, (A) Kepala konidia (B) Hipa (Eltem et al., 2004)

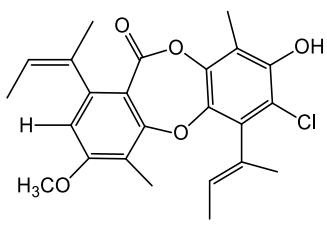
2.8.1. Kandungan Senyawa Kimia Bahan Alam dari Jamur *A. unguis*

Kandungan senyawa yang diisolasi dari jamur *A. unguis* pertama kali diisolasi oleh Stodola et. al. (1971) yaitu unguinol (79) dan nornidulin (80) dari beberapa literatur lain melaporkan bahwa senyawa bioaktif yang telah diisolasi adalah 2-chlorounguinol (81), nidulin (82), 3-ethyl-5,7-dihydroxy-3,6-dimethyl

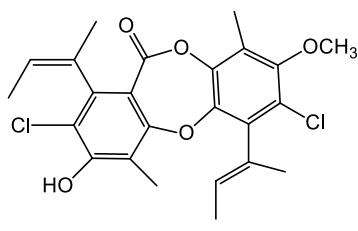
phthalide (**83**), emeguisin A-C (**84-86**) (Kawahara, *et al.*, 1988), folipastatin (**87**) (Hamano *et al.*, 1992), guisinol (**88**) (Nielsen, Nielsen and Frisvad, 1999), unguisin (**89**) (Malmstrøm *et al.*, 2002), aspergillusphenol A-B (**90, 91**), aspergillusidones D-F (**92-94**), dan 2,4-cholorounguinol (**95**) (Sureram *et al.*, 2013).

Pada Jamur *A. unguis* strain PSURSPG199 yang dikultivasi dengan media cair (*borth*) juga diperoleh beberapa senyawa bioaktif yaitu asperlide (**96**), aspergilluspherol A (**97**), metil orselinat (**98**) dan (+)-montagnetol (**99**). Dari miselia jamur *A. unguis* dihasilkan metabolit sekunder yaitu aspersidone (**100**), pilobolusate (**101**), 3-chlorounguinol (**102**), nordinulin (**80**), unguinol (**79**), nidulin (**82**), aspergillusidore C (**103**), emeguisin A (**84**) dan folipastatin (**87**) (Klaiklay *et al.*, 2016a).

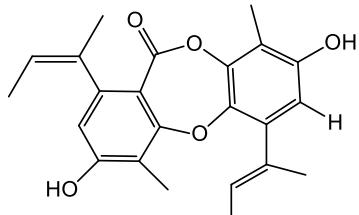




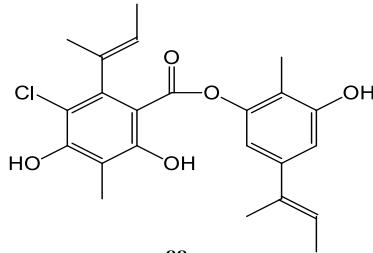
85



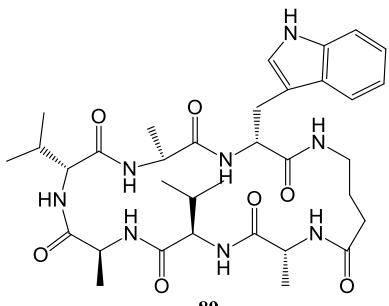
86



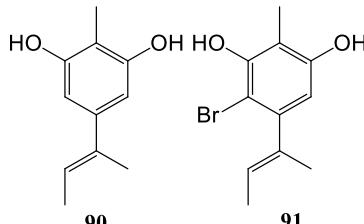
87



88

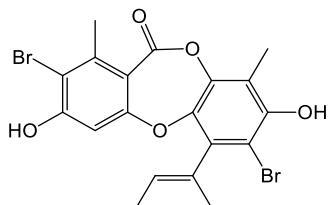


89

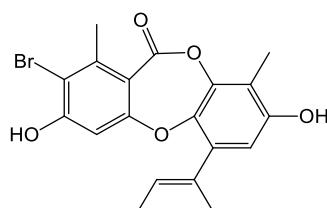


90

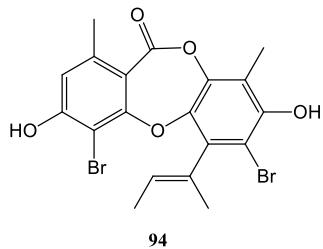
91



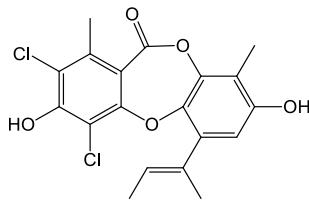
92



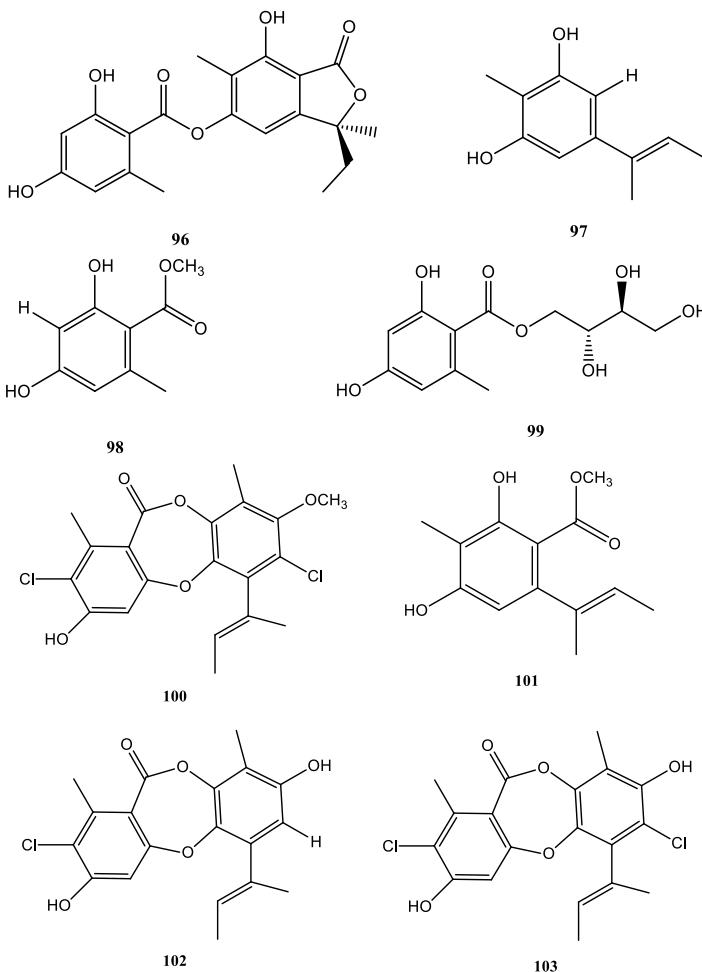
93



94



95



Gambar 2.21. Senyawa metabolit sekunder yang diisolasi dari jamur *A. unguis*

2.9. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*

Resistensi antimikroba telah menjadi masalah kesehatan masyarakat utama secara global. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu bakteri patogen penyebab penyakit infeksi yang dapat menyebabkan kematian pasien terbesar di seluruh dunia atau memperpanjang masa tinggal di rumah sakit (Bal *et al.*, 2017; Kelly M Craft *et al.*, 2019). MRSA pertama kali diperkenalkan di Inggris pada tahun 1961, setelah penggunaan metisilin pada praktik klinis (Jevons, 1961). Penggunaan metisilin sebagian

besar telah digantikan oleh penisilin yang serupa dan lebih stabil seperti oxacillin, flucloxacillin dan dicloxacillin (Facciolà *et al.*, 2018).

Pada tahun 1960 awal kemunculan MRSA dilaporkan menjadi salah satu bakteri patogen yang ditularkan dalam lingkungan rumah sakit, dikenal dengan istilah Hospital acquired MRSA (HA-MRSA). Pada tahun 1990-an, infeksi ini dilaporkan telah tersebar di masyarakat melalui kontak langsung dengan orang-orang di lingkungan sekitar yang telah terinfeksi disebut Community-associated pathogen MRSA (CA-MRSA) (Aligholi *et al.*, 2008). Sejak pertengahan 2000-an, infeksi ini juga telah terpapar pada ternak (Livestock-associated MRSA (LA-MRSA) (Voss *et al.*, 2005).

Prevalensi penyebaran tingkat tertinggi (>50%) dilaporkan di Amerika Utara dan Selatan, Asia, dan Malta. Tingkat menengah (25-50%) dilaporkan di Tiongkok, Australia, Afrika, dan beberapa negara Eropa yaitu Portugal (49%), Yunani (40%), Italia (37%) dan Rumania (34%). Sebagian besar negara Eropa yang memiliki tingkat prevalensi yang rendah yaitu Belanda dan Skandinavia (Uematsu *et al.*, 2016; Hassoun, Linden and Friedman, 2017; Igrejas *et al.*, 2018). Peningkatan pervalensi tersebut merupakan konsekuensi dari *S. aureus* yang resisten terhadap β-laktam dan kelas antibiotik lainnya. Secara klinis, kolonisasi asimptomatis MRSA pada kulit dan mukosa menyebabkan infeksi kulit dan jaringan lunak hingga penyakit invasif fulminan dengan mortalitas tinggi (Lee *et al.*, 2018).

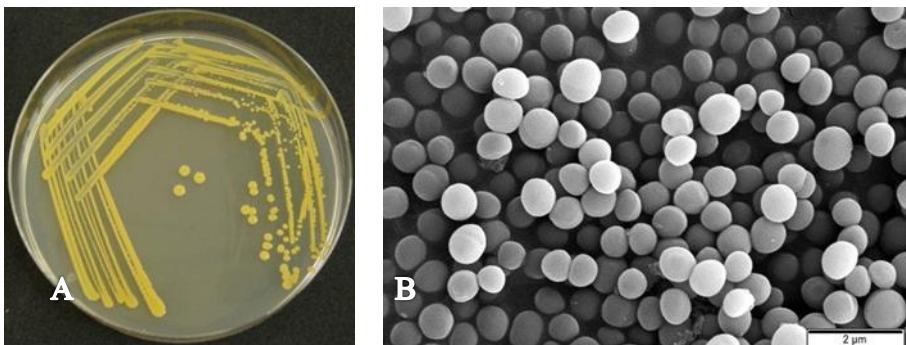
2.9.1. Gambaran umum *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus adalah bakteri gram-positif yang berbentuk kokus dan hidup bergerombol yang tersusun seperti buah anggur (Taylor and Unakal, 2019). Secara umum, bakteri ini merupakan organisme anaerob fakultatif kerena mampu bertahan hidup tanpa adanya oksigen baik melalui fermentasi atau dengan menggunakan akseptor elektron terminal alternatif, seperti nitrat (Masalha *et al.*, 2001). Di media, koloni *S. aureus* tampak berkilau, halus, tembus cahaya, dan memiliki pigmen kuning keemasan (Aryee and Edgeworth, 2016).

Klasifikasi *S. aureus* adalah sebagai berikut (Breland, 2008):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Coccii
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

S. aureus memiliki genom kromosom sirkuler sekitar 2800 kb yang membawa plasmid dan transposon. Pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini dilakukan dengan pemberian antimikroba golongan betalaktam seperti penisilin. Mekanisme kerja antimikroba betalaktam dengan mengikat *penicillin binding protein* (PBP) sehingga menyebakan kegagalan pada biosintesis dinding sel dan bakteri mengalami lisis (Lowy, 1998; Grayson, 2006).



Gambar 2.22 Bakteri *Staphylococcus aureus* pada media mueller hinton agar (A), Gambaran dengan Scanning Electron Microscopy (SEM) (B) (Murtey and Ramasamy, 2016)

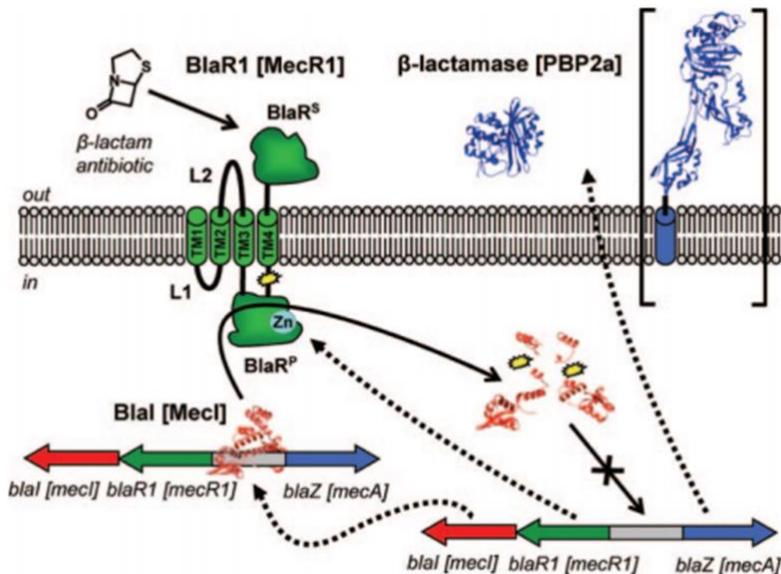
2.9.2. Mekanisme Resistensi Bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Antimikroba β -laktam membunuh bakteri dengan menghambat transpeptidase dinding sel, yang dikenal sebagai *penicillin binding protein* (PBP) memiliki peranan penting pada ikatan silang peptidoglikan dalam sintesis dinding sel bakteri normal (Wilke, Hills, H. Zhang, et al., 2004). Resistensi antimikroba β -laktam terhadap bakteri *S. aureus* memiliki dua mekanisme resistensi yang berbeda yaitu inaktivasi enzimatik β -laktamase yang dikodekan gen *blaZ*, yang memberikan resistensi terhadap penisilin kecuali isoxazolyl-penisilin dan penggantian lokasi target oleh gen produk dari *mecA* atau *mecC* (sebelumnya dikenal sebagai *mecALGA251*), gen yang memberikan perlindungan terhadap semua β -laktam dan menjadi dasar genetik resistensi metisilin di *S. aureus* (MRSA) (Murphy, Walshe and Devocelle, 2008; Feßler et al., 2018).

Resistensi MRSA didasari adanya insersi *mecDNA* atau *Staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) pada kromosom *S. aureus* (IWG-SCC, 2009). Terdapat dua belas tipe SCCmec yang dikenal (I-XII) telah diidentifikasi dan diklasifikasikan menurut tipe gen recombinase (ccr), dan gen kompleks *mec*. Semua tipe SCCmec mengandung gen *mecA* (dengan pengecualian tipe XI, yang

mengandung *mecC* homolog). Gen *mecA* yang mengkode *penicillin binding protein* 2a (PBP2a) pada peptidoglikan transpeptidase. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah untuk sebagian besar antibiotik β -laktam yang menghambat fungsi dari empat *penicillin binding protein* (PBP) *S. aureus* (PBP1, PBP2, PPB3 dan PBP4), PBP2a dapat mengambil alih fungsi transpeptidase dari biosintesis peptidoglikan (Hartman and Tomasz, 1984).

Kontrol utama ekspresi *mecA* tergantung pada regulator yang disandikan oleh *mecI* dan *mecR1* (Hiramatsu *et al.*, 1992; Arêde *et al.*, 2012). Gen *mecR1* mengkodekan protein transduksi sinyal terikat-membran (MecR1) sementara *mecI* mengkodekan regulator transkripsi (Mecl) (Sharma *et al.*, 1998). MecR1 dan Mecl masing-masing memiliki homologi sekuen protein tinggi dengan protein BlaR1 dan Blal. Gen pengkode BlaR1 dan Blal merupakan gen regulator yang masing-masing terlibat dalam ekspresi yang diinduksi dari gen β -laktamase (*blaZ*) pada plasmid *Staphylococcus aureus* (Zhang *et al.*, 2001). Gen *blaZ* memiliki struktur dan mekanisme yang serupa dengan gen *mecA* (Song *et al.*, 1987). Wilayah operator cukup mirip untuk memungkinkan *Blal* untuk mengatur ekspresi PBP2a (Gregory *et al.*, 1997). Akibatnya, kehadiran plasmid yang membawa gen pengatur *blaZ* dapat membuat ekspresi PBP2a diinduksi di bawah kendali BlaR1 dan Blal, sebuah situasi yang umumnya terjadi pada isolat klinis MRSA (Hackbarth and Chambers, 1993).



Gambar 2.23 Sistem regulasi yang mengontrol ekspresi β -lactamase dan PBP2a (Wilke, Hills, Zhang, et al., 2004)

2.10. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Berbagai metode laboratorium dapat digunakan untuk mengevaluasi atau menyaring aktivitas antimikroba *in vitro* dari ekstrak atau senyawa murni. Metode yang paling dikenal dan mendasar adalah difusi agar dan pengenceran/dilusi. Metode lain digunakan terutama untuk pengujian antijamur, seperti teknik makanan beracun. Untuk mempelajari lebih lanjut efek antimikroba suatu agen secara mendalam, direkomendasikan melakukan *time kill test*, dan metode *flow cytofluorometric*, yang memberikan informasi tentang efek penghambatan (bakterisida atau bakteriostatik) (tergantung waktu atau bergantung konsentrasi) dan kerusakan sel yang ditimbulkan pada mikroorganisme uji (Balouiri *et al.*, 2016).

1. Metode Difusi

Uji difusi agar yang dikembangkan pada tahun 1940, adalah metode resmi yang digunakan di banyak laboratorium mikrobiologi klinis untuk pengujian kerentanan antimikroba rutin. Saat ini, banyak standar yang diterima dan disetujui diterbitkan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) untuk pengujian bakteri dan jamur. Dalam prosedur yang terkenal ini, pelat agar diinokulasi dengan inokulum mikroorganisme uji. Kemudian, cakram kertas saring (berdiameter sekitar 6 mm), yang berisi senyawa uji pada konsentrasi yang diinginkan, ditempatkan pada permukaan agar. Cawan Petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Umumnya, agen antimikroba berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian diameter zona penghambatan diukur. Tabel 2.2. berikut menunjukkan media tumbuh, suhu, masa inkubasi, dan ukuran inokulum yang dipersyaratkan oleh standar CLSI.

Tabel 2.2 Media Tumbuh, Suhu, Masa Inkubasi, dan Ukuran Inokulum yang dipersyaratkan oleh Standar CLSI

Table 1

Culture media, microbial inoculum size and incubation conditions for antimicrobial susceptibility testing methods as recommended by CLSI.

Methods	Microorganism	Growth medium	Final inoculum size	Incubation temperature (°C)	Incubation time (h)
Disk-diffusion method	Bacteria	MHA	(0.5 McFarland) (1–2) × 10 ⁸ CFU/mL	35 ± 2	16–18
	Yeast	MHA + GMB ^a	(0.5 McFarland) (1–5) × 10 ⁶ CFU/mL	35 ± 2	20–24
	Molds	Non-supplemented MHA	(0.4–5) × 10 ⁶ CFU/mL	–	–
	Bacteria	MHB	5 × 10 ³ CFU/mL	35 ± 2	20
Broth microdilution	Yeast	RPMI 1640 ^b	(0.5–2.5) × 10 ³ CFU/mL	35	24–48
	Molds	RPMI 1640 ^b	(0.4–5) × 10 ⁴ CFU/mL	35	48 for most fungi
	Bacteria	MHB	5 × 10 ³ CFU/mL	35 ± 2	20
Broth macrodilution	Yeast	RPMI 1640 ^b	(0.5–2.5) × 10 ³ CFU/mL	35	46–50
	Molds	RPMI 1640 ^b	(0.4–5) × 10 ⁴ CFU/mL	35	48 for most fungi
	Bacteria	MHA	10 ⁴ CFU/spot	35 ± 2	16–20
Agar dilution	Bacteria	MHA	10 ⁴ CFU/mL	35 ± 2	0, 4, 18, and 24
Time-kill test	Bacteria	MHB	5 × 10 ³ CFU/mL	35 ± 2	0, 4, 18, and 24

MHA: Mueller Hinton Agar. MHB: Mueller Hinton Broth.

^a GMB: the medium was supplemented with 2% glucose and 0.5 mg/mL methylene blue.

^b RPMI 1640: Roswell Park Memorial Institute medium (with glutamine, without bicarbonate, and with phenol red as a pH indicator) was 1640, buffered to pH 7.0 with MOPS (morpholine propane sulfonic acid) at 0.165 M.

2. Kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi

Teknik ini menggabungkan TLC dengan metode deteksi biologis dan kimia. Sejumlah penelitian telah dilakukan pada skrining ekstrak, terutama ekstrak tumbuhan, untuk aktivitas antibakteri dan antijamur dengan KLT-bioautografi. Ada tiga teknik bioautografi, yaitu difusi agar, bioautografi langsung dan uji overlay agar, untuk penyelidikan senyawa antimikroba dengan pendekatan ini.

a. Difusi agar

Dikenal juga sebagai metode kontak agar, salah satu teknik yang paling sedikit digunakan. Metode ini melibatkan transfer dengan difusi senyawa antimikroba dari kromatogram (KLT) ke petri disk agar yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang diuji. Setelah beberapa menit atau jam untuk memungkinkan difusi, kromatogram dikeluarkan dan petri disk diinkubasi. Zona penghambatan pertumbuhan akan muncul di tempat-tempat di mana senyawa antimikroba kontak dengan media agar.

b. Bioautografi langsung

Bioautografi langsung merupakan metode yang paling banyak diterapkan di antara ketiga metode ini. Pelat KLT yang telah dielusi, dicelupkan ke dalam atau disemprotkan dengan suspensi mikroba. Kemudian, bioautogram diinkubasi pada suhu 25 °C selama 48 jam dalam kondisi lembab. Untuk visualisasi pertumbuhan mikroba, garam tetrazolium sering digunakan. Garam ini akan menkonversi ke formazan berwarna intens yang sesuai oleh adanya dehidrogenase sel hidup. p-Iodonitrotetrazolium violet adalah reagen deteksi yang paling cocok. Garam-garam ini disemprotkan ke bioautogram, yang diinkubasi kembali pada 25 °C selama 24 jam atau pada 37 °C selama 3-4 jam. Media Mueller Hinton agar direkomendasikan untuk memberikan cukup media untuk memungkinkan kondisi terbaik pada pelat KLT dan menjaga kelembaban yang sesuai untuk pertumbuhan bakteri.

Bioautografi langsung dapat digunakan terhadap jamur atau bakteri. Metode ini adalah teknik termudah untuk mendeteksi zat antijamur, dan juga memberikan hasil yang konsisten untuk jamur penghasil spora seperti *Aspergillus*, *Penicillium* dan *Cladosporium*. Untuk

bakteri, strain *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sering digunakan untuk mengidentifikasi senyawa antibakteri.

c. Bioassay lapisan agar/Agar overlay bioassay

Juga dikenal sebagai bioautografi imersi, metode ini adalah hibrida dari kedua metode sebelumnya. Pelat KLT ditutupi dengan media cair agar-agar. Untuk memungkinkan difusi yang baik dari senyawa yang diuji ke dalam media agar, petri disk dapat ditempatkan pada suhu rendah selama beberapa jam sebelum inkubasi. Setelah inkubasi dalam kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji, pewarnaan dapat dilakukan dengan pewarna tetrazolium. Seperti bioautografi langsung, metode ini dapat diterapkan pada semua mikroorganisme seperti: *Candida albicans* dan jamur lainnya. Metode ini memberikan zona penghambatan pertumbuhan yang terdefinisi dengan baik dan tidak sensitif terhadap kontaminasi. Secara keseluruhan, KLT-bioautography adalah teknik sederhana, efektif dan murah untuk pemisahan campuran kompleks, dan pada saat yang sama, melokalisasi konstituen aktif pada plat KLT.

3. Penentuan KHM dengan Metode Dilusi (Pengenceran)

Metode pengenceran adalah yang paling tepat untuk penentuan nilai KHM (konsentrasi Hambat Minimal), karena dengan metode ini dapat diketahui perkiraan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar (pengenceran difusi agar) atau media cair (pengenceran makro atau pengenceran mikro). Metode pengenceran media cair atau agar dapat digunakan untuk mengukur secara kuantitatif aktivitas antimikroba secara *in vitro* terhadap bakteri dan jamur. Nilai KHM yang tercatat didefinisikan sebagai konsentrasi terendah zat antimikroba yang diuji, yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam mg/mL atau mg/L. Ada banyak pedoman yang disetujui untuk pengujian kerentanan antimikroba pengenceran bakteri, ragi dan jamur berfilamen. Standar yang paling diakui disediakan oleh CLSI dan *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)*.

Prinsip metode ini adalah sampel diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, lalu masing-masing konsentrasi ditambah suspensi bakteri dalam media cair. Setelah inkubasi, diamati ada tidaknya pertumbuhan bakteri dengan melihat kekeruhan dari masing-masing konsentrasi sampel yang dibandingkan dengan kontrol.

Tes ini telah distandarisasi dengan baik dan dijelaskan dalam dokumen M26-A Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2015). Nilai KHM dilakukan dengan mengukur pertumbuhan bakteri patogen menggunakan

metode pengenceran pada medium cair menggunakan pelat mikrotiter 96 sumur. Sebanyak 50 μ l inokulum konsentrasi bakteri yang telah disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 ditambahkan secara horizontal di mikrotiter 96 sumur, dan sumur kontrol pertumbuhan berisi medium dengan konsentrasi bakteri yang diuji untuk memeriksa viabilitas bakteri. Pelat kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-20 jam. Saat ini selain evaluasi secara visual, penentuan KHM dapat dilakukan menggunakan spektrofotometri dengan membandingkan nilai absorban tiap konsentrasi pengujian (Balouiri *et al.*, 2016).

2.11. Pemisahan dan Pemurnian Senyawa Antibakteri

1. Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses penarikan senyawa-senyawa kimia dari hewan, tumbuhan, dan organisme lainnya menggunakan pelarut tertentu. Teknik yang umum digunakan dalam proses ekstraksi adalah maserasi, perkolası, sokletasi, perebusan dan lain-lain (Harborne, 1987).

Maserasi merupakan suatu proses penyarian secara sederhana dengan merendam bagian tumbuhan, hewan, dan organisme lain dengan pelarut dalam jangka waktu tertentu. Pelarut akan berdifusi menembus rongga sel yang memiliki zat aktif. Adanya perbedaan konsentrasi antara di luar dan di dalam sel menyebabkan larutan yang terpekat didesak keluar sel. Peristiwa tersebut terjadi berulang kali sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan zat aktif dalam sel dengan larutan di luar dan di dalam sel. Keuntungan dari metoda maserasi yaitu alat dan teknik penggerjaan sederhana serta dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil (Harborne, 1987).

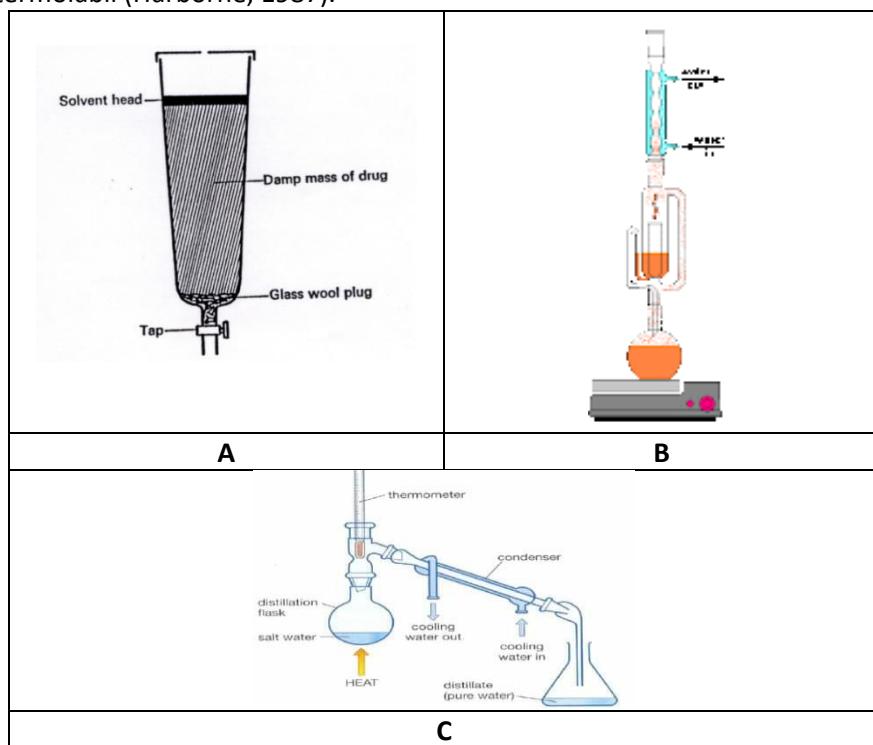
Perkolasi merupakan teknik penyarian senyawa kimia dengan menggunakan alat percolator (Gambar 2.24A). Prinsipnya hampir sama dengan teknik maserasi. Perbedaannya adalah dalam hal pelarut yang digunakan. Pada perkolası, sampel diletakkan pada alat perkulator dan pelarut mengalir secara kontinu. Proses ekstraksi dihentikan apabila larutan yang keluar dari alat perkulator sudah tidak berwarna lagi atau sudah tidak terdeteksi lagi dengan pemeriksaan golongan senyawa yang diinginkan. Keuntungan menggunakan metode ini adalah proses ekstraksi dan fraksinasi dapat langsung dilakukan karena menggunakan tipe pelarut yang sesuai kepolarannya. Kelemahan perkolası ini adalah pelarut yang digunakan cukup banyak (Harborne, 1987).

Sokletasi adalah proses penyarian senyawa kimia menggunakan pelarut organik menggunakan alat soklet (Gambar 2.24B). Pada sokletasi

pelarut dan sampel diletakkan secara terpisah. Prinsip metode ini adalah penyarian berulang dengan menggunakan pelarut yang relatif lebih sedikit. Namun, kelemahan cara ini adalah tidak bisa digunakan untuk senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Harborne, 1987).

Destilasi merupakan proses penyarian untuk pemisahan zat yang mudah menguap seperti minyak atsiri (Gambar 2.24C). Proses isolasi dapat dilakukan dengan cara destilasi baik destilasi normal pada suhu dan tekanan udara normal maupun secara *in vacuo* (dengan tekanan rendah sehingga pelarut akan menguap di bawah titik didihnya) (Harborne, 1987).

Perebusan merupakan teknik penyarian menggunakan pelarut air. Pada proses ini sampel direndam dengan pelarut (air) kemudian dipanaskan sampai mendidih. Metode perebusan merupakan metode tradisional dan jarang digunakan pada saat sekarang ini karena proses penyarian kurang sempurna dan tidak dapat dilakukan untuk senyawa termolabil (Harborne, 1987).



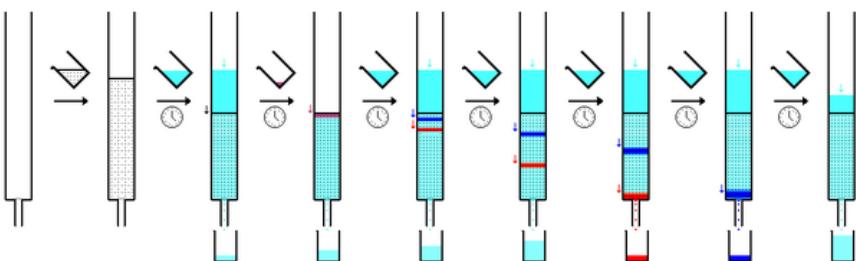
Gambar 2.24 A. Perkolator, B. Sokletasi, C. Destilasi uap

2. Fraksinasi

Fraksinasi merupakan proses pemisahan kandungan senyawa bahan alam berdasarkan perbedaan sifat kelarutannya dalam kondisi tertentu. Pada prinsipnya proses pemisahan dilakukan dengan menggunakan dua pelarut yang tidak bercampur. Pelarut yang umum digunakan dalam proses fraksinasi adalah n-heksan, etil asetat, kloroform, dan butanol. Syarat dalam melakukan fraksinasi adalah kandungan pelarut pengekstrak harus dihilangkan atau dibuat serendah mungkin. Senyawa-senyawa nonpolar akan larut dalam pelarut yang bersifat polar juga. Masing-masing hasil fraksinasi dapat dilakukan secara khusus atau dapat langsung dikentalkan menggunakan alat destilasi vakum atau *rotary evapotarator* (Harborne, 1987).

3. Kromatografi Kolom

Merupakan metode terbaik untuk pemisahan campuran dalam jumlah besar ($> 1 \text{ g}$). Metode ini disebut juga kromatografi cair preparatif, pita senyawa linearut bergerak melalui kolom dengan laju yang berbeda, memisah, dan dikumpulkan berupa fraksi ketika keluar dari alas kolom (Gambar 2.25). Ukuran kolom dan banyaknya penjerap yang dipakai ditentukan oleh bobot campuran linearut yang akan dipisahkan. Ukuran partikel fase diam biasanya 63-250 μm (dengan gaya tarik bumi) dan 40-63 μm (untuk kolom pakai tekanan). Jenis adsorben atau penyerap yang biasa digunakan untuk kromatografi kolom adalah silika gel, alumina, dan *sephadex* (Gritter, *et al.*, 1991).



Gambar 2.25 Metode pemisahan campuran dengan kromatografi kolom

4. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi lapis-tipis (KLT) merupakan salah satu metoda pemisahan senyawa yang berguna untuk memonitor hasil fraksi dari kromatografi kolom dengan melihat bercak yang naik pada plat KLT.

Biasanya KLT dilakukan dengan cara menotolkan ekstrak dan fraksi pada plat KLT kemudian ekstrak naik dalam suatu bejana yang dindingnya dilapisi kertas saring sehingga atmosfer di dalam bejana jenuh dengan fase pelarut dan menghasilkan bercak lebih bundar dan lebih baik. Hasil KLT ini dapat dilihat melalui harga Rf (faktor retensi). Angka Rf bernilai antara 0,00 dan 1,00 dan hanya dapat ditentukan dua desimal (Gritter, et al., 1991).

a. Fase Diam KLT

Fase diam yang digunakan dalam KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran rata-rata partikel fase diam dan semakin sempit kisaran ukuran fase diam, maka semakin baik kinerja KLT dalam hal efisiensinya dan resolusinya (Gandjar & Rohman, 2013).

Penjerap yang paling umum digunakan adalah silika dan serbuk selulosa, sementara mekanisme sorpsi yang utama pada KLT adalah partisi dan adsorbsi. Lapisan tipis yang digunakan sebagai penjerap juga dapat dibuat dari silika yang telah dimodifikasi, resin penukar ion, gel ekslusif, dan siklodekstrin yang digunakan untuk pemisahan kiral (Gandjar & Rohman, 2013).

b. Fase Gerak pada KLT

Fase gerak pada KLT lebih sering dengan mencoba-coba karena waktu yang diperlukan hanya sedikit. Pelarut pada fase gerak KLT harus berupa pelarut kemurnian tinggi. Profil pemisahan pada KLT dapat dimodifikasi dengan mengubah rasio distribusi dengan mengubah komposisi fase gerak dengan memperhatikan polaritas dan kekuatan elusi. Pemisahan optimal pada KLT akan diperoleh jika sampel ditotol dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda. Sehingga, metode penotolan sampel diperlukan untuk memperoleh hasil dengan reproducibilitas baik. Daya elusi fase gerak harus diatur sedemikian rupa sehingga harga Rf terletak antara 0,2-0,8 untuk memaksimalkan pemisahan. Untuk pemisahan dengan menggunakan fase diam polar seperti silika gel, polaritas fase gerak akan menentukan kecepatan migrasi solut yang berarti juga menentukan nilai Rf (Gandjar & Rohman, 2013).

c. Aplikasi Penotolan Sampel

Pemisahan pada kromatografi lapis tipis yang optimal akan diperoleh hanya jika menotolkan sampel dengan ukuran bercak sekecil dan sesempit mungkin. Sebagaimana dalam prosedur kromatografi yang lain, jika sampel yang digunakan terlalu banyak maka akan

menurunkan resolusi. Penotolan sampel yang tidak tepat akan menyebabkan bercak yang menyebar dan puncak ganda (Gandjar & Rohman, 2013).

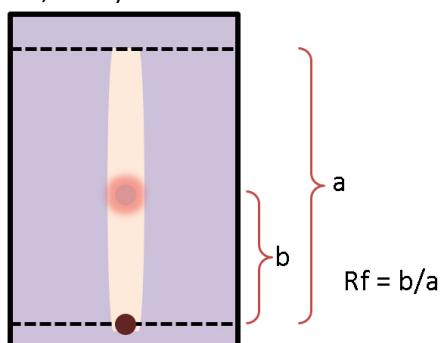
d. Pengembangan (Elusi KLT)

Bila sampel telah ditotolkan maka tahap selanjutnya adalah mengembangkan sampel tersebut dalam suatu bejana kromatografi yang sebelumnya telah dijenahi dengan uap fase gerak. Tapi bagian bawah lempeng lapis tipis yang telah ditotoli sampel dicelupkan ke dalam fase gerak kurang lebih 0,5-1 cm. Tinggi fase gerak dalam bejana harus di bawah lempeng yang berisi totolan sampel. Selama proses elusi bejana kromatografi harus tertutup rapat dan sedapat mungkin volume fase gerak sedikit mungkin, tetapi mampu mengelusi lempeng sampai ketinggian lempeng yang ditentukan (Gandjar & Rohman, 2013).

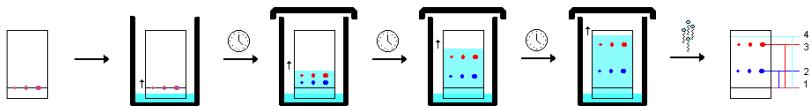
e. Deteksi Bercak Noda KLT

Bercak pemisahan pada KLT umumnya merupakan bercak yang tidak berwarna. Untuk penentuannya dapat dilakukan secara kimia, fisika, maupun biologi. Cara kimia yang biasa digunakan adalah dengan mereaksikan bercak dengan suatu pereaksi melalui cara penyemprotan hingga bercak menjadi jelas. Cara fisika yang dapat digunakan untuk menampakan bercak adalah dengan pencacahan radioaktif dan fluoresensi sinar ultraviolet (Gandjar & Rohman, 2013).

Mengamati lempeng di bawah lampu UV yang dipasang panjang gelombang emisi 254 nm atau 336 nm untuk menampakkan solut sebagai bercak yang gelap atau bercak yang berfluoresensi seragam. Lempeng yang akan digunakan dapat dibeli dalam bentuk lempeng yang sudah diberi dengan senyawa fluoresensi yang tidak larut yang dimasukkan kedalam fase diam untuk memberikan dasar fluoresensi (Gandjar & Rohman, 2013).



Gambar 2.26 Penentuan Retention Faktor (Rf) pada plat KLT



Gambar 2.27 Metode penentuan profil KLT

5. Pemurnian

Senyawa hasil isolasi jarang didapatkan senyawa murni, biasanya dicemari oleh senyawa lain selama isolasi. Salah satu pemurniannya adalah dengan rekristalisasi. Rekristalisasi yaitu suatu cara pemurnian berdasarkan perbedaan kelarutan zat utama yang akan dimurnikan dengan senyawa minor dalam suatu pelarut tunggal atau campuran pelarut yang cocok (Harborne, 1987).

Teknik pemurnian lain agen antibakteri dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom silika gel. Kolom yang telah berisi silika dibiarkan selama semalam, agar silika dapat terbentuk dengan rapi dalam kolom kromatografi. Silika gel digunakan sebagai penjerap/adsorben yaitu fase padat yang bertindak sebagai fase diam dalam kromatografi. Ada beberapa penjerap yang paling umum dipakai yaitu (Gritter, *et al.*, 1991):

- Silika Gel; paling banyak digunakan, sebagian besar silika gel bersifat asam, maka senyawa yang bersifat asam lebih mudah dipisahkan dengan penjerap ini.
- Alumina (Aluminium oksida); bersifat sedikit basa, sehingga sering dipakai untuk pemisahan senyawa yang bersifat basa.
- Kiselgur (tanah diatom) dan selulosa; Umumnya dipakai untuk pemisahan senyawa polar seperti asam amino, karbohidrat, nukleotida, dan berbagai zat hidrofil lainnya (Gritter, *et al.*, 1991).

2.12. Karakterisasi dan Penentuan Struktur Senyawa Antibakteri

Setiap kali senyawa baru ditemukan di alam, strukturnya harus ditentukan. Menentukan struktur senyawa organik adalah proses yang sulit dan memakan waktu sampai pertengahan abad ke-20. Namun dengan adanya teknik yang mutakhir dan instrumen khusus saat ini yang secara rutin digunakan, maka masalah tersebut menjadi lebih mudah diselesaikan. Dalam penentuan struktur senyawa kimia ada empat teknik analisis penting yang perlu dilakukan; spektrometri massa (MS), spektroskopi inframerah (IR), spektroskopi ultraviolet (UV), dan spektroskopi resonansi magnetik inti (RMI).

Semua Teknik analisis tersebut mampu menjawab pertanyaan terkait identitas senyawa kimia yang diuji.

Spektrometri massa: Berapa berat dan rumusnya?

Spektroskopi inframerah: Gugus fungsi apa yang ada?

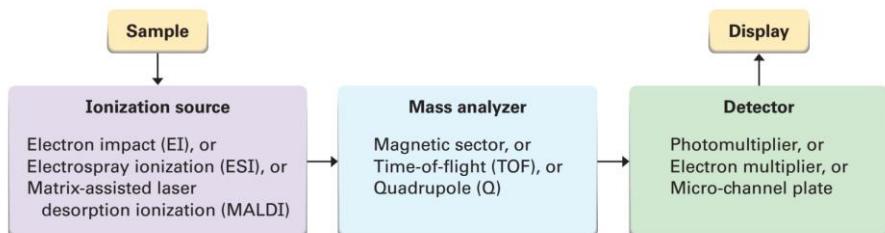
Spektroskopi ultraviolet: Apakah ada sistem elektron π terkonjugasi?

spektroskopi resonansi magnet inti: Bagaimana kerangka karbon-hidrogen?

1. Spektroskopi Massa

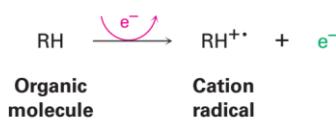
Spektrometri massa (MS) adalah teknik untuk mengukur massa, yaitu berat molekul (MW), dari suatu molekul. Selain itu, alat ini seringkali digunakan untuk mendapatkan informasi struktural tentang molekul dengan mengukur fragmen massa yang dihasilkan ketika molekul dipecah.

Lebih dari 20 jenis spektrometer massa komersial tersedia tergantung pada aplikasi, tetapi semuanya memiliki tiga bagian dasar: 1. sumber ionisasi, di mana molekul sampel diberi muatan listrik, 2. penganalisis massa di mana ion dipisahkan berdasarkan rasio massa dan muatan, dan 3. detektor di mana ion yang terpisah diamati dan dihitung.



Gambar 2.28 Bagian dasar alat spektrometer massa yang paling umum digunakan

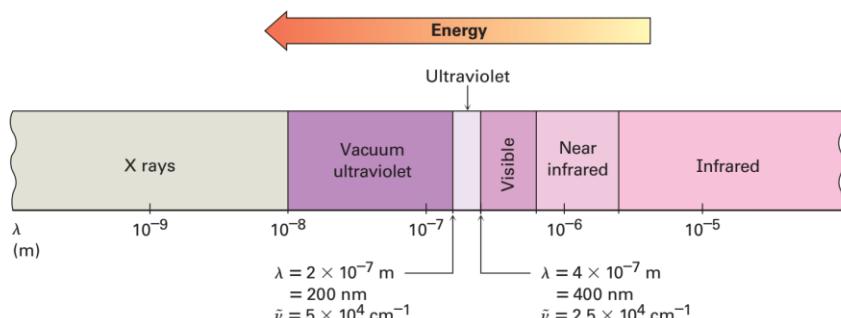
Sejumlah kecil sampel diuapkan ke dalam sumber ionisasi, di mana sampel kemudian dibombardir oleh aliran elektron berenergi tinggi. Energi berkas elektron dapat bervariasi tetapi umumnya sekitar 70 elektron volt (eV), atau 6700 kJ/mol. Ketika elektron berenergi tinggi menabrak molekul organik/sampel, elektron valensi terdislokasi dan terlepas dari molekul, menghasilkan radikal kation—kation karena molekul telah kehilangan elektron sehingga bermuatan positif; berbentuk radikal karena molekul memiliki jumlah elektron ganjil.



Pemboman elektron mentransfer begitu banyak energi sehingga sebagian besar radikal kation terfragmentasi. Fragment pecah menjadi bagian yang lebih kecil, beberapa di antaranya mempertahankan muatan positif dan beberapa di antaranya netral. Fragmen kemudian mengalir melalui pipa melengkung dalam medan magnet yang kuat, yang membelokkannya ke jalur yang berbeda sesuai dengan rasio massa terhadap muatan (m/z). Fragmen netral tidak dibelokkan oleh medan magnet dan hilang di dinding pipa, tetapi fragmen bermuatan positif diurutkan oleh spektrometer massa ke detektor, yang mencatatnya sebagai puncak pada berbagai rasio m/z . Karena jumlah muatan z pada setiap ion biasanya 1, nilai m/z untuk setiap ion hanyalah massanya m . Massa hingga sekitar 2500 unit massa atom (sma) dapat dianalisis dengan instrumen jenis ini.

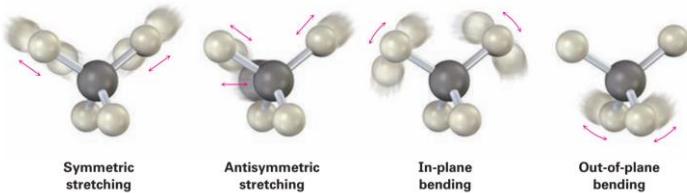
2. Spektroskopi Inframerah

Dalam spektroskopi inframerah (IR), wilayah IR dari spektrum elektromagnetik mencakup rentang tepat di atas sinar tampak ($7,8 \times 10^{-7}$ m) hingga kira-kira 10^{-4} m, tetapi hanya bagian tengah dari $2,5 \times 10^{-6}$ m hingga $2,5 \times 10^{-5}$ m yang digunakan oleh ahli kimia organik. Panjang gelombang dalam wilayah IR biasanya diberikan dalam mikrometer ($1 \mu\text{m} = 10^{-6}$ m), dan frekuensi dinyatakan dalam bilangan gelombang daripada dalam hertz. Bilangan gelombang adalah kebalikan dari panjang gelombang dalam sentimeter dan karena itu dinyatakan dalam satuan cm^{-1} .



Gambar 2.29 Spektrum elektromagnetik inframerah (IR), dan daerah sekitarnya

Mengapa molekul organik menyerap beberapa panjang gelombang radiasi IR? tapi bukan yang lain? Semua molekul memiliki sejumlah energi dan bergerak konstan. Ikatannya meregang (*stretching*) dan berkontraksi, atom bergoyang maju mundur, dan getaran molekul lainnya terjadi. Beberapa jenis getaran yang muncul ditunjukkan pada gambar bawah ini:



Jumlah energi yang dikandung molekul tidak selalu berubah-ubah tetapi terkuantiasi. Artinya, molekul dapat meregang atau menekuk hanya pada frekuensi tertentu yang sesuai dengan tingkat energi tertentu. Ikatan C-H dengan panjang ikatan rata-rata 110 pm sebenarnya bergetar pada frekuensi tertentu, secara bergantian meregang dan berkontraksi seolah-olah ada pegas yang menghubungkan kedua atom.

Ketika sebuah molekul disinari dengan radiasi elektromagnetik, energi diserap jika frekuensi radiasi sesuai dengan frekuensi getaran. Hasil dari penyerapan energi ini adalah peningkatan amplitudo untuk getaran; dengan kata lain, "pegas" yang menghubungkan dua atom meregang dan memampatkan sedikit lebih jauh. Karena setiap frekuensi yang diserap oleh sebuah molekul sesuai dengan gerakan molekul tertentu, sehingga dapat ditemukan jenis gerakan apa yang dimiliki molekul dengan mengukur spektrum IR-nya. Dengan menafsirkan gerakan ini, maka dapat diketahui jenis ikatan (gugus fungsi) apa yang ada dalam molekul.

Interpretasi lengkap dari spektrum IR sulit karena sebagian besar molekul organik memiliki lusinan gerakan regangan dan pembengkokan ikatan yang berbeda, dan dengan demikian memiliki lusinan absorpsi. Di satu sisi, kompleksitas ini menjadi masalah, sehingga spektroskopii IR umumnya membatasi penggunaan untuk sampel murni dari molekul yang kecil—sedikit yang dapat dipelajari dari spektroskopii IR tentang biomolekul yang besar dan kompleks. Di sisi lain, kompleksitas ini berguna karena spektrum IR bertindak sebagai sidik jari unik suatu senyawa. Faktanya, wilayah kompleks spektrum IR, dari 1500 cm^{-1} hingga sekitar 400 cm^{-1} , disebut wilayah sidik jari. Jika dua sampel memiliki spektrum IR yang identik di daerah ini, maka keduanya hampir pasti merupakan senyawa yang identik.

Untungnya, kita tidak perlu menafsirkan spektrum IR sepenuhnya untuk mendapatkan informasi struktur yang berguna. Sebagian besar gugus fungsi memiliki pita serapan IR yang khas yang tidak banyak berubah dari satu senyawa ke senyawa lainnya. Penyerapan C=O keton hampir selalu dalam kisaran 1680 hingga 1750 cm^{-1} ; penyerapan O-H alkohol dalam kisaran 3400 hingga 3650 cm^{-1} ; penyerapan C=C dari alkena dalam kisaran 1640

hingga 1680 cm^{-1} ; dan seterusnya. Dengan mempelajari di mana karakteristik penyerapan gugus fungsi terjadi, dimungkinkan untuk mendapatkan informasi struktur dari spektrum IR.

Tabel 2.3 Daftar pita karakteristik IR beberapa gugus fungsional

TABLE 12-1 Characteristic IR Absorptions of Some Functional Groups					
Functional Group	Absorption (cm^{-1})	Intensity	Functional Group	Absorption (cm^{-1})	Intensity
Alkane C—H	2850–2960	Medium	Amine N—H	3300–3500	Medium
Alkene =C—H	3020–3100	Medium	C—N	1030–1230	Medium
	1640–1680	Medium	Carbonyl compound C=O	1670–1780	Strong
Alkyne ≡C—H	3300	Strong	Aldehyde	1730	Strong
	2100–2260	Medium	Ketone	1715	Strong
Alkyl halide C—Cl	600–800	Strong	Ester	1735	Strong
C—Br	500–600	Strong	Amide	1690	Strong
Alcohol O—H	3400–3650	Strong, broad	Carboxylic acid O—H	2500–3100	Strong, broad
C—O	1050–1150	Strong	Nitrile C≡N	2210–2260	Medium
Arene C—H	3030	Weak	Nitro		
Aromatic ring	1660–2000	Weak	NO ₂	1540	Strong
	1450–1600	Medium			

3. Spektroskopi Ultraviolet

Daerah ultraviolet spektrum elektromagnetik memanjang dari ujung panjang gelombang pendek daerah tampak ($4 \times 10^{-7}\text{ m}$) sampai ujung panjang gelombang panjang daerah sinar-X (10^{-8} m), tetapi rentang sempit dari $2 \times 10^{-7}\text{ m}$ sampai $4 \times 10^{-7}\text{ m}$ adalah bagian yang paling menarik bagi ahli kimia organik. Penyerapan di wilayah ini biasanya diukur dalam nanometer (nm), di mana $1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$. Jadi, kisaran ultraviolet yang diinginkan adalah dari 200 hingga 400 nm.

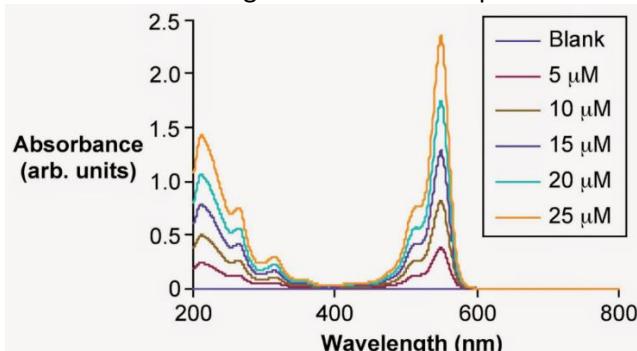
Jika sebuah molekul organik disinari dengan energi elektromagnetik, radiasi itu melewati sampel atau diserap, tergantung pada energinya. Dengan iradiasi IR, energi yang diserap sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan untuk meningkatkan getaran molekul. Dengan radiasi UV, energi yang diserap sesuai dengan jumlah yang dibutuhkan untuk mempromosikan elektron dari orbital berenergi lebih rendah ke orbital berenergi lebih tinggi dalam molekul terkonjugasi.

Spektroskopi UV-Visibel melakukan pengukuran interaksi antara radiasi elektromagnetik dan molekul atau atom dari suatu zat kimia pada panjang gelombang ultraviolet-visibel. Radiasi ultraviolet dengan energi yang cukup dapat mengeksitasi elektron terluar mencapai tingkat energi tertinggi yang disebabkan karena transisi antara tingkat energi elektron. Transisi dari

keadaan vibrasional bawah dalam keadaan elektron dasar suatu molekul ke keadaan elektron tereksitasi menunjukkan spektrum UV-Vis yang lebar.

Pengukuran absorban pada panjang gelombang didasarkan pada hukum Lambert-Beer yang dapat menentukan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi senyawa. Hukum ini menyatakan bahwa intensitas yang diteruskan oleh larutan zat penyerap berbanding lurus dengan tebal dan konsentrasi larutan. Hal ini berguna untuk mengkarakterisasi absorpsi, transmisi, dan refleksi berbagai senyawa. Spektrofotometer yang sesuai untuk pengukuran di daerah spektrum ultraviolet dan visibel terdiri dari suatu optik dengan kemampuan menghasilkan cahaya monokromatik pada panjang gelombang 200-800 nm (Gambar 2.30)

Faktor yang mempengaruhi pengukuran absorbansi UV-Vis, diantaranya adalah adanya gugus kromofor, pelarut, suhu, ion anorganik, dan pengaruh pH. Gugus kromofor adalah gugus pada suatu molekul yang dapat menyerap sinar ultraviolet dan sinar tampak. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan dapat mempengaruhi spektrum senyawa. Suatu senyawa dapat menyerap sinar UV secara maksimal pada satu pelarut dan menyerap minimal pelarut lain. Hal ini terjadi karena adanya sifat pelarut, sifat peta serapan, dan sifat solut. Selain itu, pengaruh pelarut, suhu juga berpengaruh pada penyerapan spektrum. Suhu rendah akan memberikan pita serapan lebih tajam dibandingkan suhu kamar karena resolusi vibrasional yang ditempati lebih sedikit dan tingkat interaksi solut-pelarut diminimalkan.



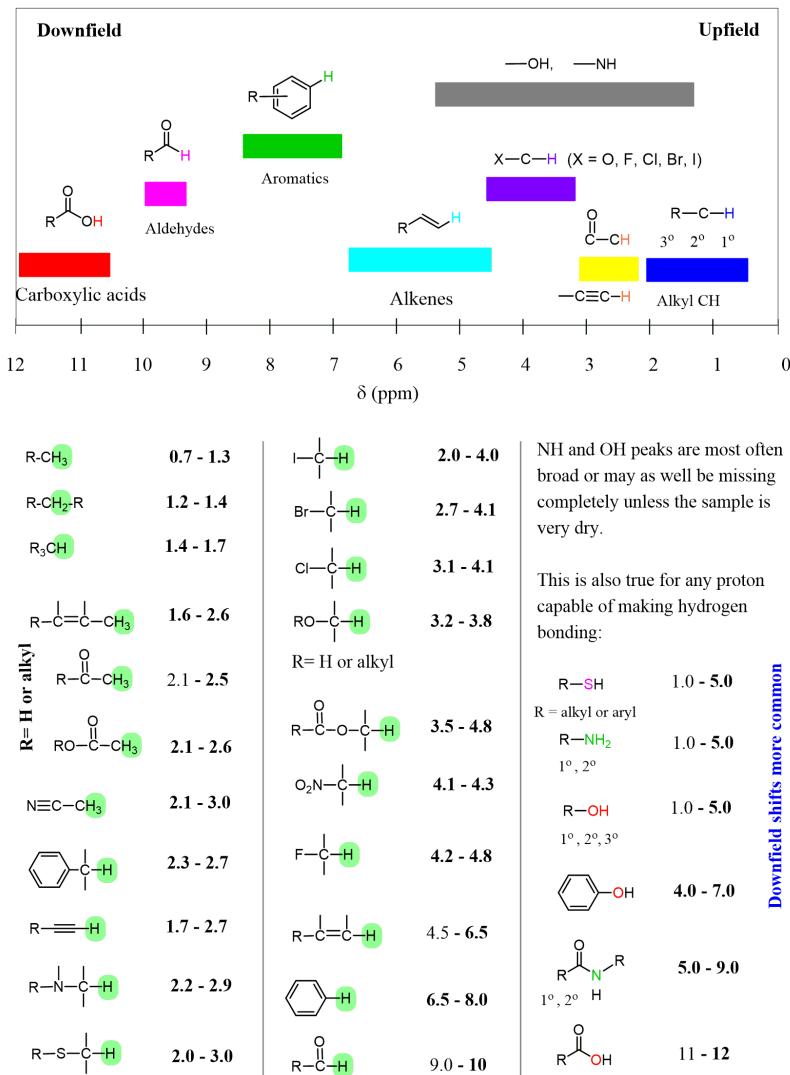
Gambar 2.30 Spektrum UV-Vis

4. Spektroskopi NMR (Williams & Fleming, 1995; Banu & Cathrine, 2015)

Spektroskopi NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*)/Resonansi Magnetik Inti adalah teknik spektroskopi untuk mengamati medan magnet lokal di sekitar inti atom. Sampel ditempatkan dalam medan magnet dan

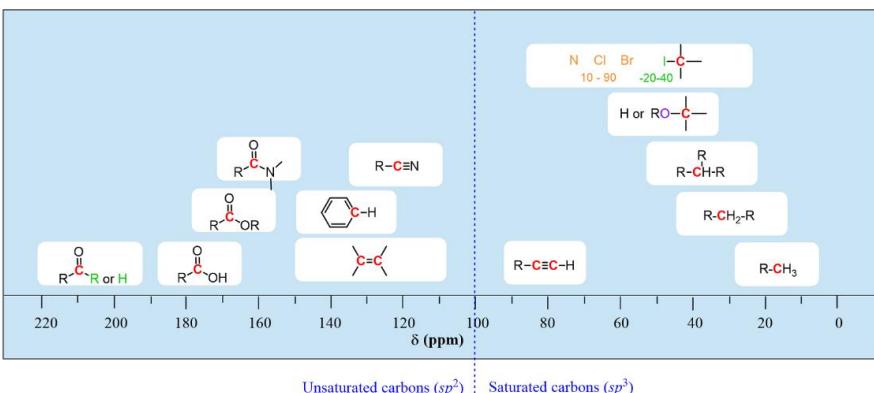
sinyal NMR dihasilkan oleh eksitasi sampel inti dengan gelombang radio menjadi resonansi magnetik nuklir, yang dideteksi dengan penerima radio yang sensitif. Medan magnet intramolekul di sekitar atom dalam molekul mengubah frekuensi resonansi, sehingga memberikan akses ke detail struktur elektronik molekul dan gugus fungsi individualnya. Karena medannya unik atau sangat khas untuk senyawa individu, dalam praktik kimia organik modern, spektroskopi NMR adalah metode definitif untuk mengidentifikasi senyawa organik monomolekul. Spektrum NMR unik, dapat dilacak secara analitis dan seringkali sangat dapat diprediksi untuk molekul kecil. Gugus fungsi yang berbeda jelas dapat dibedakan, dan gugus fungsi yang identik dengan substituen tetangga yang berbeda masih memberikan sinyal yang dapat dibedakan.

Struktur kimia molekul sederhana yang dihasilkan dalam bentuk satu dimensi disebut 1D-NMR. 1D-NMR dapat dibagi menjadi ^{13}C -NMR dan ^1H -NMR. ^{13}C -NMR digunakan untuk mengidentifikasi jumlah karbon yang terdapat pada suatu senyawa. ^1H -NMR digunakan untuk menentukan jumlah proton suatu senyawa serta lingkungan kimiawinya (Gambar 2.31). ^{13}C -NMR digunakan untuk mengidentifikasi jumlah karbon yang terdapat pada suatu senyawa (Gambar 2.32). 2D-NMR dapat menentukan struktur kimia molekul yang lebih rumit dan hubungan proton, karbon, dan atom lain suatu senyawa. 2D-NMR dapat dibagi menjadi ^1H - ^1H COSY (*Correlation Spectroscopy*), ^1H - ^{13}C COSY, HMBC (*Heteronuclear Multibond Connectivity*).



Gambar 2.31 Daftar Nilai Pergeseran Kimia NMR

^{13}C NMR Chemical Shift Values



Approximate Values of Chemical Shifts for ^{13}C NMR			
$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	0	* I-C	-20 - 40
$\text{R}-\text{CH}_3$	8 - 30	Br-C	25 - 65
$\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}$	15 - 55	Cl-C	35 - 80
R_2CH	20 - 60	O-C	40 - 80
R_4C	30 - 50	N-C	30 - 65
		$\text{C}=\text{C}$	100 - 150
		$\text{C}_6\text{H}_5\text{-C-H}$	110 - 170
		$\text{C}=\text{N}$	150 - 170
		$\text{C}\equiv\text{N}$	110 - 140
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{N}'$	155 - 185
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$	165 - 185
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{OR}$	190 - 220
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$	
		$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}$	

Gambar 2.32 Daftar Nilai Pergeseran Kimia NMR

2.13. Peranan Bioinformatika

Bioinformatika adalah suatu ilmu yang mempelajari tentang interaksi antara reseptor dengan akseptor. Ilmu bioinformatika memiliki tujuan untuk memahami proses biologi yang terjadi pada tubuh makhluk hidup, dengan topik penelitian utama meliputi penemuan dan perancangan obat, prediksi ekspresi gen dan struktur protein, pemodelan evolusi dan studi interaksi antara protein dengan protein atau protein dengan ligan (Pokkuluri *et al.*, 2014). Saat ini bioinformatika telah digunakan pada berbagai bidang ilmu dasar dan terapan lainnya seperti kedokteran, biologi modern dan farmasi. Kajian ilmu ini melibatkan analisis genomik, proteomik dan data klinis yang komparatif. Aplikasi ilmu ini sangat berguna dalam penemuan dan pengembangan obat yang dibantu oleh komputer (*computer-aided drug discovery and development*), untuk menemukan dan meningkatkan, serta mempelajari obat-obatan atau molekul kimia aktif yang memiliki aktivitas biologis.

Pada bioinformatika terdapat dua metode yang saling melengkapi sebagai alat dalam penemuan obat, yaitu; (i) berdasarkan senyawa yang diketahui

berikatan dengan target atau biasa disebut dengan ligand, (rancangan obat berdasarkan ligand, *ligand-based drug design* (LBDD)) dan (ii) berdasarkan struktur target baik berupa enzim maupun reseptor yang bertanggung jawab atas toksitas dan aktivitas suatu senyawa di dalam tubuh (rancangan obat berdasarkan struktur target; *structure-based drug design* (SBDD) (Datta, 2003).

Struktur protein target dapat dimodelkan dari data yang diperoleh dari struktur kristalnya maupun hasil analisis *nuclear magnetic resonance* (NMR) maupun data genomik (*bioinformatics*). Struktur protein hasil kristalografi dapat diakses di www.rcsb.org. SBDD memanfaatkan informasi dari struktur protein target guna mencari sisi aktif protein yang berikatan dengan senyawa. Berdasarkan prediksi, sisi aktif senyawa yang diharapkan berikatan dengan protein target tersebut dan memiliki aktivitas biologis (Luscombe, Greenbaum and Gerstein, 2001). Dengan memanfaatkan informasi dari struktur target maupun sifat fisikokimia ligand dapat dilakukan skrining uji interaksi senyawa-senyawa yang diketahui pada prediksi sisi aktif protein. Berdasarkan informasi yang dirancang senyawa baru yang diharapkan lebih poten dari senyawa-senyawa yang ada. Hal ini digunakan untuk studi interaksi ligand dengan protein targetnya.

Salah satu kelemahan *docking* dalam studi interaksi adalah asumsi struktur protein yang kaku, tidak menfasilitasi efek *induced-fit* dari interaksi protein dengan ligandnya. Fleksibilitas protein dan interaksinya dengan suatu senyawa dapat dianalisis dengan mengaplikasikan *Molecular Dynamics* (MD), simulasi yang melihat perubahan struktur suatu senyawa terhadap waktu berdasarkan parameter-parameter tertentu (Kitchen *et al.*, 2004).

2.13.1. Alat bantu dalam bioinformatika

Dalam proses bioinformatika diperlukan beberapa alat bantu yang berguna untuk menghasilkan suatu informasi bioinformatika yang tepat. Alat bantu yang digunakan dalam proses bioinformatika adalah:

1. Protein Data Bank adalah Database structural yang menyimpan data mengenai struktur protein. Sumber primer untuk data struktur protein adalah Protein Data Bank (PDB) yang tersedia pada URL <http://www.pdb.org/>. PDB merupakan arsip data structural tunggal tingkat dunia yang dibuat oleh *Research Collaboratory for Structural Bioinformatic* (RCSB), di Universitas New Jersey di Rutgers. Mesin pencarian yang terspesialisasi disediakan oleh grup database struktur makromolekul pada institut bioinformatika Eropa (EBI) dengan alamat <http://msd.ebi.ac.uk> dan juga kolaborasi riset untuk bioinformatika structural (RCSB) dengan alamat <http://www.rcsb.org>. Kedua alat ini dapat digunakan untuk mengambil data struktur pada format PDB. PDB merupakan data yang berisi koleksi struktur

tiga dimensi protein, DNA dan molekul lainnya yang telah dipublikasikan dan ditentukan secara eksperimen dengan menggunakan X-ray crystallography atau spektroskopi NMR (Bult, 1998).

2. *Molecular docking* (Penambatan molekul)

Molecular docking merupakan suatu teknik yang digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul. *Molecular docking* memiliki fungsi untuk memprediksi orientasi dari suatu molekul ke molekul yang lain ketika berikatan membentuk kompleks yang stabil (Capra *et al.*, 2009). Hubungan antara molekul biologis yang relevan seperti protein, asam nukleat, karbohidrat, dan lipid memainkan peran sentral dalam transduksi sinyal. Selanjutnya, orientasi relative dari dua pasangan yang mempengaruhi jenis sinyal yang dihasilkan. Oleh karena itu, *docking* sering digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan obat bermolekul kecil terhadap target proteinnya untuk memprediksi afinitas dan aktivitas molekul kecil. Maka *docking* memainkan peranan penting dalam desain obat yang rasional (Mukesh and Rakesh, 2011).

Tujuan dari *molecular docking* adalah untuk mencapai konformasi yang optimal untuk kedua protein dan ligan serta orientasi relatif antara protein dan ligan sehingga energi bebas dari sistem secara keseluruhan diminimalkan. *Molecular docking* membantu dalam mempelajari obat/ligan atau interaksi reseptor/protein dengan mengidentifikasi situs aktif yang cocok pada protein, mendapatkan geometri terbaik dari ligan-kompleks reseptor, dan menghitung energy interaksi dari ligan yang berbeda untuk merancang ligan yang lebih efektif (Mukesh and Rakesh, 2011).

Keberhasilan program *docking* tergantung pada dua komponen: pencarian alogaritma dan fungsi scoring (Mukesh and Rakesh, 2011). Penggunaan alogaritma berperan dalam penentuan konformasi (*docking pose*) yang paling stabil dari pembentukan kompleks (Funkhouser, 2007). Sedangkan fungsi scoring untuk menghitung afinitas kompleks ligan-protein reseptor yang terbentuk dan untuk mengurutkan peringkat senyawa (Reddy *et al.*, 2007). Identifikasi ini didasarkan pada teori bebas Gibbs. Nilai energi bebas Gibbs yang kecil menunjukkan bahwa konformasi yang berbentuk stabil, sedangkan nilai energi bebas yang besar menunjukkan tidak stabilnya kompleks yang terbentuk (Funkhouser, 2007). Gugus-gugus fungsional ligan akan berinteraksi dengan residu-residu asam amino protein reseptor sehingga membentuk ikatan intermolekul. Kekuatan ikatan inilah yang dihitung dan diperingkatkan (*ranking*) dan *Scoring function* (Mukesh and Rakesh, 2011).

2.13.2. Autodock

Autodock adalah salah satu *software* yang berlisensi free yang digunakan untuk penambatan ligan dengan protein target yang efektif, cepat dan akurat. Autodock terdiri dari dua program utama, yaitu *Autodock* dan *Autogrid*. Autodock untuk melakukan penambatan molekuler ligand dan protein target dengan *set grid* yang terdeskripsi. Pendeskripsiannya dilakukan sebelumnya dengan Autogrid (Morris *et al.*, 2009).

2.13.3. AutoDock Vina

AutoDock Vina adalah salah satu *software* yang tepat dan dapat diandalkan yang tersedia untuk penemuan obat, penambatan molekul dan skrining virtual yang dirancang dan ditetapkan oleh Dr. Oleg Trott. Vina, menawarkan fungsi yang beragam, tingkat kinerja yang tinggi dan meningkatkan akurasi untuk mempermudah penggunaan. *Software* ini dapat dioperasikan dengan bantuan *AutoDock Tools* (ADT) atau instruksi command line (Sandeep *et al.*, 2011). *Autodock* dan *AutoDock Vina* bisa digunakan dengan menggabungkan dengan antar muka di windows menggunakan PyRx dalam proses penambatan molekul dan melihat hasil penambatan molekul (“*AutoDock Vina – molecular docking and virtual screening program*,” n.d.).

2.13.4. PyMOL

PyMOL merupakan salah satu program visualisasi yang digunakan untuk memahami suatu struktur biologi dan dapat menampilkan gambar tiga dimensi yang berkualitas dan mampu menyajikan tampilan struktur dalam beberapa warna dari suatu molekul kecil maupun makromolekul seperti protein. Visualisasi sangatlah penting untuk memahami dan mendalami strukur suatu molekul. Perangkat lunak ini dikomersilkan oleh D eLano Scientific LLC (DeLano and Bromberg, 2004).

2.14. Studi Docking

Studi *docking* adalah penerapan model berbasis komputer untuk memprediksi orientasi yang paling sesuai dari ligan yang mengikat reseptor tertentu yang diinginkan (Kitchen *et al.*, 2004). Studi ini juga memiliki konsep mengintegrasikan kemajuan dalam biologi molekuler, bioteknologi, bioinformatika, matematika, kimia komputasi dan ilmu komputer untuk meningkatkan daya prediksi perangkat lunak *docking* (Kavlock *et al.*, 2008). Proses pengembangan obat yang lama dan mahal serta tingkat gesekan *new chemical entities* (NCE) sangat tinggi karena perbedaan biologis dari strain dan spesies yang diuji terutama pada tahap selanjutnya dari proses pengembangan

obat dengan berbagai fase uji klinis (Workman *et al.*, 2017). Sehingga dengan studi *docking* dapat menghemat waktu dan uang serta dapat memprediksi orientasi yang diinginkan dari beberapa molekul yang dirancang ke reseptor ketika terikat satu sama lain untuk membentuk kompleks yang stabil (Meng *et al.*, 2011).

Pada bidang farmakologi, studi ini dapat membantu untuk memprediksi konformasi obat (ligan) di situs aktif reseptor tertentu yang dapat memberikan pemahaman yang lebih baik tentang kompleksitas yang terjadi (Schlyer and Horuk, 2006). Studi keamanan praklinis yang menggunakan hewan secara *in vivo* memerlukan waktu yang lama, mahal dan sering kali memiliki prediktabilitas terbatas untuk hasil manusia (Simon-Hettich, Rothfuss and Steger-Hartmann, 2006). Banyak senyawa gagal dalam penelitian hewan karena adanya ketidakjelasan mengenai apakah senyawa tersebut merupakan agonis atau antagonis yang penting untuk merancang molekul spesifik untuk target tertentu (Kapetanovic, 2008). Mengembangkan metode *in silico* menjadi alternatif untuk evaluasi prediktif toksitas obat dengan meminimalkan pengujian menggunakan hewan, menghindari kebutuhan faktor ketidakpastian antarspesies, meningkatkan akurasi, sensitivitas, dan spesifitas, dan memprediksi efek merugikan yang tidak terdeteksi pada hewan serta menghemat waktu dan sumber daya (Simon-Hettich, Rothfuss and Steger-Hartmann, 2006).

BAB 3

METODOLOGI

3.1. Bahan Alat dan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah spon A. ingens IB151, jamur A. unguis, air laut steril, media SDA, beras, etil asetat, metanol, n-heksana, plat KLT, kertas saring, kapas, aluminium foil, sephadex, silica gel, media cair MHB, media agar NA, McFarland 0,5, DMSO, protein MRSA yang diunduh dari Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>), PCR Supermix (Invitrogen™), Gel Agarose (Thermo Scientific®), Gel Red (Thermo Scientific®), Tris Base Boric Acid EDTA (TBE) (Thermo Scientific®), DNA ladder (Pure Extreme®), Loading Dye (Pure Extreme ®), F-S mec, R-S mec, formaldehid 5%, phosphate buffer (PB) pH 7,4, ethanol (35%, 50%, 75% 95% and absolut) dan sputter emas.

Instrumen penelitian untuk isolasi dan karakterisasi senyawa-senyawa metabolit sekunder terdiri dari peralatan destilasi, rotary evaporator, lampu UV, kolom kromatografi, spektroskopi UV-VIS, spektroskopi $^1\text{H-NMR}$, spektroskopi $^{13}\text{C-NMR}$, spektroskopi LC-MS dan HPLC serta menggunakan spektroskopi dua dimensi seperti HMBC, HMQC dan QOSY.

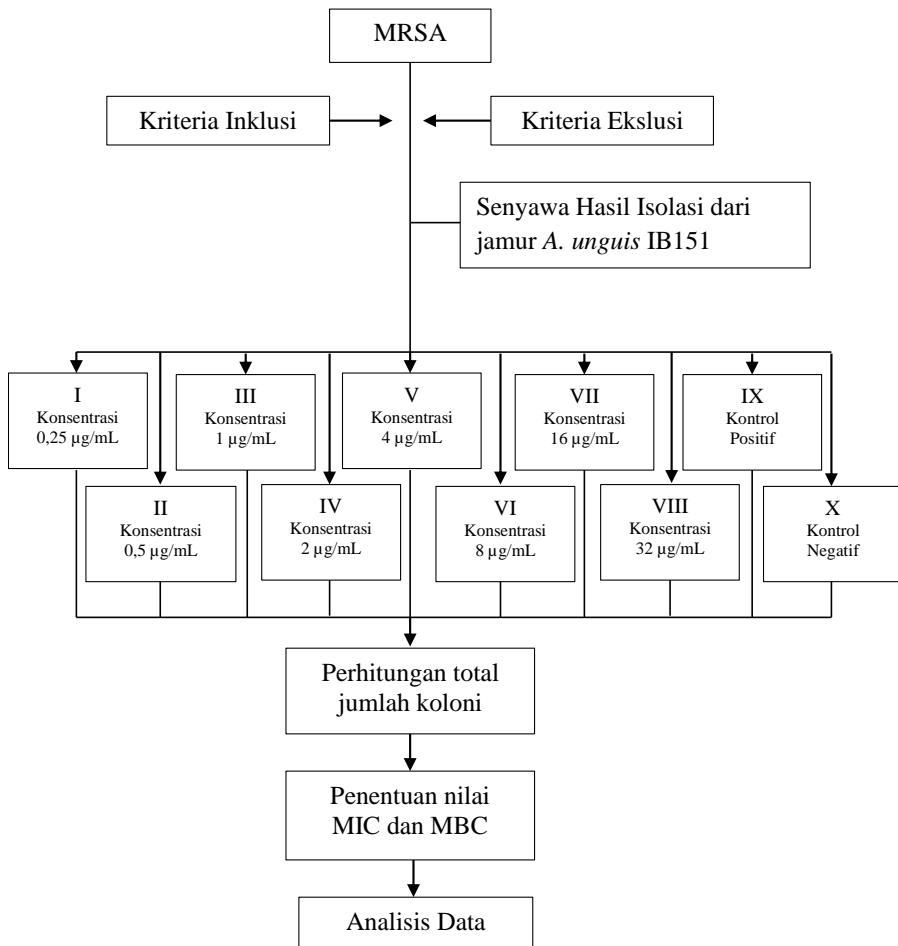
Instrumen dan alat penelitian pengujian aktivitas bakteri MRSA terdiri dari mikropipet, tip (kuning, biru dan putih), polymerase chain reaction (PCR), ELISA Reader, cell spreader, 96 well microplate, microtube, cawan petri dan incubator.

Instrumen dan software yang digunakan untuk simulasi molekuler docking terdiri dari Autodock Vina pada program PyRx 9.5., PyMol 2.3.1., dan LigPlot 2.1.

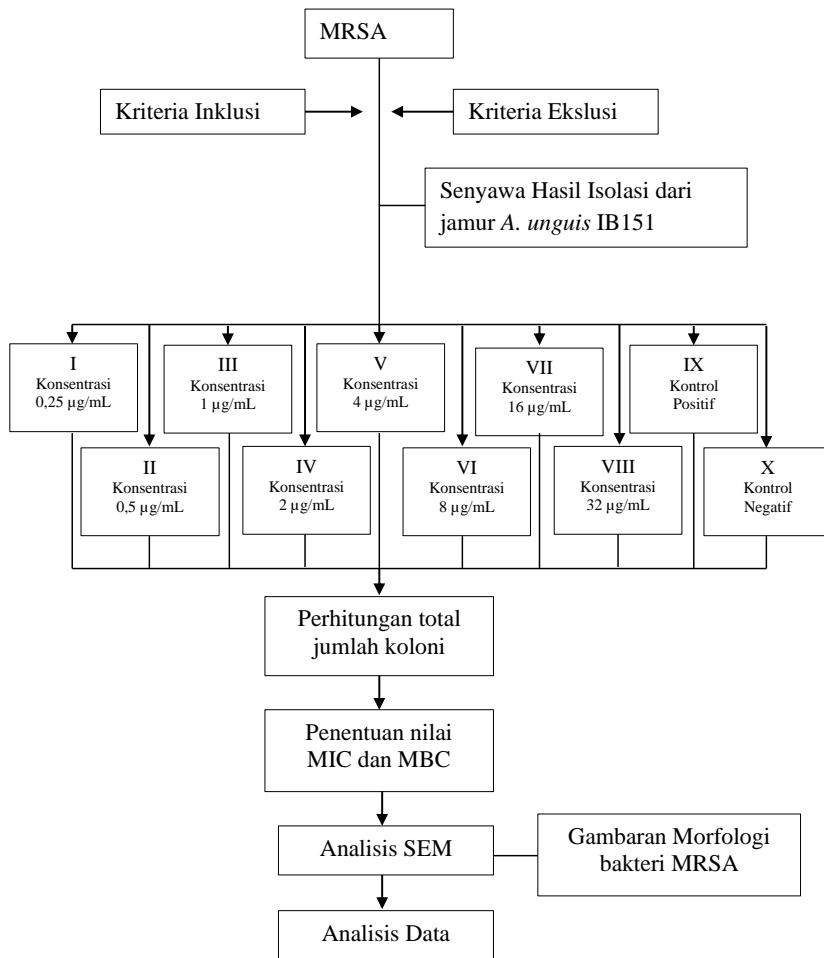
Instrumen penelitian untuk Scanning Electron Microscopy Hitachi S-3400N dan Ion Sputter coater Hitachi E-1045.

3.2. Prosedur Penelitian

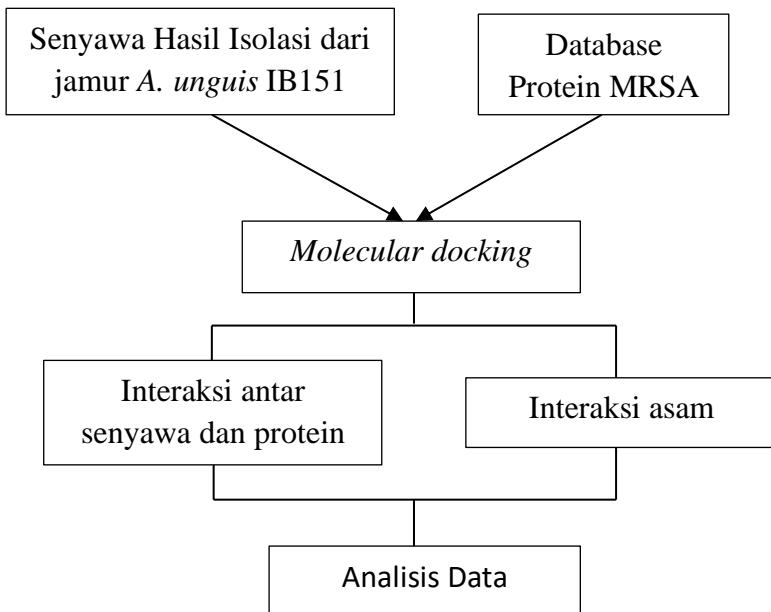
3.2.1. Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 3.1 Alur penentuan MIC dan MBC senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur *A. unguis* IB151 terhadap MRSA



Gambar 3.2 Alur penelitian gambaran kerusakan dinding sel bakteri MRSA akibat senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur *A. unguis* IB151



Gambar 3.3 Alur penelitian molecular docking antara senyawa aktif antibakteri hasil isolasi jamur *A. unguis* IB151 dan protein target MRSA

3.2.2. Koleksi Sampel Penelitian

Sampel penelitian diambil di perairan kawasan pulau Mandeh, kabupaten Pesisir Selatan, Sumatra Barat dengan menggunakan alat scuba pada kedalaman 10-12 meter. Tiga spons yang berbeda diambil sebanyak ± 200 gram dan diberi kode IB1, IB2 dan IB3. Masing-masing spons dicuci dengan air laut steril dan dimasukkan ke dalam plastik steril yang berisi air laut steril lalu disimpan ke dalam kotak pendingin. Spons segera dibawa ke laboratorium. Ketiga sampel tersebut diidentifikasi oleh Dr. Nicole J. De Voogd, Natural Biodiversity Center, Netherlands dan diperoleh hasil bahwa IB1 identik dengan *Acanthostrongylophora ingens*, IB2 adalah *Xestospongia exigua* dan IB3 adalah *Xestospongia testudinaria*.

3.2.3. Isolasi Jamur dari Sampel

Proses isolasi jamur dimulai dengan sterilisasi pada permukaan spons, dengan cara spons dibilas dengan air laut steril. Setelah itu spons dipotong-potong kecil lalu dihaluskan dengan menggunakan lumpang steril. Spons yang telah halus, ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer steril lalu dilarutkan dengan air laut steril sebanyak 100 mL dan dihomogenkan

menggunakan vortex. Setelah itu, dilakukan pengenceran dari konsentrasi 100 hingga konsentrasi 10^{-6} dimana 1 mL dari larutan spon konsentrasi 100 dipipet lalu dipipet ke tabung reaksi yang berisi 9 mL air laut steril yang selanjutnya dianggap sebagai konsentrasi 10^{-1} , dengan metode yang sama dilakukan hingga konsentrasi 10^{-6} . Kemudian sampel dinokulasikan dengan metode tuang menggunakan media SDA di dalam cawan petri sebanyak ± 15 mL, lalu diambil sebanyak 1 mL dari setiap pengenceran untuk dinokulasikan pada media SDA dalam cawan petri tersebut secara aseptik. Kemudian dinkubasi pada suhu $28\pm2^\circ\text{C}$ di dalam inkubator selama 5-7 hari (Situmorang, 2013). Koloni yang memiliki bentuk dan warna yang berbeda dengan koloni lainnya dapat dianggap sebagai isolat yang berbeda. Kemudian dilakukan pemurnian sampai didapatkan isolat murni.

3.2.4. Kultivasi Isolat Jamur

Isolat jamur simbion spons yang murni ditumbuhkan kembali ke dalam media beras dengan cara diambil sedikit bagian isolat murni tersebut lalu dipindahkan secara aseptik ke dalam Erlenmeyer yang berisi beras yang steril. Setelah itu diinkubasi pada suhu ruang selama 4-6 minggu hingga isolat jamur simbion spon tumbuh maksimal (Kjer, 2010).

3.2.5. Ekstrasi Senyawa Metabolit Sekunder dari Jamur

Jamur yang telah tumbuh maksimal selanjutnya dimaserasi dengan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Setelah dimaserasi selama 24 jam, pelarut etil asetat dipisahkan dari media kultur dengan cara disaring menggunakan kertas saring dan dilakukan tiga kali pengulangan. Filtrat etil asetat kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak etil asetat. Kemudian *didefatting* dengan dua pelarut yaitu metanol 90% dan n-heksana menggunakan corong pisah. Ekstrak metanol diuapkan dengan *in vacuo* hingga diperoleh fraksi metanol. Hasil tersebut diuji aktivitas antibakteri terhadap sejumlah bakteri patogen dan MRSA.

3.2.6. Skrining Aktivitas Antibakteri

Skrining untuk aktivitas antimikroba diuji terhadap *S. aureus*, *E. Coli*, MRSA dan *C. albicans* menggunakan difusi agar metode. Ekstrak diencerkan dengan dimetyl sulfoksida (DMSO) hingga mencapai konsentrasi 5%, 3%, dan 1%. Satu selembar kertas cakram steril (6 mm) direndam dalam masing-masing EtOAc konsentrasi ekstrak. DMSO digunakan untuk kontrol negatif dan gentamicin disk sebagai kontrol positif untuk bakteri dan nistatin disk sebagai

kontrol positif untuk jamur. Zona hambat (mm) adalah diukur setelah inkubasi pada suhu 37 ° C selama 18-24 jam (Bauer *et al.*, 1959).

3.2.7. Kultivasi dan Isolasi Senyawa Antibakteri

Senyawa bioaktif akan disolusi dari fraksi bioaktif menggunakan metode kromatografi kolom berdasarkan metode gradien elusi. Fraksi yang memberikan pola noda yang sama di plat KLC akan digabungkan dan ditentukan bioaktivitasnya. Pemurnian lebih lanjut dapat dilakukan dengan rechromatography atau dengan kristalisasi. Senyawa bioaktif yang murni akan dielusidasi strukturnya dan dilanjutkan dengan studi bioaktivitas lanjutan seperti untuk menentukan KHM

3.2.8. Karakterisasi dan Penentuan Struktur Senyawa Antibakteri

Pada tahap ini senyawa murni yang diperoleh diuji kemurniannya dengan mengukur titik leleh dan juga analisis KLT pada tiga macam sistem eluen. Data spektroskopi untuk penetapan struktur diperoleh dengan mengukur senyawa murni melalui alat spektroskopi UV, FT-IR, MS dan NMR.

3.2.9. Deteksi bakteri MRSA

3.2.9.1. Amplifikasi Gen *mec* MRSA dengan PCR (Sanches *et al.*, 2000)

Amplifikasi gen *mec* MRSA dilakukan dengan menggunakan primer yaitu primer F-S Mec (5'-ACT GCT ATC CAC CCT CAA AC-3') dan primer F-R Mec (5'-CTG GTG AAG TTG TAA TCT GG-3') dengan ukuran 163 bp. PCR mix disiapkan dengan mencampurkan 4 µL DNA template, 1 µL Foward primer, 1 µL Reverse Primer, 24 µL GoTaq® Green Master Mix dan 20 µL Nuclease free water. Selanjutnya dispindown dan dimasukkan dalam mesin PCR. Proses amplifikasi dilakukan selama 35 siklus dengan pengaturan program PCR sesuai dengan tabel berikut:

Tabel 3.1 Pengaturan Program Mesin PCR

Tahapan dalam siklus	Temperatur (°C)	Waktu
Denaturasi Awal	95	15 menit
Denaturasi	95	30 detik
Annealing	55	30 detik
Ekstensi	72	10 menit
Ekstensi Akhir	72	5 menit

3.2.9.2. Pemeriksaan Hasil Amplifikasi DNA Dengan Metode Elektroforesis

1. Pembuatan Gel Agarosa 0,8%

0,4 g agarosa dimasukkan ke dalam beaker glass dan larutkan dengan menambahkan 50 mL buffer TBE 1X. Beaker glass ditutup dan dipanaskan dengan microwave selama tiga menit hingga agarosa larut sempurna. Biarkan beaker glass dalam keadaan terbuka hingga agak dingin. Selanjutnya tambahkan 0,5 μ L pewarna gel (*Gel Red*) dan diaduk hingga rata. Larutan agarosa tersebut dituang kedalam cetakan yang telah dipasang comb dan didiamkan hingga mengeras, kemudian comb diangkat sehingga terbentuk sumur pada gel agarosa.

2. Proses Elektroforesis dan Visualisasi Hasil Elektroforesis

Gel agarosa diletakkan di dalam loyang elektroforesis lalu tambahkan larutan TBE 1X hingga seluruh bagian gel terendam. Disiapkan 2 μ L loading dye pada lembaran parafilm. Selanjutnya ditambahkan 4 μ L hasil PCR dan dihomogenkan hingga ditandai adanya perubahan warna campuran menjadi biru tua. Campuran larutan tersebut dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa. Selanjutnya 6 μ L DNA Ladder 100 bp dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa yang terletak pada posisi paling kanan. Elektroforesis ditutup dan dilakukan proses elektroforesis selama 30 menit dengan tegangan 100 Volt. Setelah proses selesai, alat elektroforesis dimatikan. Dengan hati-hati gel dikeluarkan dan diletakkan diatas *Gel Documentation*. *Gel Documentation* dinyalakan dan pita DNA akan berpendar saat dikenai sinar UV. Hasil Penyinaran didokumentasikan dan dapat diamati pada layar komputer. Gen *mec* MRSA dinyatakan berhasil diamplifikasi jika muncul pita pada ukuran 163 bp.

3. Sekuensing Hasil Amplifikasi Gen *mec* MRSA

Sekuensing dilakukan dengan menyiapkan hasil amplifikasi gen *mec* MRSA sebanyak 50 μ L dan selanjutnya dikirim ke 1st Base Singapura. Sekeuensing DNA dilakukan dengan metode Sanger menggunakan Applied Biosystems BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1. Data hasil sekuensing kemudian dianalisis nilai kualitasnya menggunakan software *Sequencer Scanner* v2.1 (Applied Biosystems) dengan melihat nilai *Quality value* (QV), *Contiguous Read Length* (CRL) dan *Trace Score*.

3.2.9.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri senyawa bioaktif jamur *A. unguis* secara in vitro

1. Inokulum MRSA (Balouiri, et al., 2016)

Kultur MRSA yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Andalas, Padang. Kultur akan ditumbuhkan pada media agar Natrium agar (NA) pada suhu 31 °C dan diinkubasi selama 24 jam. Untuk inokulum dibuat suspensi MRSA dalam media cair Muller Hinton Broth (MHB) pada turbiditas Standar No. 0,5 McFarland.

2. Penentuan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC) (Balouiri, et al., 2016)

Minimum inhibitory concentration (MIC) senyawa dari jamur *A. unguis* terhadap bakteri MRSA dilakukan dengan metode dilusi. Setiap senyawa dibuat menjadi beberapa konsentrasi yaitu 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL, 0,5 µg/mL dan 0,25 µg/mL dalam 2 µL pada setiap well. Setiap konsentrasi dilakukan 5 kali ulangan. Media dengan suspensi bakteri digunakan sebagai kontrol positif. Inkubasi dilakukan pada suhu 37 °C selama 24 jam, setelah itu dilakukan pengukuran absorbansi dengan metode ELISA reader (spektrofotometer). Untuk menentukan jumlah koloni yang tumbuh dilakukan kultur dan hitung dengan metode *Total Plat Count*. Sebelum dikultur setiap konsentrasi senyawa dalam setiap well diencerkan hingga pengenceran 10-7 CFU/ml dan divortex. Pengenceran terakhir dari setiap konsentrasi dipipet sebanyak 100 µL dimasukkan kedalam cawan petri yang sudah berisi media dan diratakan menggunakan teknik cawan sebar (spread plate). Dilanjutkan inkubasi pada suhu 31 °C selama 24 jam.

MIC dapat ditentukan setelah dilakukan perhitungan terhadap jumlah koloni bakteri MRSA yang masih tumbuh dengan ketentuan bahwa pertumbuhan koloni setiap konsentrasi yang sudah dikultur lebih sedikit daripada konsentrasi 0%. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat lebih dari 90% pertumbuhan koloni bakteri MRSA setelah inkubasi 24 jam ditetapkan sebagai MIC. Sedangkan bakteri yang tidak tumbuh dilanjutkan dengan inkubasi selama 1-2 hari dan tetap tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri maka dapat nyatakan sebagai nilai MBC.

3.2.10. Analisis Sel Bakteri MRSA Menggunakan SEM (Murtey and Ramasamy, 2016) (dimodifikasi)

Scanning electron microscopy (SEM) dilakukan untuk mengamati perubahan morfologi sel bakteri MRSA setelah uji *in vitro* berdasarkan metode Murtey dan Ramasamy (2016) dengan beberapa modifikasi. Suspensi bakteri hasil uji *in vitro* terlebih dahulu disentrifugasi dan supernatan dibuang. Pellet yang diperoleh ditambahkan 10 % formaldehida dan 0,1 M phosphate buffer (PB) pH 7,4, dibiarkan selama 30 menit, disentrifugasi dan supernatan dibuang. Selanjutnya ditambahkan kembali 0,1 M phosphate buffer (PB) dan disentrifugasi selama 10 menit. Pelakuan ini dilakukan sebanyak 2 kali dan supernatan dibuang. Pellet dicuci dua kali dengan akuades steril masing-masing selama 10 menit, disentrifugasi dan dibuang supernatant. Sampel yang dicuci didehidrasi dengan etanol bertingkat (35%, 50%, 75%, 95%, dan etanol absolut) dan dibiarkan dalam ruangan tertutup pada suhu kamar semalam. Sampel kering kemudian ditempelkan secara merata pada stub (holder) SEM dengan menggunakan selotip dua sisi. Sampel dilapisi emas murni setebal 0,02 mm dengan metode sputtering menggunakan ion sputter Hitachi E-1045. Sampel diamati dan dipotret menggunakan Hitachi S-3400N SEM pada tegangan 15.

3.2.11. Molecular Docking Senyawa Anti-MRSA secara *in silico* (Dallakyan and Olson, 2015)

Penyiapan Data Ligan Senyawa aktif dan Protein target

1. Struktur senyawa 3D diunduh pada database molekul kimia melalui situs web <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam format .sdf, kemudian dilakukan optimasi dengan menggunakan Autodock Tools. Ligan yang telah dibuat dibuka (ligand – input - open), selanjutnya disimpan dalam bentuk .pdbqt (ligand – output- save as pdbqt- save).
2. Struktur Protein target MRSA yang digunakan diunduh dari Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org>) dalam format .pdb. Optimasi makromolekul dilakukan dengan menggunakan Autodock Tools dan buka makromolekul yang disimpan dalam format .pdb (file- read molecule - .pdb). Optimasi meliputi : penambahan atom hydrogen dan pengaturan grid box parameter. Pengaturan grid box (grid – grid box) yang meliputi ukuran (size x, y,z), kordinat (center x, y, z) dan besarnya ukuran (amstrong) dan simpan (file- close saving current). Hasil ini disimpan dalam format .pdbqt.

Molecular Docking dengan Autodock Vina pada program PyRx

Proses *molecular docking* menggunakan Autodock Vina pada program PyRx 9.5. Struktur protein target (makromolekul) dan ligan senyawa yang telah dioptimasi secara terpisah disimpan dalam satu folder yang sama. Untuk memulai *molecular docking* terlebih dahulu membuka aplikasi PyRx 9.5. Load Molecule diklik untuk membuka file pada folder tempat menyimpan sebelumnya. Setelah file semua tersedia di klik kanan pilih AutoDock pilih ligan dan Makromolekul (protein target) yang diuji. Pada bagian Vina Wizard klik *start here* kemudian pilih *Local* dan *Start*. Pada tampilan *Select Molecules*, dipastikan ligan dan macromolecule *selected*. Pada bagian Autodock dapat diklik bagian ligan yang ingin diuji ataupun bagian makromolekul kemudian *forward* ke Run Vina. Selanjutnya bagian gridbox dapat diatur pada *table view* dan diarahkan pada binding site sebagai titik tengah, kemudian dicatat koordinat x, y, dan z. Kemudian diklik Run Vina, maka proses docking berjalan hingga 100%. Hasil muncul pada table analyze result. Klik ligand *out* dengan *binding affinity* terkecil kemudian pada *table navigator* diklik *molecule* pilih ligand *out* yang telah diklik di *table analyze result*, kemudian klik kanan *save as PDB*.

Analisa dan Visualisasi Molecular Docking

1. Hasil docking

Hasil docking dilihat pada output dalam format *notepad*. Hasil docking dilakukan dengan memilih ligan yang memiliki energy ikatan yang paling rendah, nilai ikatan dapat dilihat di ‘log.txt’.

2. Visualisasi interaksi makromolekul dan ligan

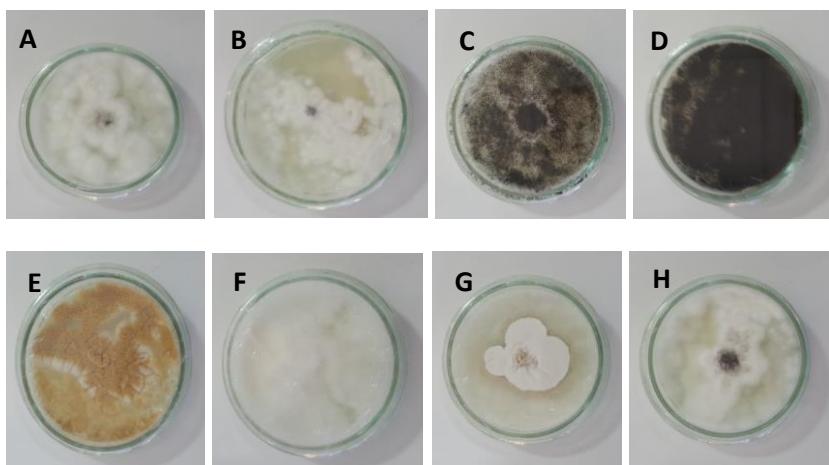
Visualisasi interaksi makromolekul dan ligan dengan menggunakan LigPlus untuk melihat interaksi dan ikatan ligan pada asam amino dalam bentuk dua dimensi. Hasil docking ligan berupa output.pdbqt dan makromolekul dibuka menggunakan *Autodock Tools*, kemudian dilihat interaksi makromolekul dengan ligan secara tiga dimensi. Makromolekul dan output dalam bentuk .pdbqt dibuka secara bersamaan menggunakan PyMOL. PyMOL digunakan untuk melihat kecocokan bentuk dan volume antara ligan dan situs tambatnya.

BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Isolasi dan Identifikasi Jamur *A. unguis* IB151 dari Spons Laut *A. ingens*

Spons laut *A. ingens* diambil di perairan Pulau Mandeh, Pesisir Selatan, Sumatera Barat dan telah diidentifikasi di Naturalis Biodiversity Center, Netherlands oleh Dr. Nicole J. De Voogd. Dari spon tersebut, telah berhasil diisolasi 8 isolat jamur yang diberi kode IB101, IB102, IB121, IB131, IB141, IB142, IB151 dan IB161 (Gambar 4.1).



Gambar 4.1 Isolat Jamur Simbion Spon *A. ingens*; IB101 (**A**), IB102 (**B**), IB121 (**C**), IB131 (**D**), IB141 (**E**), IB142 (**F**), IB151 (**G**) dan IB161 (**H**)

Isolat-isolat jamur diatas dikultivasi menggunakan media beras. Setelah isolat jamur tumbuh maksimal pada seluruh permukaan media beras dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut etil asetat dengan metode maserasi. Ekstrak etil asetat jamur tersebut, menjadi sampel untuk skrining bioaktivitas terhadap sejumlah bakteri patogen, yaitu *B. subtilis*, *S. epidermidis*, *E. faecalis*, *S. aureus*, MRSA, *S. typosa*, *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* dan *M. tuberculosis* (Handayani and Aminah, 2017; Aminah, Putra and Handayani, 2020) terlihat pada tabel berikut.

Tabel 4.1 Zona hambatan Ekstrak Etil asetat jamur spons *A. ingens* terhadap beberapa bakteri patogen

Extract	Microorganism ^a (mm)									
	VC	ST	EC	EF	SM	PA	MRSA	SA	BS	SE
IB101	8.66	-	-	10.03	8.61	11.54	9.56	10.29	7.85	-
IB102	6.64	-	-	6.75	10.30	8.44	-	9.02	-	-
IB121	6.76	8.3	8.7	-	-	9.07	-	7.92	8.9	9.5
IB131	6.85	8.25	8.05	7.06	7.18	10.04	-	7.26	8.7	9.35
IB141	11.34	10.25	14.75	11.11	9.63	12.65	12.22	14.06	14.4	11.5
IB142	7.36	-	-	7.51	7.93	7.86	7.53	7.12	-	-
IB151	9.37	9.15	7.85	9.63	8.68	14.91	10.42	10.89	-	7.25
IB161	6.84	-	-	-	-	8.32	6.44	7.49	-	-

^aVC= *Vibrio cholerae* Inaba, ST= *Salmonella typosa*, EC= *Escherichia coli*, EF= *Enterococcus faecalis* ATCC 29252, PA= *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SM= *Streptococcus mutans* ATCC 25175, MRSA= *Methicillin-resistant S. aureus*, SA= *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, BS= *Bacillus subtilis*, SE= *Staphylococcus epidermidis*

Tabel 4.2 Aktivitas antituberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ekstrak jamur turunan dari spons laut *A. ingens*

Ekstrak Jamur	Konsentrasi		
	0,1 %	0,05 %	0,025 %
IB101	Cont	3+	3+
IB102	2+	2+	3+
IB121	2+	2+	3+
IB131	2+	3+	3+
IB142	2+	3+	Cont
IB161	Cont	3+	3+
IB141	-	-	-
IB151	-	-	+1

Ket: - = not growth, 1+ = 20-100 colonies, 2+ = 100-200 colonies, 3+ = 200-500 colonies, Cont = Contaminated.

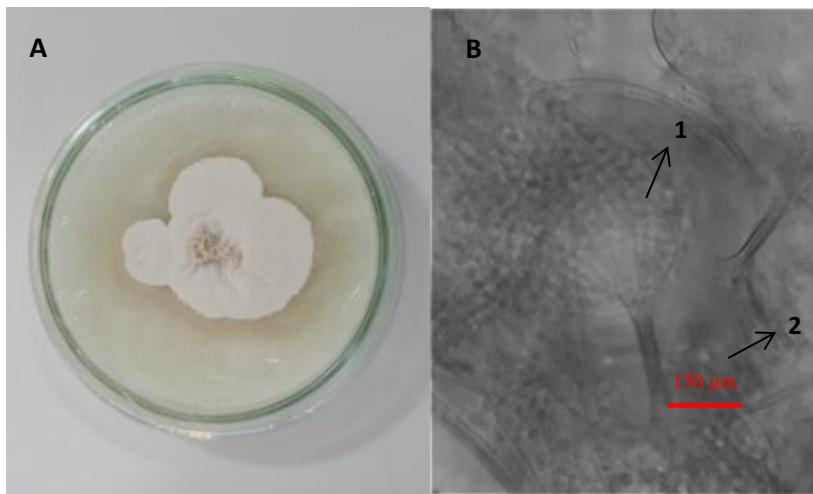
Hasil skrining menunjukkan isolat IB151 memiliki aktivitas antibakteri yang potensial setelah isolat IB141. Pemilihan jamur IB151 didasarkan karena isolat jamur IB141 telah diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan molekuler mengindikasikan bahwa jamur ini merupakan *Aspergillus ochraceus*. Ochratoxin A (OTA) termasuk salah satu senyawa yang telah banyak dihasilkan dari jamur *Aspergillus ochraceus* dan merupakan senyawa mitotoksin yang terbukti telah beracun dan karsinogenik pada hewan (Van der Merwe et al., 1965). OTA adalah karsinogen ginjal yang kuat pada beberapa spesies hewan

(Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007). Efek samping lain dari OTA termasuk imunotoksitas, penghambatan sintesis makromolekul, peningkatan peroksidasi lipid, dan penghambatan respirasi mitokondria (Kuiper-Goodman and Scott, 1989; Petzinger and Ziegler, 2000).

Tahapan identifikasi isolat jamur ini meliputi ekstraksi dan amplifikasi DNA, sekuensing, analisis hasil sekuen dan pembuatan pohon filogenetik. Ekstraksi DNA dilakukan dengan mengikuti prosedur dari (Saitoh *et al.*, 2006) dan dilanjutkan dengan amplifikasi DNA menggunakan primer 18S rRNA. Primer 18F dan 18R merupakan primer *forward* dan *reverse* yang berfungsi untuk membatasi daerah DNA yang akan diamplifikasi. Tahapan amplifikasi DNA melalui proses reaksi awal *pre heat* pada suhu 94 °C selama 2 menit, denaturasi pada suhu 94 °C selama 15 detik, *annealing* pada suhu 60 °C selama 30 detik dan elongasi pada suhu 68 °C selama 1 menit 30 detik. Proses PCR berlangsung sebanyak 30 siklus dan diakhiri dengan ekstensi pada suhu 78 °C selama 10 menit. Hasil amplifikasi jamur IB151 pada lampiran 2 menunjukkan amplikon satu pita yang berukuran sekitar 1690 bp.

Produk PCR yang dihasilkan disequensing di First Base, Malaysia. Hasil sekuen dianalisis menggunakan program BLAST yang terdapat di laman NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yang bertujuan untuk mengetahui kekerabatan atau sekuen yang mirip dengan database NCBI. Hasil penjajaran sekuen DNA 18S dianalisis menggunakan program MEGA 7.0 untuk merekonstruksikan pohon filogenetik dengan menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) (Kumar, Stecher and Tamura, 2016). Menurut (Saitou and Nei, 1987), NJ dapat menunjukkan pohon filogenetik dengan prinsip *minimum evolution* dan efisien dalam memilih topologi yang benar serta dapat diaplikasikan pada semua data dengan perbedaan jarak evolusioner. Parameter Kimura-2 adalah rumus sederhana yang digunakan oleh NJ yang merupakan model perhitungan algoritmik untuk mengetahui jarak evolusioner atau perubahan nukleotida antar spesies yang terbentuk pada pohon filogenetik. Analisis pohon filogenetik diuji secara statistik dengan menggunakan metode *bootstrap* 1000x yang melibatkan delapan sekuen nukleotida (Felsenstein, 1985).

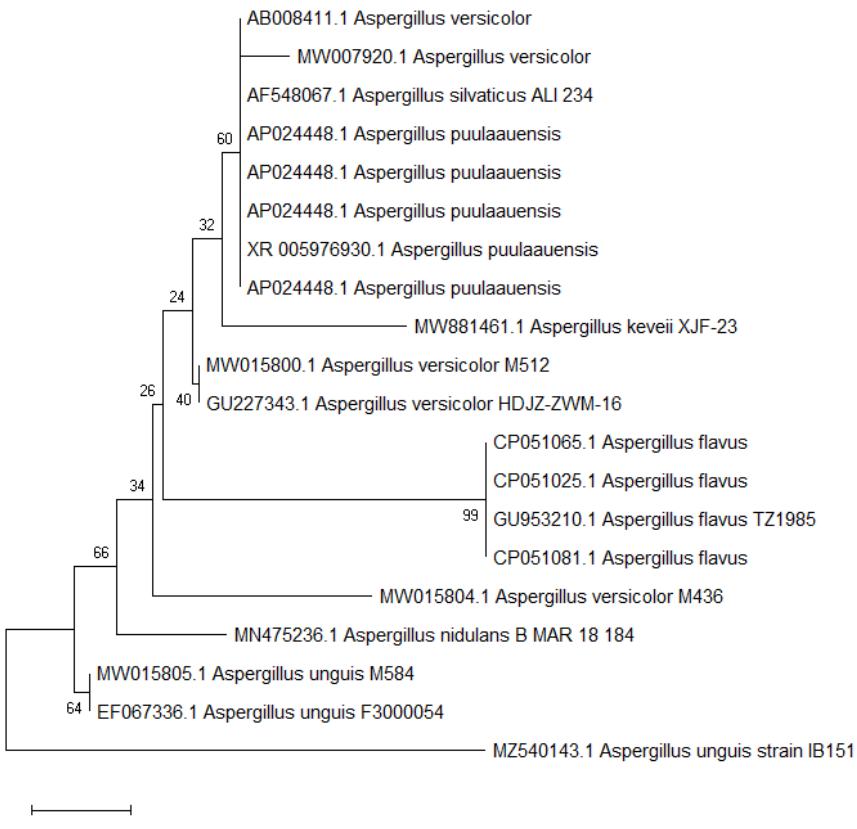
Isolat jamur IB151 diidentifikasi secara makroskopis, mikroskopis dan molekuler. Pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis isolat jamur terebut menunjukkan ciri dari genus *Aspergillus*. Secara makroskopii koloni IB151 berwarna kuning terang dibagian tengah dan kuning hingga kuning terang disekelilingnya. Koloni dibagian tengah ini berkerut setelah dua minggu dalam media SDA. Kepala konidia pada awalnya berbentuk bulat memancar (radiate) dan kemudian berubah bentuk kolom (columnar). Secara Mikroskopis, ditemukan konidiofor tegak, sederhana dan konidia berwarna hijau kekuningan dan berbentuk bulat terlihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Gambar makroskopi dan mikroskopi *A. unguis*. **A.** Koloni pada media SDA. **B.** Morfologi *A. unguis*; konidia (1), konidiofor (2)

Selanjutnya identifikasi molekuler dilakukan menggunakan primer 18S rRNA dan menyimpulkan bahwa jamur IB151 identik dengan *A. unguis*. Secara molekuler diperoleh panjang DNA isolat IB151 sebesar 1690 bp dan telah terdaftar pada GenBank NCBI dengan kode akses: MZ540143. Hasil analisis BLAST pada NCBI GenBank menunjukkan indeks kemiripan dengan *A. unguis* M584 sebesar 98,78 %. Jumlah basa nukleotida hasil *alignment* (pensejajaran) dari semua sekuen yang dianalisis adalah 980 bp. Dari 980 bp yang dianalisis terdapat 949 bp *conserved site* (basa yang sama) dan 31 bp *variable site* (basa yang berbeda).

Pohon filogenetik jamur IB151 juga ditampilkan pada gambar 4.3 menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dengan bootstrap 1000x. Jamur IB151 berada pada *outgroup*. Analisis filogenetik diperkuat dengan nilai perhitungan jarak genetik (*pairwise distance*) terdekat pada *A. unguis* M584 dan *A. unguis* F3000054 sebesar 0,011 (1,1%). Sesuai dengan kekerabatan yang dimiliki jamur IB151 dapat dikatakan sebagai *A. unguis*.



Gambar 4.3 Pohon filogenetik berdasarkan urutan sekuen gen 18S rRNA jamur IB151 yang diisolasi dari spon laut *A. ingens* menggunakan metode *Neighbor Joining* (NJ) dengan bootstrap 1000x.

4.2. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Metabolit Sekunder Jamur *Aspergillus unguis* IB151

Isolat jamur *A. unguis* IB151 sebelumnya dikultivasi dengan menggunakan beras sebagai media dan akuades dengan perbandingan 1:1 yang telah disterilkan dengan autoklaf. Ekstraksi isolat jamur *A. unguis* dengan etil asetat dilakukan setelah jamur tumbuh maksimal di dalam media beras selama 3 minggu. Sebanyak 3,5 kg media kultivasi diekstrak dengan etil asetat, diuapkan *in vacuo* diperoleh ekstrak kental EtOAc sebanyak 49,3 gram. Ekstrak tersebut di partisi dengan pelarut metanol dan n-heksan, selanjutnya diuapkan *in vacuo*,

diperoleh subfraksi metanol yang merupakan fraksi polar sebanyak 26,2 gram dan subfraksi n-heksana non-polar sebanyak 22,9 gram. Subfraksi metanol difraksinasi lagi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum atau VLC (*vacuum liquid chromatography*) dengan menggunakan n-heksan yang kepolarannya ditingkatkan dengan penambahan etil asetat (step gradient polarity (SGP), 4:1, 3:2, 1:1, 2:3, 1:4, 0,5:4,5), hingga etil asetat 100 % dan diakhiri dengan metanol. Hasil eluen ditampung dan dimonitor dengan KLT. Fraksi yang memperlihatkan pola KLT sama digabung sehingga diperoleh 7 subfraksi hasil kolom VLC.

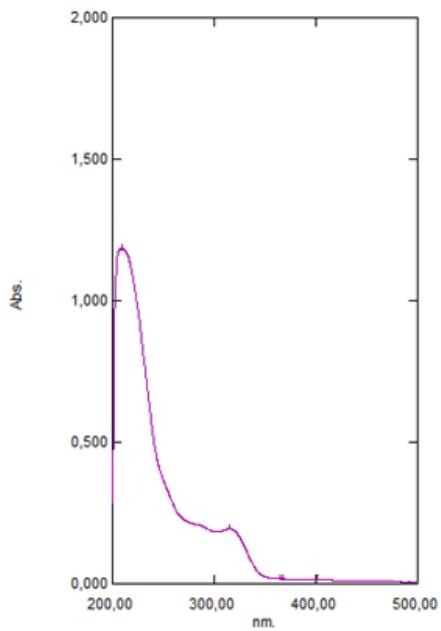
Dari 7 subfraksi hasil kolom, F1-5 berbentuk seperti minyak berwarna kuning pucat. Subfraksi 2 terlihat mengkristal dan direkrystalisasi dengan menggunakan pelarut EtOAc dan n-heksan dan diperoleh kristal tidak berwarna, senyawa IB-01 (251,4 mg, mp. 219,9-220,6 °C.). Subfraksi 3 dilewatkan ke kolom sephadex LH-20 dengan eluen metanol (200 ml) dan dari salah satu subfraksi diperoleh senyawa IB-02 (56,9 mg, mp. 193,1-193,7 °C). Subfraksi 4 direkristalisasi dengan pelarut pelarut EtOAc dan n-heksan diperoleh kristal tidak berwarna, senyawa IB-01 (203,5 mg, mp. 219,9-220,6°C).

4.3. Elusidasi Struktur Senyawa Metabolit Sekunder Jamur *A. unguis* IB151

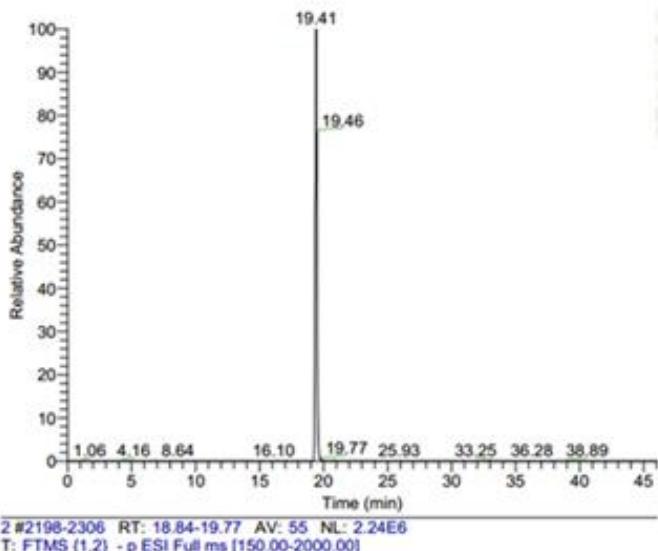
Senyawa metabolit sekunder jamur *A. unguis* IB151 yang diperoleh diuji kemurniannya dengan mengukur titik leleh. Elusidasi struktur dilakukan dengan mengukur senyawa yang diperoleh dengan alat spektrometer ultraviolet (UV), kromatografi cair-spektrometer massa (LC-MS) dan *nuclear magnetic resonance* (NMR) 1-dimensi (^1H NMR, ^{13}C NMR) dan NMR 2-dimensi (HMQC, HMBC). HMQC mengidentifikasi sinyal karbon yang mengikat H ($J_{\text{C}-\text{H}}$), sedangkan HMBC memperlihatkan korelasi antara karbon dengan proton melalui dua atau tiga ikatan ($J_{2\text{C}-\text{H}}$, $J_{3\text{C}-\text{H}}$).

4.3.1. Penentuan Struktur Senyawa IB-01

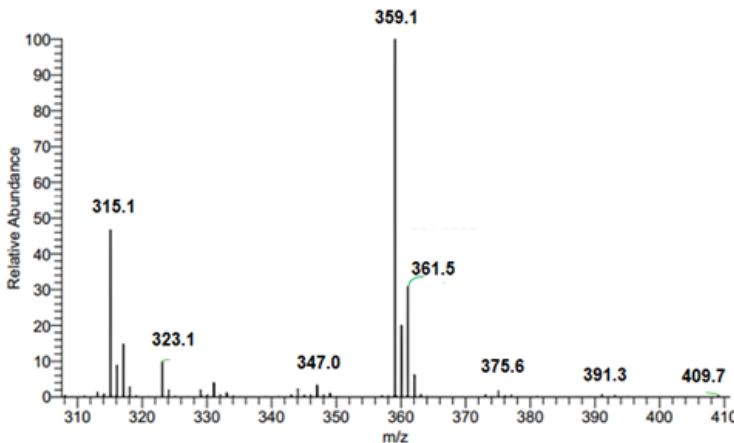
Senyawa IB-01 berupa kristal tidak berwarna dengan m.p. 219,9-220,6°C. Spektrum UV memperlihatkan panjang gelombang serapan maksimal pada λ max 315 dan 209 nm (Gambar 4.4). Spektrum LC-MS memperlihatkan puncak ion $[\text{M}]^+$ pada m/z 359,1 dan $[\text{M}^{+2}+\text{H}]^+$ 361,5 dengan rasio *abundance* 3:1 yang mengindikasikan dalam molekul senyawa IB-01 ini terdapat satu atom Cl dengan rumus empiris $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClO}_5$ dan memperlihatkan puncak tertinggi pada waktu retensi 19,41 menit (Gambar 4.5).



Gambar 4.4 Spektrum Ultra Violet Senyawa IB-01

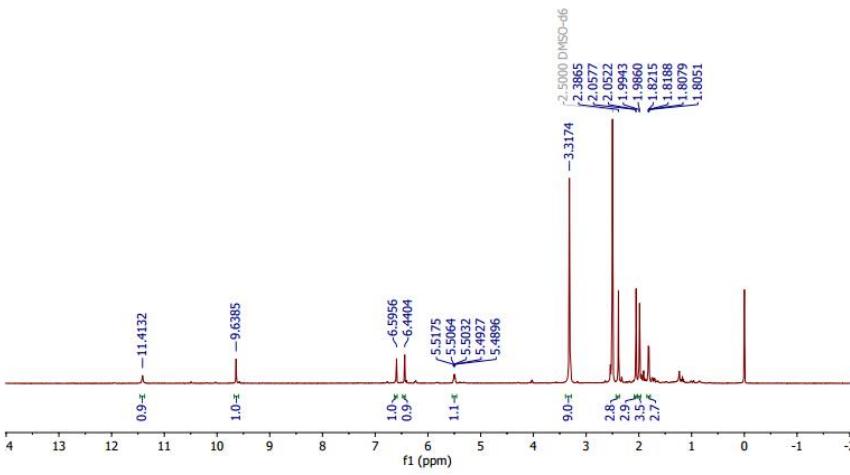


Gambar 4.5 Spektrum LC Senyawa IB-01

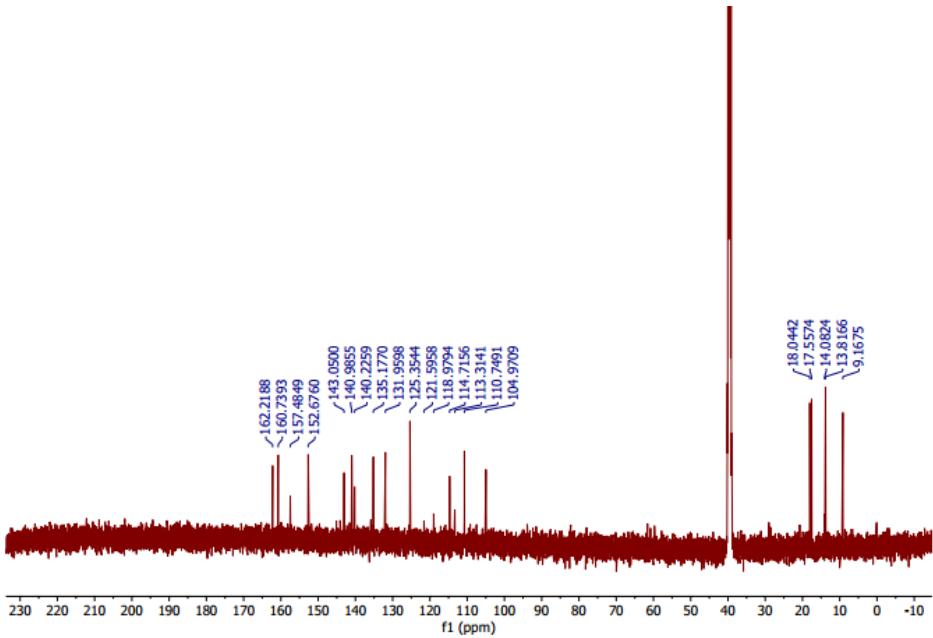


Gambar 4.6 Spektrum LC-MS Senyawa IB-01

Spektrum proton ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) senyawa IB-01 (Gambar 4.6) memperlihatkan pergeseran kimia δ , ppm : 11,41 (1H, s); 9,64 (1H, s); 6,60 (1H, s); 6,44 (1H, s); 5,50 (1H, qd); 2,38 (3H, s); 2,05 (3H, s); 1,99 (3H, m); 1,81 (3H, d). Senyawa ini memiliki 4 gugus metil pada δ_{H} 2,38 (3H, s); 2,05 (3H, s); 1,99 (3H, m); 1,81 (3H, d). Dua gugus metil pada δ_{H} 2,38 dan δ_{H} 2,05 memiliki puncak multiplisitas singlet, yang menjelaskan bahwa disebelah sinyal proton (H) tersebut atom karbonnya tidak memiliki atom proton, yang merupakan metil aromatiks. Sedangkan δ_{H} 1,81 memiliki puncak sinyal doublet yang menunjukkan disebelah sinyal proton tersebut atom karbonnya memiliki 1 atom H. Sinyal proton pada δ_{H} 6,60 dan δ_{H} 6,44 memiliki puncak multiplisitas singlet dengan satu atom H yang merupakan proton aromatik. Pada pergeseran kimia δ_{H} 9,64 dan δ_{H} 11,41 dengan puncak multiplisitas singlet dengan daerah absorpsinya luas karena adanya proton yang terikat dalam gugus hidroksil.



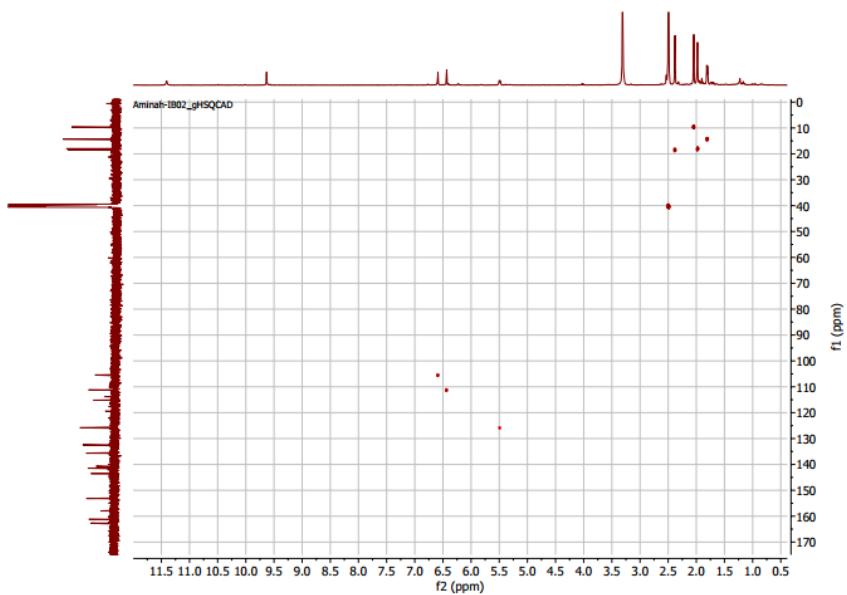
Gambar 4.7 Spektrum proton ^1H NMR senyawa IB-01



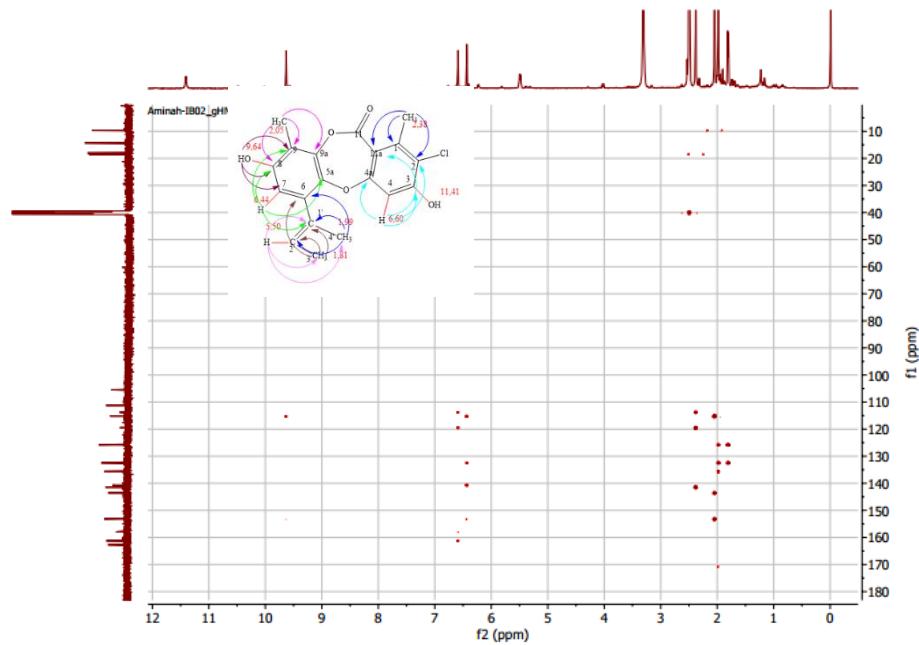
Gambar 4.8 Spektrum karbon ^{13}C NMR senyawa IB-01

Spektrum resonansi magnetik inti karbon ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) senyawa IB-01 terlihat pada Gambar 4.8. Data pergeseran kimia yang digunakan berasal dari spektrum 2D HSQC dan HMBC (Gambar 4.8 dan 4.9) dengan pergeseran kimia (δ , ppm) yang terdiri dari 11 atom karbon kuartener yaitu $\delta_c = 113,3; 114,7; 118,9; 131,9; 125,4; 140,2; 140,9; 143,0; 152,7; 157,5; 160,7$. Pada pergeseran kimia $\delta_c 9,2; 14,1; 17,6$; dan 18,0 menunjukkan 4 gugus metil (CH_3), Pergeseran kimia $\delta_c 104,9; 110,7; 125,4$ menunjukkan adanya C-H. Analisis Spektrum HSQC senyawa menunjukkan korelasi langsung antara karbon dan hidrogen, diantaranya adalah korelasi karbon pada posisi C-3' ($\delta_c 14,1$) dengan proton $\delta_H 1,81$ ppm, korelasi karbon pada posisi C-4'($\delta_c 18,0$) dengan proton $\delta_H 1,99$ ppm, korelasi karbon pada posisi -9- CH_3 ($\delta_c 9,2$) dengan proton $\delta_H 2,05$ ppm. Korelasi karbon pada posisi -1- CH_3 ($\delta_c 17,6$) dengan proton $\delta_H 2,38$ ppm, korelasi karbon pada posisi C-2' ($\delta_c 125,4$) dengan proton $\delta_H 5,50$ ppm, korelasi karbon pada posisi C-7 ($\delta_c 110,7$) dengan proton $\delta_H 6,44$ ppm, dan korelasi karbon pada posisi C-4 ($\delta_c 104,9$) dengan proton $\delta_H 6,60$ ppm.

Analisa Spektrum HMBC terlihat korelasi ($J_{2\text{C}-\text{H}}, J_{3\text{C}-\text{H}}$) proton pada posisi -1- CH_3 ($\delta_H 2,38$) terhadap karbon pada posisi C-1 ($\delta_c 140,9$), C-2 ($\delta_c 118,9$), C-11a ($\delta_c 113,3$). Korelasi proton pada posisi -9- CH_3 ($\delta_H 2,05$) terhadap karbon pada posisi C-9 ($\delta_c 114,7$), C-8 ($\delta_c 152,7$), C-9a ($\delta_c 143,0$). Korelasi proton pada posisi H-4 ($\delta_H 6,60$) terhadap karbon pada posisi C-3 ($\delta_c 160,7$), C-1 ($\delta_c 118,9$), C-4a ($\delta_c 157,5$), C-11a ($\delta_c 113,3$). Korelasi proton pada posisi H-7 ($\delta_H 6,44$), terhadap karbon pada posisi C-8 ($\delta_c 152,7$), C-5a ($\delta_c 140,2$), C-1' ($\delta_c 131,9$), C-9 ($\delta_c 114,7$). Korelasi proton pada posisi H3-3' ($\delta_H 1,80$) terhadap karbon pada posisi C-1' ($\delta_c 131,9$) dan C-2' ($\delta_c 125,4$). Korelasi proton pada posisi H3-4' ($\delta_H 1,99$) terhadap karbon pada posisi C-6 ($\delta_c 135,2$), C-1' ($\delta_c 131,9$), C-2' ($\delta_c 125,4$). Korelasi proton pada posisi H-2' ($\delta_H 5,5$) terhadap karbon pada posisi C-6 ($\delta_c 135,2$), C-3' ($\delta_c 14,1$), C-4' ($\delta_c 18,0$). Gugus (8-OH) pada $\delta_H 9,64$ ppm dan memberikan korelasi HMBC pada karbon pada posisi C-8 ($\delta_c 152,7$), C-9 ($\delta_c 114,7$).



Gambar 4.9 Spektrum HSQC senyawa IB-01



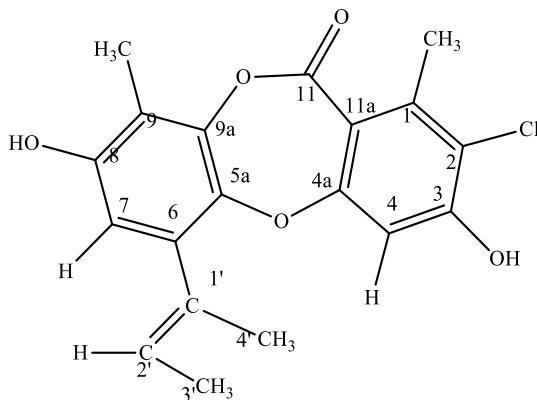
Gambar 4.10 Spektrum HMBC senyawa IB-01

Sinyal pergeseran kimia pada spektrum ^1H NMR dan ^{13}C NMR senyawa IB-01 memiliki kemiripan dengan senyawa 2-clorounguinol yang telah dibahas sebelumnya (Kawahara *et al.*, 1988; Handayani *et al.*, 2020) seperti yang terlihat pada tabel 4.3. Senyawa 2-chlorounguinol merupakan senyawa golongan depsidone yang terklorinasi, yang diisolasi dari jamur *A. unguis* (Kawahara *et al.*, 1988) dan pertama kali di isolasi dari jamur *A. unguis* yang diperoleh dari spon laut belum teridentifikasi (Sureram *et al.*, 2012). 2-chlorounguinol mengandung satu atom klorin pada posisi C-2, klor pada posisi C-4 dan C-7 dari nidulin digantikan oleh atom hidrogen. Struktur 2-chlorounguinol dikonfirmasikan sebagai 2-chloro-3,8-dihydroxy-1,9-dimethyl-6-(1-methyl-1-propenyl)-11H dibenzo [*b,e*][1,4]-dioxepin-11-one, dan rumus formula $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClO}_5$ (Kawahara *et al.*, 1988).

Tabel 4.3 Data perbandingan pergeseran kimia ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HMBC dan HSQC Senyawa IB-01 (DMSO-d_6 - 600 MHz) dengan senyawa 2-clorounguinol

Posisi Atom C	Senyawa IB-01		2-chlorounguinol (DMSO-d_6)*		2-chlorounguinol (CDCl_3)**	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	118.9		119.7		141.24	
2	140.9		141.4		119.17	
3	160.7		161.3		161.48	
4	104.9	6.60, s, 1H	105.5	6.60, s, 1H	105.50	6.59, s
4a	157.5		158.0		156.02	
5a	140.2		140.7		141.21	
6	135.2		135.8		132.50	
7	110.7	6.44, s, 1H	111.4	6.44, s, 1H	111.25	6.42, s
8	152.7		153.1		151.98	
9	114.7		115.3		115.10	
9a	143.0		143.7		143.35	
11	162.2		n.o		162.73	
11a	113.3		113.8		115.21	
1-Me	17.6	2.38, s, 3H	18.6	2.38, s, 3H	18.06	2.52, s, 3H
9-Me	9.2	2.05, s, 3H	9.7	2.05, s, 3H	9.00	2.21, s, 3H
1'	131.9		132.2		135.70	
2'	125.4	5.50, qd, 1H	125.4	5.50, qd, 1H	125.26	5.56, 1H, q, (6.8)
3'	14.1	1.81, dd, 3H (6.8,1.3)	14.2	1.81, dd, 3H (6.8,1.3)	13.57	1.82, dq, 3H (6.8, 1,0)
4'	18.0	1.99, ddd, 3H 9.64, s	17.9	1.99, m, 3H 9.64, s, 1H	17.33	2.05, s, 3H 4.77, s, 1H
8-OH		11.41,s		11.41, s, 1H		6.05, s, 1H
3-OH						

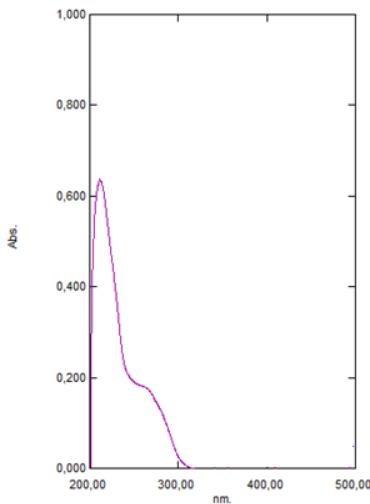
Ket: * Literatur dari Handayani *et al.* (2020), **Literatur dari Kawahara *et al.* (1988)



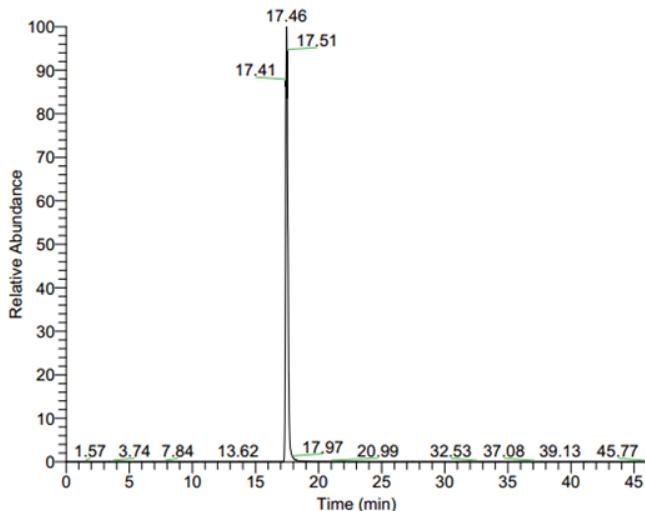
Gambar 4.11 Senyawa 2-chlorouruguinol

4.3.2. Penentuan Struktur Senyawa IB-02

Senyawa IB-02 berupa kristal tidak berwarna dengan m.p. 219,9–220,6°C. Spektrum UV senyawa IB-02 memperlihatkan panjang gelombang serapan maksimal 211,20 nm yang memperlihatkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi (Gambar 4.12). Spektrum LC-MS senyawa IB-02 memperlihatkan puncak ion molekul $[M]^+$ pada m/z 327,1 dengan rumus empiris $C_{19}H_{18}O_5$ dan memperlihatkan puncak tertinggi pada waktu retensi 17,46 menit seperti yang terlihat pada gambar 4.10. Tidak adanya puncak tambahan pada spektrum massa senyawa IB-02 menunjukkan tidak adanya atom klor dibandingkan dengan 2-chlorouruguinol (IB-01).

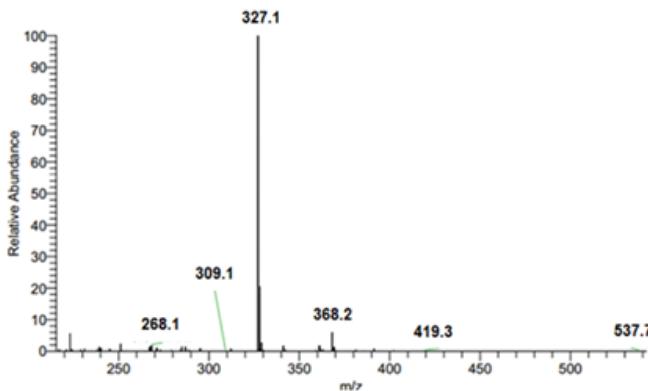


Gambar 4.12 Spektrum Ultra Violet Senyawa IB-02



3 #1204-2345 RT: 10.33-20.10 AV: 571 NL: 6.16E5
T: FTMS {1,1} + p ESI Full ms [150.00-2000.00]

Gambar 4.13 Spektrum LC-MS Senyawa IB-02

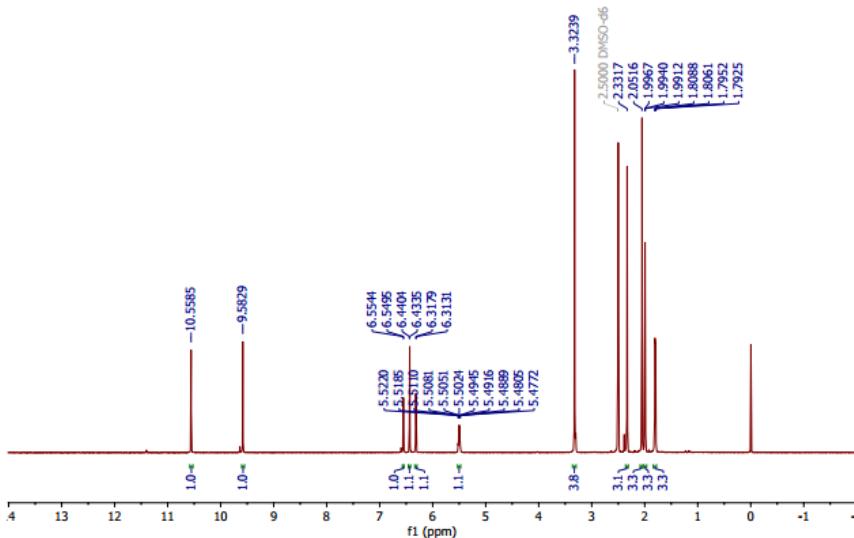


Gambar 4.14 Spektrum LC-MS Senyawa IB-02

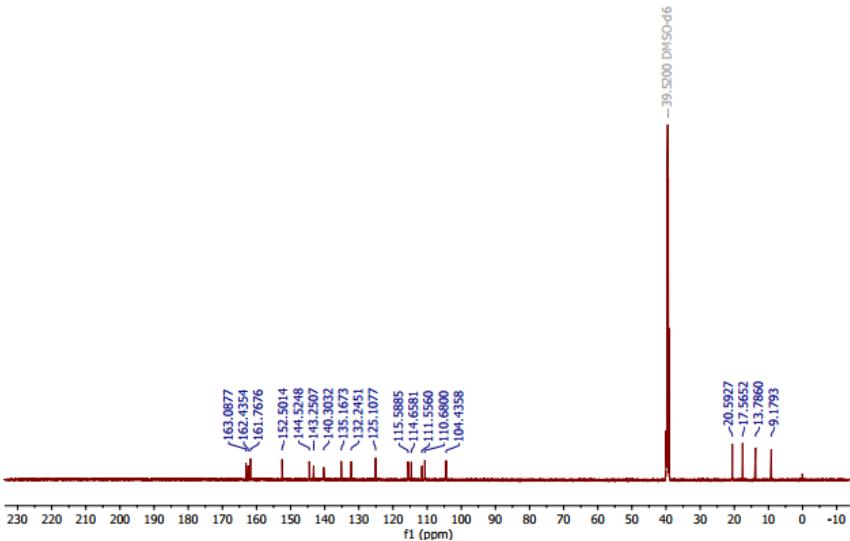
Spektrum proton ^1H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) dan ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d₆) memperlihatkan adanya pergeseran kimia (δ , ppm) seperti yang terlihat pada gambar 4.15 dan 4.16. Analisa spektrum proton ^1H Resonansi Magnetik Inti (500 MHz, DMSO-d₆) senyawa IB-02 dengan pergeseran kimia (ppm) : 10,56 (1H, s); 9,58 (1H, s); 6,55 (1H,d); 6,44 (1H, s); 6,31 (1H, d); 5,50 (1H, qd); 2,33 (3H, s); 2,05 (3H,s); 1,99 (3H, t); 1,80 (3H). Senyawa ini memiliki 4 gugus

metil, dimana 2 gugus metil pada δ_H 2,33 dan δ_H 2,05 memiliki puncak multiplisitas singlet, yang menjelaskan bahwa disebelah sinyal proton (H) tersebut atom karbonnya tidak memiliki atom proton, yang merupakan metil aromatiks. Sedangkan δ_H 1,80 memiliki puncak sinyal *doublet* yang menunjukkan disebelah sinyal proton tersebut atom karbonnya memiliki 1 atom H. Sinyal proton dengan satu H yaitu pada δ_H 6,31 memiliki puncak multiplisitas singlet dan sinyal proton δ_H 6,55, δ_H 6,44 memiliki puncak *doublet* yang merupakan proton aromatiks. Pada pergeseran kimia δ_H 9,58 dan δ_H 10,56 dengan puncak multiplisitas singlet dengan absorpsinya luas karena adanya proton hidroksil.

Spektrum resonansi magnetik inti karbon ^{13}C NMR pada gambar 4.16, data pergeseran kimia yang digunakan berasal dari spektrum 2D *HSQC* dan *HMBC* memperlihatkan senyawa IB-02 mempunyai 19 atom karbon. Senyawa IB-02 terdiri dari 15 atom karbon kuartener dengan pergeseran kimia (ppm) yaitu $\delta_C = 111,6; 114,7; 132,3; 135,1; 140,3; 144,5; 143,3; 152,5; 161,8; 162,4; 163,1$. Adanya empat gugus metil (CH_3) pada pergeseran kimia δ_C 9,2 ppm; 13,8 ppm; 17,6 ppm; dan 20,6 ppm. Pergeseran kimia δ_C 115,6 ppm; 104,4 ppm; 110,2 ppm; 125,1 ppm menunjukkan adanya C-H.



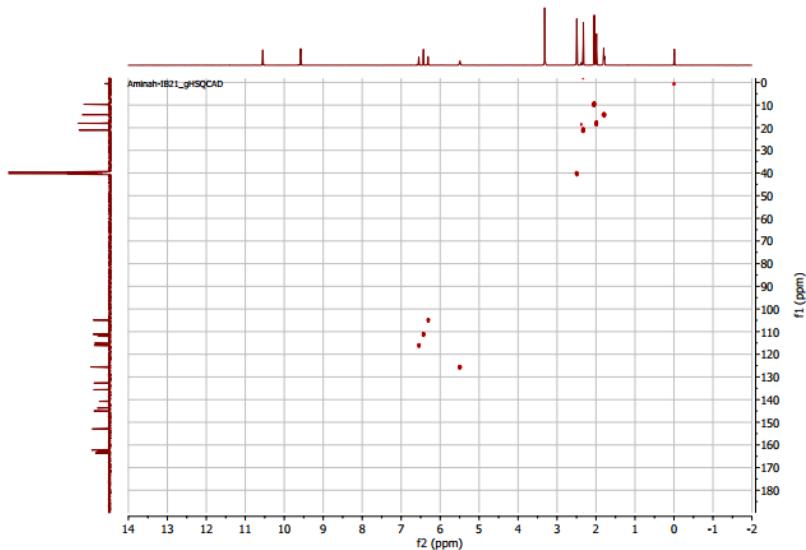
Gambar 4.15 Spektrum proton ^1H NMR senyawa IB-02



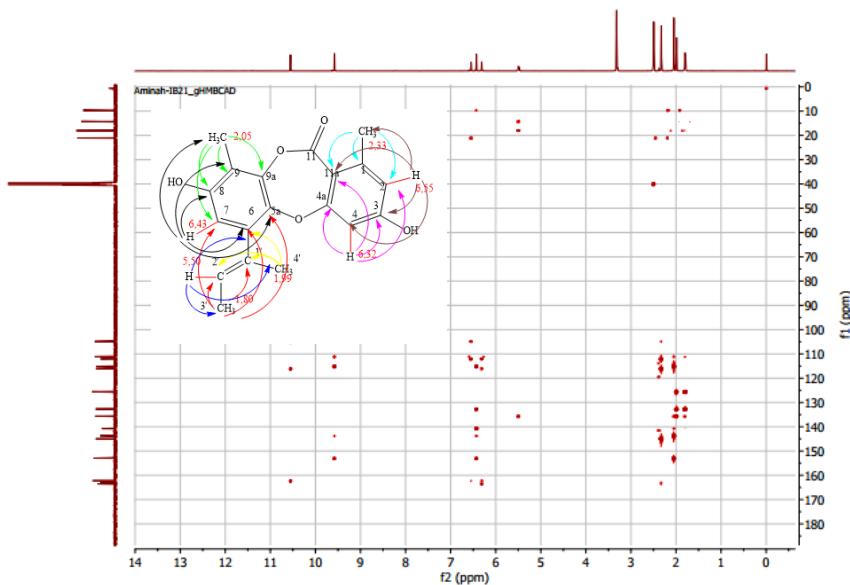
Gambar 4.16 Spektrum karbon ^{13}C NMR senyawa IB-02

Analisis Spektrum HSQC senyawa IB-02 menunjukkan (Gambar 4.17) korelasi antara karbon pada posisi C-4' (δ_c 17,6) terhadap proton δ_H 1,99 ppm. Karbon pada posisi C-3' (δ_c 13,8) terhadap proton δ_H 1,80 ppm. Karbon pada posisi -9-CH₃(δ_c 9,2) terhadap proton δ_H 2,05 ppm. Karbon pada posisi -1-CH₃ (δ_c 20,6) terhadap proton δ_H 2,33. Karbon pada posisi C-2' (δ_c 125,1) terhadap proton δ_H 5,50 ppm. Karbon pada posisi C-4 (δ_c 104,4) terhadap proton δ_H 6,31 ppm. Karbon pada posisi C-7 (δ_c 110,7) terhadap proton δ_H 6,44 ppm dan karbon pada posisi C-2 (δ_c 115,6) terhadap proton δ_H 6,55 ppm.

Analisa Spektrum HMBC terlihat korelasi ($J_{2\text{C}-\text{H}}$, $J_{3\text{C}-\text{H}}$) antara proton pada posisi H₃-3' (δ_H 1,80) ppm terhadap karbon pada posisi C-5a (δ_c 140,3), C-6 (δ_c 135,1), C-1'(δ_c 132,3), C-2' (δ_c 125,1). Korelasi proton pada posisi H₃-4' (δ_H 1,99) terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_c 135,1), C-1'(δ_c 132,3), C-2' (δ_c 125,1). Korelasi proton pada posisi H-2' (δ_H 5,50) terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_c 135,1), C-4' (δ_c 17,6), C-3' (δ_c 13,8).



Gambar 4.17 Spektrum HSQC senyawa IB-02



Gambar 4.18 Spektrum HMBC senyawa IB-02

Adanya korelasi jarak jauh antara H-2' (δ_H 5,50) terhadap C-4' (δ_C 17,6), H₃-3' (δ_H 1,80) terhadap C-1' (δ_C 132,3), H-4' (δ_H 1,99) terhadap C-1' (δ_C 132,3) dan C-2' (δ_C 125,1) menyatakan adanya gugus 1-metil-1-profenil pada struktur unguinol. Gugus 1-metil-1-profenil I ini terkoneksi pada cincin benzen pada posisi C-6 karena adanya koneksi jarak jauh ³J dari H-2' dan H₃-4' terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_C 135,1) dan korelasi jarak jauh ⁴J dari H₃-3 terhadap C-6.

Korelasi proton pada posisi -9-CH₃ (δ_H 2,05) terhadap karbon pada posisi C-8 (δ_C 152,5), C-9a (δ_C 143,3), C-9 (δ_C 114,7), C-7 (δ_C 110,7). Korelasi proton pada posisi -1-CH₃ (δ_H 2,33) terhadap karbon pada posisi C-1 (δ_C 144,5), C-2 (δ_C 115,6), C-11a (δ_C 111,6), C-9 (δ_C 114,7) dan C-9a (δ_C 143,3). Korelasi proton pada posisi H-4 (δ_H 6,31) terhadap karbon pada posisi C-2 (δ_C 115,6), C-11a (δ_C 111,6), C-3 (δ_C 163,1), C-4a (δ_C 162,4). Korelasi proton pada posisi H-7 (δ_H 6,44) terhadap karbon pada posisi C-8 (δ_C 152,5), C-5a (δ_C 140,3), C-6 (δ_C 135,1), C-9 (δ_C 114,7), -9-CH₃ (δ_C 9,2). Korelasi proton pada posisi H-2 (δ_H 6,55) terhadap karbon pada posisi C-3 (δ_C 163,1), C-11a (δ_C 111,6), C-4 (δ_C 104,4), -1-CH₃ (δ_C 20,6).

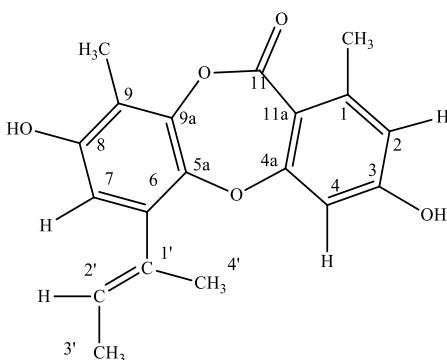
Sinyal karbon pada δ_C 163,1 dan δ_C 104,4 yang berkorelasi jarak jauh dengan H-2 menandakan C-3 dan C-4, dan terlihat adanya pergeseran kimia ke arah *upfield* pada C-2 (δ_C 115,6) dan C-4 (δ_C 104,4) dikarenakan adanya substituen fenolik pada posisi C-3 (δ_C 163,1). Adanya substituen eter pada C-4a (δ_C 162,4) dijelaskan karena pergeseran kimia ke arah *upfield* oleh C-4 (δ_C 104,4) dan C-11a (δ_C 111,6). Pada sinyal karbon C-5a (δ_C 140,3) dan C-9a (δ_C 143,3) menunjukkan pergeseran kimia ke arah *downfield* dikarenakan pada posisi C-5a adanya gugus (O – R) dan C-9a [-O-(C=O)-R].

Sinyal pergeseran kimia pada spektrum ¹H NMR dan ¹³C NMR senyawa IB-01 memiliki kemiripan dengan senyawa unguinol yang telah dibahas sebelumnya (Kawahara *et al.*, 1988; Handayani *et al.*, 2020) seperti yang terlihat pada tabel 4.4. Senyawa unguinol juga merupakan senyawa golongan depsidone yang pertama kali diisolasi dari miselia jamur *A. unguis* oleh Stodola pada tahun 1972. Senyawa 2-chlorounguinol merupakan turunan dari unguinol dengan memiliki satu atom hidrogen pada unguinol pada posisi C-2 digantikan dengan atom klorine pada 2-chlorounguinol. Adanya sinyal dua proton aromatik muncul pada pergeseran kimia δ_H 6,60 ppm dan δ_H 6,44 ppm sebagai singlet yang luas, menunjukkan bahwa senyawa 2-chlorounguinol di klorinasi pada posisi C-2 dari unguinol (Kawahara *et al.*, 1988).

Tabel 4.4 Data perbandingan pergeseran kimia $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC dan HSQC Senyawa IB-02 (DMSO-d6 - 600 MHz) dengan senyawa unguinol

Posisi Atom C	Senyawa IB-02		Unguinol (DMSO-d6)*		2-chlorounguinol (CDCl_3)**	
	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)
1	144.5		144.52		141.24	
2	115.6	6.55, d, 1H	115.59	6.55, d, 1H (2.2)	119.17	6.32
3	163.1		163.09		161.48	
4	104.4	6.31, d, 1H	104.44	6.32, dd, 1H (2,3)	105.50	6.52
4a	162.4		162.44		156.02	
5a	140.3		140.9		141.21	
6	135.1		135.12		132.50	
7	110.7	6.44, s, 1H	115.5	6.43, s, 1H	111.25	
8	152.5		152.5		151.98	
9	114.7		114.6		115.10	
9a	143.3		143.2		143.35	
11	161.8		161.7		162.73	
11a	111.6		112.1		115.21	
1-Me	20.6	2.33, s, 3H	21.2	2.33, s, 3H	18.06	2.39
9-Me	9.2	2.05, s, 3H	9.9	2.05, s, 3H	9.00	2.14
1'	132.3		132.8		135.70	
2'	125.1	5.50, qd, 1H	125.7	5.5, qd, 1H (0.8, 1.6)	125.26	5.54
3'	13.8	1.8, dd, 3H (6.8, 1.3)	14.4	1.80, dd, 3H (6.8, 1.4)	13.57	1.84
4'	17.6	1.99, t, 3H	18.0	1.99, t, 3H	17.33	2.06
8-OH		9.58, s, 1H		9.59, s, 1H	-	-
3-OH		10.56, s, 1H		10.57, s, 1H	-	-

Ket: * Literatur dari Handayani *et al.* (2020), **Literatur dari Kawahara *et al.* (1988)

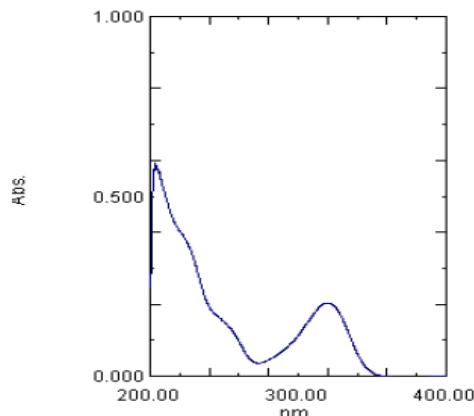


Gambar 4.19 Struktur Unguinol

4.3.3. Senyawa Nidulin

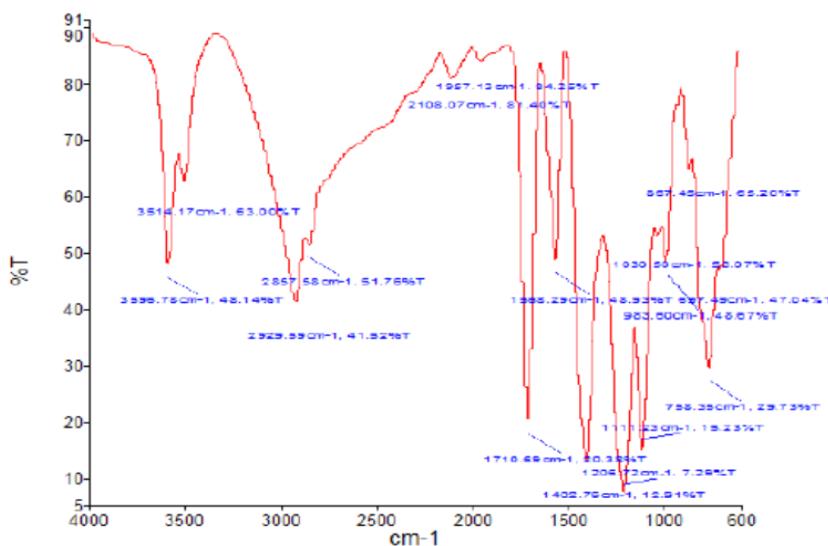
Senyawa nidulin yang digunakan pada penelitian diperoleh dari hasil isolasi senyawa jamur *A. unguis* WR8 oleh Handayani, *et. al.* (2020). Senyawa nidulin berbentuk kristal tidak berwarna, titik leleh 118,5-121,8 °C. Pada spektrum ultra violetnya diperoleh dua puncak panjang gelombang, dengan λ_{max} 203,80 nm dan 319,60 nm yang memperlihatkan adanya ikatan rangkap terkonjugasi (Gambar 4.20). Data spektrum IR memberikan pita serapan pada daerah bilangan gelombang 3596 cm^{-1} yang menunjukkan adanya gugus -OH,

2929-2857 (C – H aromatik), 1710,69 cm¹(C=O), 1568-1402 cm⁻¹ (C=C), 1205 cm⁻¹ (C–O pada alkohol atau fenol), 1030 cm⁻¹ (C–O–C pada eter) (Gambar 4.21., Tabel 4.3). Adapun spektrum massa memperlihatkan puncak ion molekuler [M]⁺ pada *m/z* 441,2; [M+2+H]⁺ 443,3; [M+3+H]⁺ 444,9 dan [M+4+H]⁺ 445,8 dengan rasio *abundance* 10:6,5:2,5:1. Adanya tiga puncak ini pada memperlihatkan adanya kandungan tiga atom klorin.



Gambar 4.20 Spektrum Ultra Violet Nidulin

Senyawa Al



Gambar 4.21 Spektrum Infra Merah Nidulin

Tabel 4.5 Data Spektrum Infra Merah Nidulin

No	Bilangan Gelombang (cm ⁻¹)	Jenis Ikatan/ gugus fungsi
1	3596	Regang O-H
2	2929, 2857	Regang C-H
3	1710	Regang C=O (Karbonil ester)
4	1568, 1402	Regang C=C
5	1205	Regang C-O
6	1030	Regang C-O-C

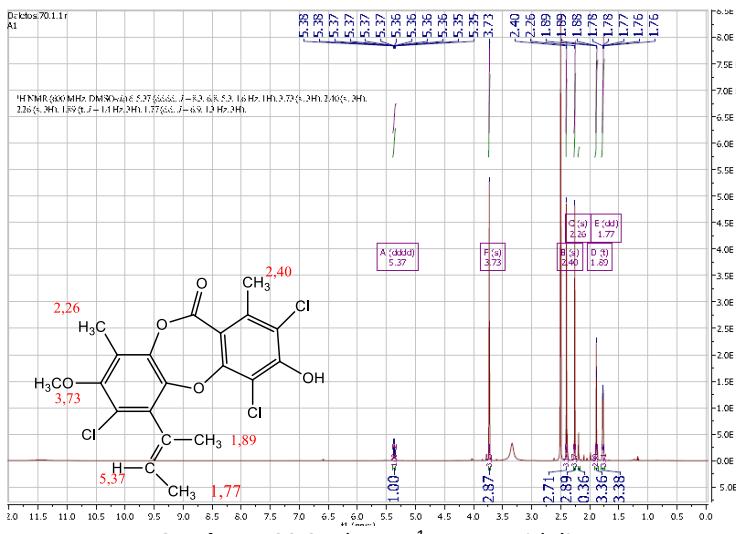
Spektrum Resonansi Magnetik Inti (RMI, 600 MHz, DMSO-*d*₆) proton senyawa nidulin memiliki pergeseran kimia (ppm) : 5,37 (1H); 3,73 (3H); 2,40 (3H) ; 2,26 (3H); 1,89 (3H) ; 1,77 (3H). Senyawa ini memiliki 5 gugus metil, dimana 3 gugus metil pada δ_H 3,73 ; δ_H 2,40 dan δ_H 2,26 memiliki puncak multiplisitas *singlet*, yang menjelaskan bahwa disebelah sinyal proton (H) tersebut atom karbonnya tidak memiliki atom proton. Sedangkan δ_H 5,37 dan δ_H 1,77 memiliki puncak sinyal *doublet* yang menunjukkan disebelah sinyal proton tersebut atom karbonnya memiliki 1 atom H (Gambar 4.22).

Analisa spektrum resonansi magnetik inti karbon (¹³C NMR) ini, data pergeseran kimia yang digunakan berasal dari spektrum 2D HSQC dan HMBC dengan pergeseran kimia (ppm) : 140,2; 121,2; 136,0; 152,5; 124,3; 142,0; 114,4; 19,2; 10,7; 60,8; 129,0; 128,0; 14,5; 17,9. Pergeseran kimia δ_C = 10,7; 14,5; 17,9; 19,2 menunjukkan 4 gugus metil (CH₃), dan pergeseran kimia δ_C 60,8 adanya gugus metil yang berikatan dengan oksigen. Data pergeseran kimia δ_C = 114,4; 121,2; 124,3; 128,0; 129,0; 136,0; 140,2; 142,0 dan 152,5 menunjukkan atom C kuartener.

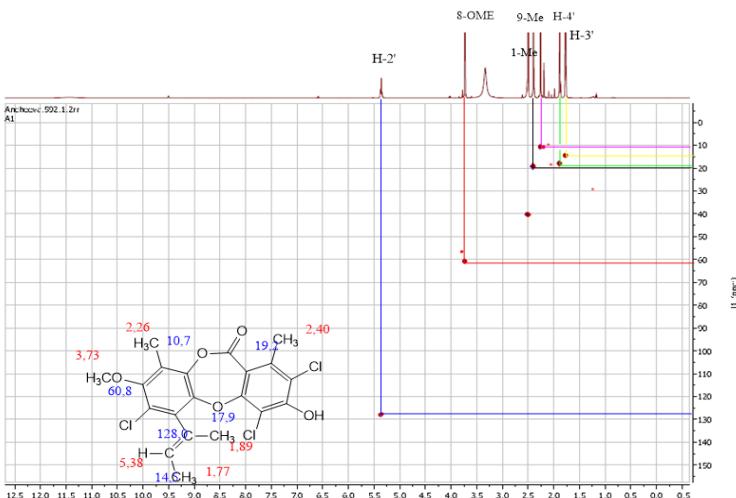
Analisa spektrum HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*) menunjukkan adanya korelasi langsung antara karbon dan hidrogen, karbon pada posisi C-3' (δ_C 14,5) dengan δ_H 1,77 ppm, karbon pada posisi C-4' (δ_C 17,9) dengan δ_H 1,89 ppm, karbon pada posisi -9-CH₃ (δ_C 10,7) dengan δ_H 2,26 ppm, karbon pada posisi -1-CH₃ (δ_C 19,2) dengan δ_H 2,40 ppm, karbon pada posisi C-8-OCH₃ (δ_C 60,8) dengan δ_H 3,73 ppm, dan karbon pada posisi C-2' (δ_C 128,0) dengan δ_H 5,37 ppm (Gambar 4.23). Sedangkan analisa spektrum HMBC menunjukkan korelasi proton pada posisi -1-CH₃ (δ_H 2,40) terhadap karbon pada posisi C-1 (δ_C 140,2), C-2 (δ_C 121,2) dan C-11a (δ_C 114,4). Korelasi proton pada posisi H₃-3'(δ_H 1,77) terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_C 136,0), C-1' (δ_C 129,0) dan C-2' (δ_C 128,0). Korelasi proton pada posisi H₃-4' (δ_H 1,89) terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_C 136,0), C-1'(δ_C 129,0) dan C-2' (128,0). Korelasi proton pada

posisi -9-CH₃ (δ_H 2,26) terhadap karbon pada posisi C-8 (δ_C 152,5), C-9 (δ_C 124,3) dan C-9a (δ_C 142,0). Korelasi proton pada posisi 8-O-CH₃ (δ_H 3,73) terhadap karbon pada posisi C-8 (δ_C 152,5). Korelasi proton pada posisi H-2' (δ_H 5,37) terhadap karbon pada posisi C-6 (δ_C 136,0) (Gambar 4.24).

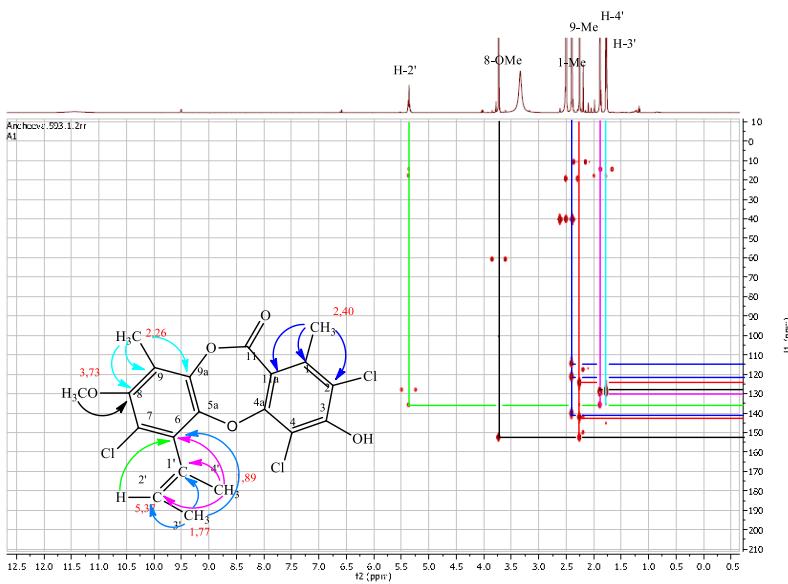
Dari data diatas dengan membandingkan data ¹H NMR dan ¹³C NMR senyawa A1 dengan data literatur (Sureram *et al*, 2012), dapat disimpulkan bahwa senyawa A1 adalah nidulin (Tabel 4.6 dan Gambar 4.25). Dengan rumus molekul C₂₀H₁₇Cl₃O₅.



Gambar 4.22 Spektrum ¹H NMR Nidulin



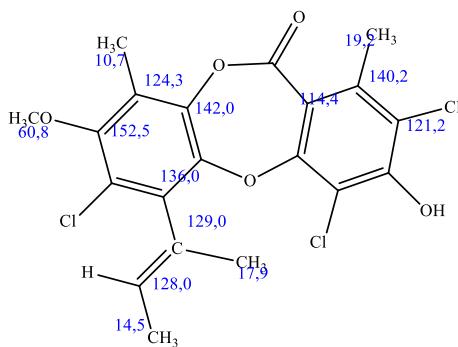
Gambar 4.23 Spektrum HSQC Nidulin



Gambar 4.24 Spektrum HMBC Nidulin

Tabel 4.6 Data Pergeseran Kimia ^{13}C NMR, ^1H NMR dan HMBC Senyawa A1 (Nidulin) (600 MHz, DMSO-d6) dan Literatur Nidulin (Sureram et al, 2012)

Posisi Atom C	Pergeseran Kimia				
	Senyawa A1(DMSO-d ₆)			Nidulin (aseton-d ₆)	
	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)	HMBC	δ _H (ppm)	δ _C (ppm)
1		140,2			138,6
2		121,2			123,1
3		n.o			162,5
4		n.o			111,4
4a		n.o			146,2
5a		n.o			158,5
6		136,0			135,9
7		n.o			123,9
8		152,5			152,2
9		124,3			123,3
9a		142,0			143,4
11		n.o			164,9
11a		114,4			103,1
1-Me	2.40 (3H,s)	19,2	C-1, C-2, C-11a	2,33 (3H, s)	18,8
9-Me	2.26 (3H,s)	10,7	C-8, C-9a, C-9	2,27 (3H, s)	9,7
8-OMe	3.73 (3H,s)	60,8	C-8	3,75 (3H, s)	60,1
1'		129,0			130,0
2'	5.37 (1H, dq, J=6,8 dan 1,6 Hz)	128,0	C-6	5,33 (1H, dq, J=6,7 dan 1,1 Hz)	127,3
3'	1.77 (3H, dd, J=6,9 Hz)	14,5	C-6, C-1', C-2'	1,72 (3H, d, J=6,7 Hz)	13,6
4'	1.89 (3H, s, J=1,4 Hz)	17,9	C-6, C-1', C-2'	1,87 (3H, s)	17,2



Gambar 4.25 Struktur Senyawa Nidulin

Senyawa nidulin pertama kali diisolasi dari jamur *Aspergillus nidulans* (Dean, Roberts, dan Robertson, 1954), sedangkan dari jamur *A. unguis* pertama kali diisolasi pada tahun 1987 oleh Nobuo Kawahara dari filtrat kultur media Czapek-Dox. Nidulin pertama kali diisolasi dari jamur *A. unguis* yang diperoleh dari spon laut yang belum teridentifikasi, dikultivasi menggunakan media *potato dextrose broth* (Sureram et al, 2012). Kemudian dari kultur media jamur *A. unguis* yang diperoleh dari rumput laut (Zhang et al, 2014), serta dari miselia jamur *A. unguis* yang diperoleh dari tanah (Klaiklay et al., 2016). Nidulin merupakan senyawa golongan depsidone terklorinasi. Depsidone merupakan turunan difeniloksida yang mempunyai sistem heterosiklik dari 1,4 – dioksasikloheptanon-7 sebagai hasil dari pembentukan ikatan ester antar molekul yang disebut diploicin (Dembitsky dan Tolstikov, 2003).

4.4. Aktivitas Antibakteri Senyawa Hasil Isolasi

Pengujian aktivitas senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* terhadap bakteri MRSA dilakukan dengan menentukan nilai MIC dan MBC. Nilai MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba uji yang mampu menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji (Puttaswamy et al., 2018). Standar pengujian antimikroba yang paling dikenal disediakan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) dan *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (Balouiri, Sadiki and Ibsouda, 2016; Schumacher et al., 2018). Sedangkan MBC didefinisikan sebagai konsentrasi agen antimikroba terendah yang diperlukan untuk membunuh 99,9% inokulum akhir setelah inkubasi selama 24 jam yang ditandai tidak adanya

pertumbuhan koloni pada media setelah 24 jam inkubasi (Balouiri, Sadiki and Ibnsouda, 2016).

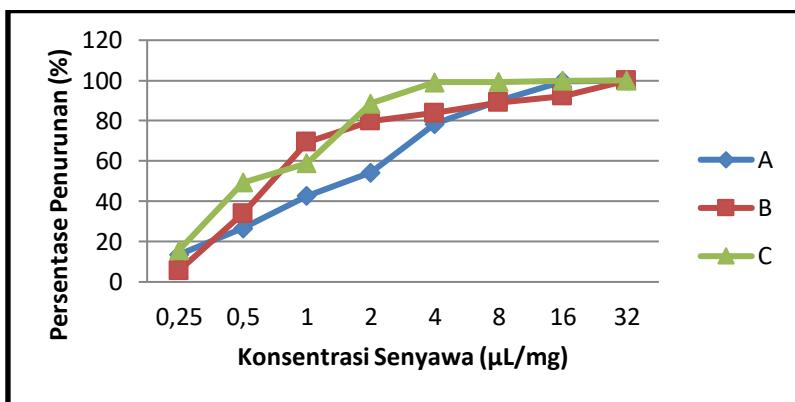
Senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* terdiri dari tiga senyawa yaitu 2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin dan ketiganya merupakan golongan senyawa depsidon. Metode yang digunakan untuk menentukan nilai MIC dan MBC pada pengujian ini adalah metode dilusi dengan menggunakan media *Muller Hinton Broth* (MHB). Prosedur penentuan nilai MIC/MBC ketiga senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dilakukan dengan berbagai variasi konsentrasi menggunakan pengenceran (0,25 µg/mL; 0,5 µg/mL; 1 µg/mL; 2 µg/mL; 4 µg/mL; 8 µg/mL; 16 µg/mL; 32 µg/mL).

Perhitungan jumlah koloni bakteri MRSA dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* pada media agar dan pengamatan secara visual. Metode TPC untuk memperkirakan jumlah total mikroorganisme dalam suatu pengujian aktivitas antimikroba. Analisis TPC menggunakan media *Plate Count Agar* (PCA) dengan hasil perhitungannya sebagai koloni yang dinyatakan dalam CFU/mL (Arifan *et al.*, 2019). Namun sebelumnya dilakukan deteksi pertumbuhan bakteri dengan melihat *optical density* (ELISA Microplate Reader BIOBASE-EL 10A Instruments) seperti yang telah dilakukan oleh (Valgas *et al.*, 2007) dengan tujuan untuk mengkonfirmasi ketepatan hasil yang akan diperoleh. Aktivitas bakteri MRSA terhadap ketiga senyawa tersebut dengan beberapa variasi konsentrasi ditentukan berdasarkan standar deviasi dari rata-rata jumlah koloni bakteri MRSA masing-masing yang ditunjukkan pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Rata-rata jumlah koloni bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* IB151 dengan variasi konsentrasi.

Senyawa	Konsentrasi (µg/mL)	Rata-Rata Jumlah koloni bakteri (cfu/mL)
2-chlorounguinol	32	$2,22 \times 10^8 \pm 8,33 \times 10^7$
	16	$3,7 \times 10^9 \pm 1,2 \times 10^9$
	8	$8,7 \times 10^{10} \pm 1,18 \times 10^{10}$
	4	$1,9 \times 10^{11} \pm 1,52 \times 10^{10}$
	2	$4,03 \times 10^{11} \pm 7,23 \times 10^{10}$
	1	$5,06 \times 10^{11} \pm 4,62 \times 10^{10}$
	0,5	$6,47 \times 10^{11} \pm 8,96 \times 10^{10}$
	0,25	$7,63 \times 10^{11} \pm 8,08 \times 10^{10}$
Unguinol	32	$2,67 \times 10^8 \pm 1,24 \times 10^8$
	16	$6,83 \times 10^9 \pm 2 \times 10^9$
	8	$9,67 \times 10^{10} \pm 1,82 \times 10^{10}$

	4	$1,43 \times 10^{11} \pm 6,42 \times 10^{10}$
	2	$1,77 \times 10^{11} \pm 7,57 \times 10^{10}$
	1	$2,7 \times 10^{11} \pm 7,09 \times 10^{10}$
	0,5	$5,83 \times 10^{11} \pm 1,33 \times 10^{11}$
	0,25	$8,33 \times 10^{11} \pm 6,43 \times 10^{10}$
Nidulin	32	$5,83 \times 10^7 \pm 4,73 \times 10^7$
	16	$1,63 \times 10^9 \pm 1,84 \times 10^9$
	8	$5,73 \times 10^{10} \pm 8,02 \times 10^{10}$
	4	$7,9 \times 10^{10} \pm 1,05 \times 10^{11}$
	2	$1 \times 10^{11} \pm 1,04 \times 10^{11}$
	1	$3,63 \times 10^{11} \pm 4,62 \times 10^{10}$
	0,5	$4,47 \times 10^{11} \pm 5,77 \times 10^9$
	0,25	$7,43 \times 10^{11} \pm 1,01 \times 10^{11}$



Gambar 4.26 Diagram persentasi tingkat penurunan jumlah koloni bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur A. *unguis* dengan variasi konsentrasi. Senyawa (A) 2-chlorounguinol (B) unguinol (C) nidulin

Tabel 4.8 Nilai MIC dan MBC Senyawa-senyawa dari jamur A. *unguis* terhadap bakteri uji MRSA

Senyawa	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
2-chlorounguinol	8	16
Unguinol	8	16
Nidulin	2	8

Dari tabel 4.7 terlihat bahwa rata-rata jumlah koloni bakteri yang diperoleh dari ketiga senyawa tersebut dengan variasi konsentrasi masing-masing memiliki jumlah yang sedikit dibandingkan rata-rata jumlah koloni

bakteri pada *native ligand* yang sebesar $8,83 \times 10^{11}$ CFU/mL. Pertumbuhan bakteri MRSA mengalami penurunan jumlah koloni pada interval variasi konsentrasi pada setiap senyawa mulai dari konsentrasi 0,25 µg/mL hingga konsentrasi 32 µg/mL seperti yang terlihat pada gambar 4.26. Diagram pada gambar tersebut menunjukkan persentasi tingkat penurunan jumlah koloni yang baik. Tingkat penurunan jumlah koloni yang dimiliki 2-chlorounguinol (90,15%) pada konsentrasi 8 µg/mL, unguinol (90,05%) pada konsentrasi 8 µg/mL dan nidulin (90,07%) pada konsentrasi 2 µg/mL lebih besar dari 90% ditetapkan sebagai nilai MIC. Artinya ketiga senyawa tersebut mampu menghambat 90 % pertumbuhan bakteri MRSA uji. Nilai MIC₉₀ yang diperoleh merupakan parameter penting untuk melaporkan hasil pengujian aktivitas agen antimikroba terhadap beberapa mikroorganisme yang diuji (Schwarz *et al.*, 2010).

Konsentrasi terendah dengan persentasi tingkat penurunan jumlah koloni yang berkisar 98%-99,9% dari ketiga senyawa diatas masing-masing berada pada konsentrasi yang terlihat pada tabel 4.8 mengindikasikan adanya kemampuan ketiga senyawa tersebut mampu membunuh bakteri MRSA atau ditandai dengan tidak tumbuhnya koloni bakteri MRSA pada seluruh permukaan media agar yang digunakan. Konsentrasi 16 µg/mL pada senyawa 2-chlorounguinol, konsentrasi 32 µg/mL pada unguinol dan konsentrasi 8 µg/mL pada nidulin dapat ditetapkan sebagai nilai MBC. Nilai MIC dan MBC yang diperoleh pada pengujian ini menunjukkan bahwa senyawa nidulin memiliki aktivitas yang tinggi dibandingkan kedua senyawa lainnya. Dari penelusuran literatur, aktivitas antibakteri yang kuat dari nidulin juga menunjukkan nilai MIC 4 µg/ml terhadap MRSA (Zhang *et al*, 2014). (Morshed *et al.*, 2018) juga melaporkan bahwa nidulin, 2-chlorounguinol dan unguinol memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* yang masing-masing memiliki nilai MIC 6,3 µg/ml, 25 µg/ml dan 12,5 µg/ml.

Ketiga senyawa memperlihatkan aktivitas antibakteri yang tentunya juga disebabkan adanya senyawa nidulin memiliki kandungan tiga atom klorin pada posisi C-2, C-4 dan C-7. Senyawa 2-chlorounguinol mempunyai satu atom klorin yang terkoneksi pada posisi C-2 dibandingkan unguinol yang tidak mengandung atom klorin. Aktivitas antibakteri senyawa bila dihubungkan dengan adanya atom halogen disebabkan mekanisme kerja klorin sebagai antibakteri ini berdasarkan karakteristik dari *Chlorine-releasing agents* (CRAs). CRAs merupakan senyawa aktif pengoksidasi yang mengganggu aktivitas sel protein bakteri, penetrasi CRAs pada lapisan luar sel sangat dipengaruhi oleh tingkat keasaman lingkungan dan konsentrasi CRAs. Selain itu diketahui bahwa klorin dan iodine merupakan komponen dasar yang sering digunakan secara klinik sebagai halogen mikrobisid, secara umum digunakan sebagai antiseptik dan

desinfektan (McDonnell and Russell, 1999). Di sisi lain, berbagai penelitian melaporkan bahwa adanya atom halogen pada struktur farmakofor dapat bermanfaat untuk aktivitas antimikroba yang sejauh ini meningkatkan kelarutan lipid dan jaringan, serta memiliki reaktivitas yang signifikan tergantung pada struktur molekulnya (Kitani *et al.*, 1997; Tang *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2013)

4.5. Analisa *in silico* Senyawa Hasil Isolasi Jamur *A. unguis*

Analisis *in silico* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *molekular docking* yang berbasis komputasi. Metode *docking* digunakan untuk memprediksi sisi aktif senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dengan menargetkan protein-protein bakteri MRSA yang dipilih berdasarkan studi literatur. Syarat yang perlu dilakukan sebelum memulai *docking* yaitu menyiapkan ligan dan makromolekul (protein) yang akan digunakan pada penelitian ini. Ligan-ligan yang digunakan pada penelitian ini adalah senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* yaitu 2-chlorouruguinol, unguinol dan nidulin dalam bentuk struktur 3D. Struktur ligan yang digunakan telah dilakukan optimasi geometri dengan tujuan untuk menghasilkan energi terendah yang menunjukkan kestabilan struktur kimia. Adapun protein yang digunakan sebagai target adalah *Staphylococcus aureus* PBP2a (PDB ID 4CJN Chain B), BlaR1 (PDB ID 3Q81 Chain A) dan MecR1 (PDB 2IWD Chain A) dalam bentuk struktur 3D. Protein tersebut telah berikatan dengan *native ligand* obat inhibitor *S. aureus* MRSA yang diunduh dari *Protein Data Bank* (PDB). *Native ligand* obat atau *native ligand* yang disebutkan merupakan antibiotik yang didesain untuk penghambatan sintesis dinding sel. Informasi makromolekul yang digunakan dapat dilihat pada tabel 4.9.

Tabel 4.9 Informasi makromolekul dan ligan kristalografi

No	PBP2a	BlaR1	MecR1
PBP ID	4CJN Chain B	3Q81 Chain A	2IWD Chain A
Organisme	<i>S. aureus</i> Mu50	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> N315
Metode	X-Ray Difraction	X-Ray Difraction	X-Ray Difraction
Resolusi	1,95 Å (E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)benzoic acid	2 Å	2,4 Å
Ligan	Imipenem	Oxacilin	

Docking dijalankan dengan menggunakan Autodock Vina pada program PyRx 9.5. Secara spesifik, *docking* dilakukan dengan mengatur makromolekul

sedemikian rupa dan menentukan gridbox yang dipilih sesuai dengan hasil kristalisasi x-ray ikatan *native ligand* inhibitor dengan protein yang telah diunduh. Pengaturan pada grid box meliputi center_x, center_y, center_z, untuk mengatur letak parameter box pada makromolekul protein, kemudian size_x, size_y, size_z, untuk menentukan besar kecilnya grid box untuk ruang berikatan ligan tersebut. Metode ini memberikan prediksi kekuatan interaksi antara reseptor dan ligan, berdasarkan nilai *binding affinity* dan interaksi ligan dengan residu protein. Semakin negatif nilai yang diperoleh, maka semakin kuat interaksi yang terjadi antara reseptor dan ligan. Program PyMol 2.3.1 digunakan untuk visualisasi hasil *docking*, sementara program LigPlot 2.1 digunakan untuk melihat interaksi asam amino yang terjadi.

4.5.1. Target Protein PBP2a

Faktor utama timbulnya MRSA disebabkan karena adanya resistensi yang terjadi akibat ekspresi *Penicillin Binding Protein* 2a (PBP2a) yang memiliki afinitas rendah terhadap antibiotik golongan β -laktam. Ekspresi protein PBP2a ini memiliki peranan penting dalam biosintesis peptidoglikan atau dinding sel, sehingga protein PBP2a merupakan target utama terhadap senyawa hasil isolasi pada penelitian ini yang dilakukan dengan metode *molecular docking*.

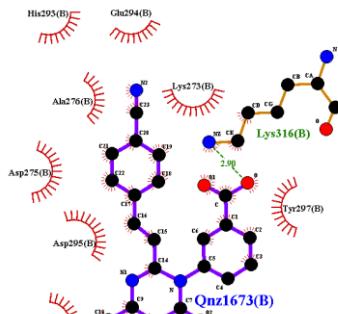
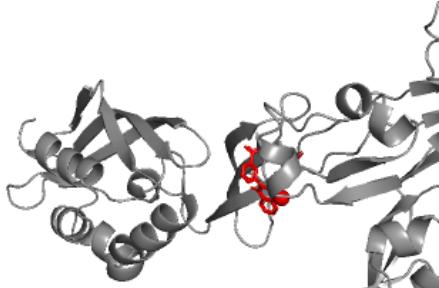
Tabel 4.10 Hasil docking ligan/senyawa hasil isolasi jamur A. unguis

Senyawa	Target	<i>Binding affinity</i> (kcal/mol)
(E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)benzoic acid	PBP2a	-6.6
2-chlorounguinol	PBP2a	-6.7
Unguinol	PBP2a	-6.6
Nidulin	PBP2a	-6.0

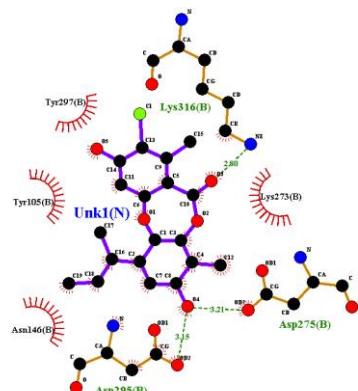
Data hasil *docking* PBP2a *S. aureus* MRSA dengan ligan senyawa isolasi jamur A. unguis dan *native ligand* inhibitor terlihat pada tabel 4.10 bahwa senyawa 2-chlorounguinol dan unguinol diperingkatkan memiliki nilai *binding affinity* yang terbaik karena nilainya mendekati *native ligand*. Pemilihan peringkat terbaik berdasarkan nilai *binding affinity* dan RMSD (jarak ikatan) terendah. Dari hasil data tersebut diperoleh nilai *binding affinity* pada senyawa 2-chlorounguinol sebesar -6,7 kcal/mol, pada senyawa unguinol sebesar -6,6

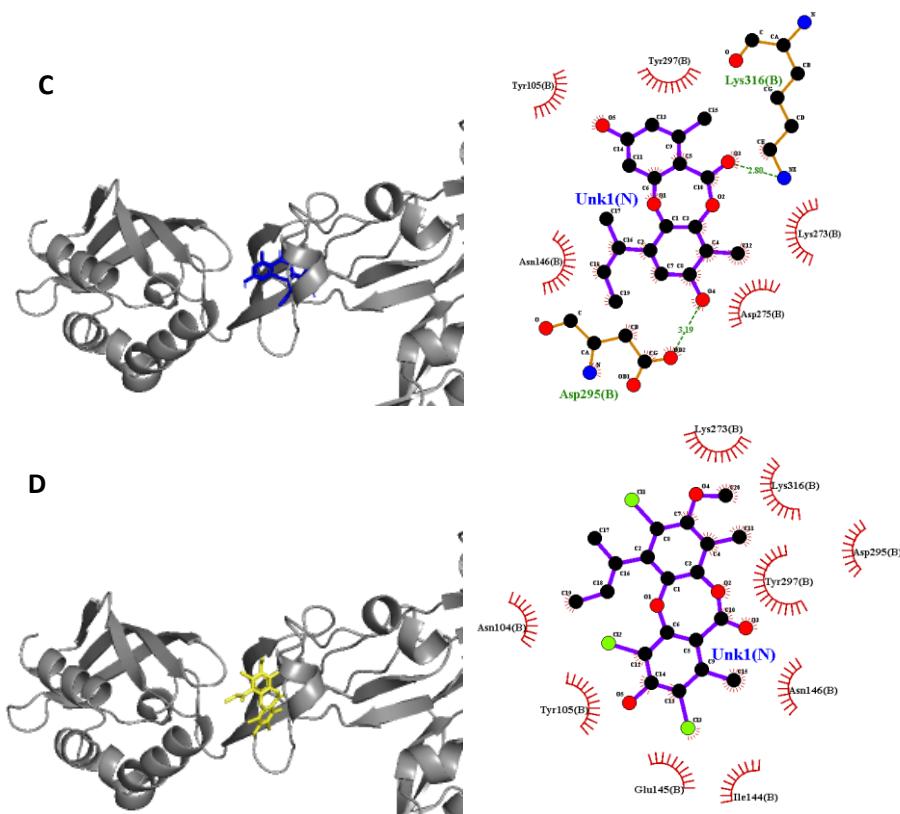
kkal/mol sedangkan *native ligand* sebesar -6,6 kkal/mol. Nilai *binding affinity* pada senyawa 2-chlorourguinol memiliki nilai yang lebih baik dibandingkan dengan *native ligand*, sehingga besar potensi senyawa tersebut dapat berperan sebagai inhibitor seperti peranan Quinazolin sebagai *native ligand* dalam menghambat PBP2a.

A



B





Gambar 4.27 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dengan protein target PBP2a. A: (E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) benzoic acid (native ligand), B: 2-chlorourguinol, C: unguinol, D: nidulin

Tabel 4.11 Interaksi senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dengan PBP2a

Ligan	Residu asam amino yang terlibat berdasarkan model interaksi	
	Interaksi Hidrofobik	Ikatan Hidrogen
2-cholorourguinol	Tyr297, Tyr105, Asn146 , Lys273	Lys316, Asp295, Asp275
Unguinol	Tyr297, Tyr105, Asn146 , Lys273, Asp275	Lys316, Asp295
Nidulin	Tyr297, Tyr105, Asn146 , Asn104, Glu145, Ile144	Lys316

(E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) benzoic acid Asn**146**, Lys**273**, His293, Glu294, Ala276, Asp275, Asp295, Tyr316

Ket: Bold merupakan residu asam amino yang sama antara *native ligand* dan ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis*

Hasil visualisasi LigPlot (Gambar 4.27, Tabel 4.11) terlihat bahwa ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dapat berinteraksi dengan protein target pada posisi yang sama dengan *native ligand* inhibitor karena terdapat residu asam amino yang sama antara *native ligand* dan ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis*. Interaksi yang dihasilkan adalah interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Secara umum, bagian yang menunjukkan adanya interaksi ikatan hidrogen pada ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dan *native ligand* adalah residu asam amino Lys316, Asp295, dan Asp275.

Ikatan hidrogen antara ligan dan protein target memiliki jarak ikatan yang digambarkan dalam satuan angstrom (Å). 2-chlorouruguinol memiliki interaksi asam amino yang kemiripannya paling banyak dibandingkan uruguinol dan nidulin. Gugus karbonil 2-chlorouruguinol pada posisi C11 berinteraksi dengan PBP2a pada asam amino Lys316 membentuk ikatan hidrogen dengan jarak ikatan sebesar 2,80 Å, sementara dengan *native ligand* membentuk jarak ikatan sebesar 2,90 Å. Selain itu, Gugus hidroksil 2-chlorouruguinol pada posisi C8 memiliki interaksi hidrogen pada asam amino Asp295 (3,15 Å) dan Asp275 (3,21 Å) (Tabel 4.11). *Binding affinity* yang rendah dengan tambahan interaksi ini menjadikan ikatan antara ligan senyawa 2-chlorouruguinol dan PBP2a MRSA lebih stabil dan kuat. Sehingga senyawa 2-chlorouruguinol berpotensi sebagai inhibitor PBP2a.

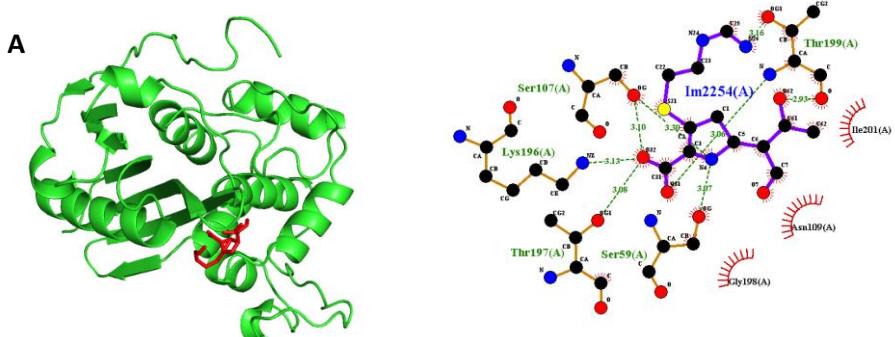
4.5.2. Target Protein BlaR1 dan MecR1

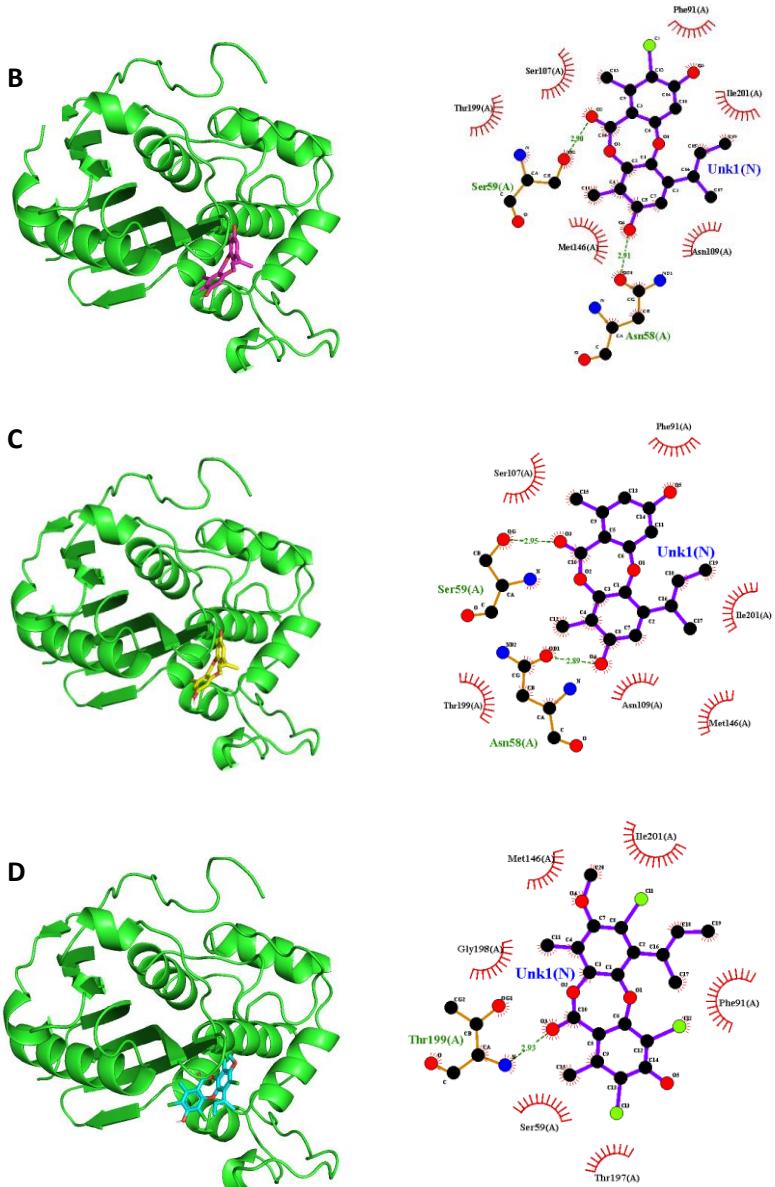
Ekspresi protein PBP2a terjadi karena adanya elemen genetik *Staphylococcal Cassette Chromosome mec* (SCCmec) yang membawa gen *mecA* sebagai pengkode PBP2a. *Native ligand* utama dari ekspresi *mecA* tergantung pada regulator yang disandikan oleh *mecl* dan *mecR1*. MecR1 dan Mecl masing-masing memiliki homolog sekuen protein tinggi dengan protein blaR1 dan blaI. Selain protein PBP2a, protein BlaR1 dan MecR1 juga bertindak sebagai target efektif pada bakteri MRSA yang mampu mencegah serangan dari antibiotik β-laktam.

Tabel 4.12 Hasil docking ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis*

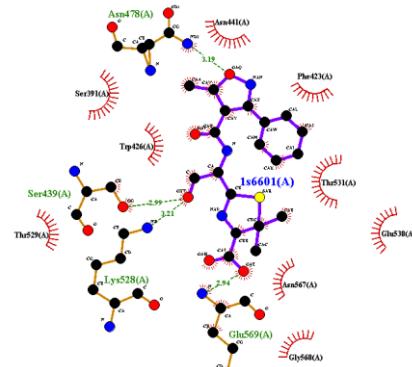
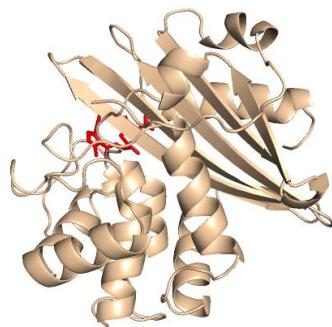
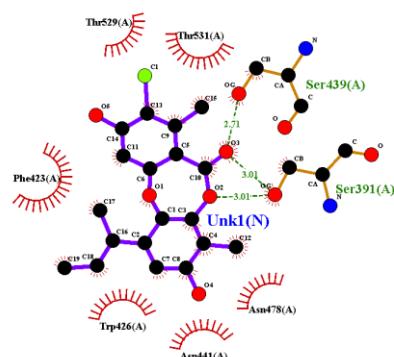
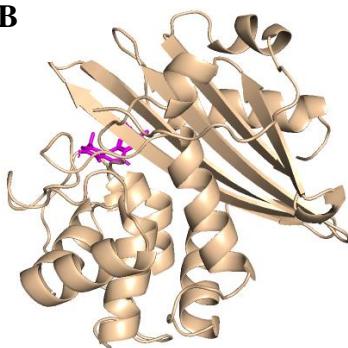
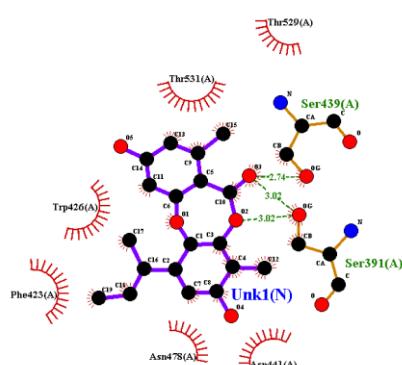
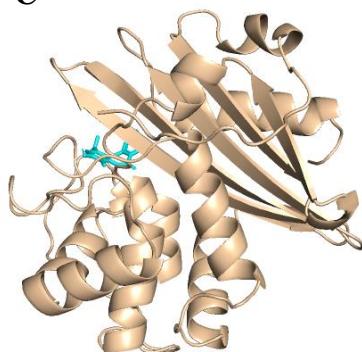
Target	Senyawa	Binding affinity (kcal/mol)
MecR1	Oxacilin	-7.8
	2-chlorouruguinol	-7.8
	Unguinol	-7.5
	Nidulin	-7.6
BlaR1	Imipenem	-5.5
	2-chlorouruguinol	-7.1
	Unguinol	-7.0
	Nidulin	-6.7

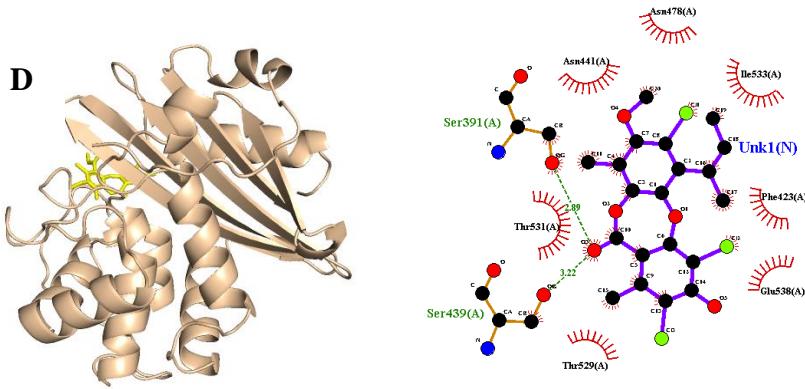
Hasil docking MecR1 dan BlaR1 *S. aureus* MRSA dengan ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* terlihat pada tabel 4.12 bahwa senyawa 2-chlorouruguinol memiliki nilai yang lebih baik dibandingkan ligan lainnya. Karena nilai *binding affinity*nya mendekati atau lebih kecil dibandingkan nilai *binding affinity* yang dimiliki oleh *native ligand* baik pada target MecR1 maupun BlaR1. Seperti yang terlihat pada tabel 4.11 nilai *binding affinity* senyawa 2-chlorouruguinol pada MecR1 sebesar -7.8 kcal/mol dan pada BlaR1 sebesar -7.1 kcal/mol. Sehingga besar potensi senyawa tersebut dapat berperan sebagai inhibitor seperti peranan *native ligand* dalam menghambat BlaR1 dan MecR1. Selain berdasarkan nilai *binding affinity*, potensi senyawa tersebut juga berdasarkan pada nilai RMSD terendah. Nilai RMSD ini diperoleh dari interaksi yang terjadi antara ikatan pada ligan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dengan target BlaR1 dan MecR1 yang digambarkan dalam satuan angstrom (Å).





Gambar 4.28 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dengan BlaR1.
A: Imipenem (*native ligand*), **B:** 2-chlorounguinol, **C:** unguinol, **D:** nidulin.

A**B****C**



Gambar 4.29 Gambaran interaksi senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* IB151 dengan MecR1. **A:** Oxacilin (*native ligand*), **B:** 2-chlorounguinol, **C:** unguinol, **D:** nidulin

Tabel 4.13 Interaksi senyawa hasil isolasi jamur *A. Unguis* dengan protein target BlaR1 dan MecR1

Target	Ligan	Residu asam amino yang terlibat berdasarkan model interaksi	
		Ikatan Hidrofobik	Ikatan Hidrogen
BlaR1	Imipenem	Gly198, Ile201, Asn109	Ser107, Lys196, Thr197, Ser59, Thr199
	2-chlorounguinol	Thr199, Ser107, Phe91, Ile201, Asn109	Ser59, Asn58
	Unguinol	Ser107, Phe91, Ile201, Asn109 , Met146, Thr199	Asn58, Ser59
MecR1	Nidulin	Met146, Gly198, Ile201, Phe91, Ser59, Thr197	Thr199
	Oxacilllin	Ser391, Trp426, Asn567, Gly568, Asn567, Glu538, Thr531, Phe423, Asn441, Gly568, Thr529	Asn478, Ser439, Lys528, Glu569

2-chlorounguinol	Thr529, Thr531, Asn478, Asn441, Trp426, Phe423	Ser439, Ser391
Unguinol	Phe423, Trp426, Thr531, Thr529, Asn441, Asn478	Ser439, Ser391
Nidulin	Asn441, Asn478, Ile533, Phe423, Glu538, Thr529, Thr531	Ser391 , Ser439

Ket: Bold merupakan residu asam amino yang sama antara *native ligand* dan ligan pembanding

Hasil visualisasi LigPlot (Gambar 4.28; 4.29, Tabel 4.13), terlihat bahwa ligan senyawa hasil isolasi *A. unguis* dapat berinteraksi dengan protein target BlaR1 maupun MecR1 pada posisi yang sama dengan *native ligand* inhibitor karena terdapat residu asam amino yang sama antara *native ligand* dan ligan pembanding. Interaksi dihasilkan adalah interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen. Residu-residu asam amino BlaR1 yang berinteraksi dengan ikatan hidrogen pada *native ligand* pembanding adalah Ser107, Lys196, Thr197, Ser59 dan Thr199. Interaksi ikatan hidrogen yang sama dengan *native ligand* yang terikat dengan residu asam amino Ser59 berjarak 2,90 Å pada 2-chlorounguinol dan 2,95 Å pada unguinol, sementara nidulin terikat pada residu asam amino Thr199 yang berjarak 2,93 Å (Gambar 4.28).

Residu-residu asam amino MecR1 yang berinteraksi dengan ikatan hidrogen pada *native ligand* pembanding adalah Asn478, Ser439, Lys528, dan Glu569. Interaksi ikatan hidrogen yang sama dengan *native ligand* yang terikat dengan residu asam amino Ser439 yang berjarak 2,71 Å pada posisi C11 2-chlorounguinol, 2,74 Å pada posisi C11 unguinol dan 3,22 Å pada posisi C11 nidulin (Gambar 4.29). Seperti yang terlihat pula pada tabel 4.8, 2-chlorounguinol memiliki kemiripan paling banyak dengan interaksi hidrofobik asam amino antara ligan *native ligand* dan kedua protein target. Sehingga besar potensi senyawa tersebut dapat berperan sebagai inhibitor seperti peranan *native ligand* dalam menghambat BlaR1 dan MecR1.

4.6. Hubungan Struktur dengan Aktivitas Senyawa Hasil Isolasi

Aktivitas antibakteri senyawa hasil isolasi dari jamur *A. unguis* ini tentunya diharapkan memiliki aktivitas yang sama dengan obat antibiotik dalam menghambat aktivitas bakteri MRSA saat ini. Ekspresi protein target PBP2a, BlaR1 dan MecR1 memiliki peranan penting dalam biosintesis peptidoglikan atau dinding sel, sehingga menjadi target utama terhadap senyawa hasil isolasi

pada penelitian ini yang dilakukan dengan metode *molecular docking*. Ketiga senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* memperlihatkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap bakteri MRSA uji beserta *native ligand* sebagai kontrol obat. Ketiga senyawa tersebut adalah 2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin, sedangkan *native ligand* yang terkait berupa antibiotik quinazolin, imipenem, oxacilin.

(E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl) benzoic acid merupakan senyawa sintesis dari quinazolinon yang efektif terhadap MRSA yang telah dilaporkan oleh Gatadi *et al.* (2019). Quinazolinon dan sintesisnya telah terbukti dan teridentifikasi sebagai agen antibakteri yang kuat (Saravanan, Alagarsamy and Prakash, 2013; Zayed and Hassan, 2014; Bouley *et al.*, 2016; Jadhavar *et al.*, 2016). Bagian yang berinteraksi pada senyawa (E)-3-(2-(4-cyanostyryl)-4-oxoquinazolin-3(4H)-yl)benzoic acid sebagai pembanding positif PBP2a adalah residu pada Asp275, Asp295, Asn146, Lys273, Tyr316 dan Lys316.

Senyawa kandidat yang memiliki potensi antibakteri terbaik pada PBP2a MRSA dilihat dari energi ikatan adalah senyawa 2-chlorounguinol dan unguinol. Senyawa tersebut berinteraksi dengan residu yang mirip dengan interaksi pada *native ligand* pembanding. Interaksi yang dihasilkan berupa ikatan hidrogen pada Lys316. Peningkatan interaksi ikatan ligan dengan reseptor akan menyebabkan nilai energi ikatan semakin kecil. Hal ini ditunjukkan dengan perbandingan nilai *binding affinity*. Selain ikatan hidrogen terjadi, interaksi yang lain juga dapat mempengaruhi. 2-chlorounguinol dan unguinol juga memiliki interaksi hidrofobik yang sama pada residu Asn146 dan Lys273. Namun, adanya interaksi pada residu berikatan secara ikatan hidrogen akan memiliki respon lebih besar menurunkan nilai *binding affinity* seperti pada senyawa 2-chlorounguinol. Karena ikatan hidrogen lebih kuat dari interaksi van der waals (aromatik dan hidrofobik) (Patrick, 2001).

Imipenem adalah antibiotik golongan karbapenem β -laktam yang merupakan turunan amidin dari thienamycin. Imipenem menunjukkan aktivitas antimikroba yang luas terhadap hampir semua bakteri gram negatif dan gram positif (Kahan *et al.*, 1983; Carbone *et al.*, 1987). Terhadap bakteri gram-negatif, imipenem dilaporkan mampu menghindari mekanisme resistensi klasik melalui afinitas tinggi untuk PBP 2 dan penetrasi yang baik dari dinding sel (Carbone *et al.*, 1987; (Williams, Yang and Livermore, 1986). imipenem menyebabkan kerusakan dinding sel pada MRSA dengan cara mengikat PBP 2' dan PBP4 (Matsuda *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2019). Imipenem digunakan sebagai pembanding positif BlaR1 MRSA, bagian yang berinteraksi adalah residu pada Gly198, Ile201, Asn109, Ser107, Thr197, Ser59 dan Thr199. Senyawa kandidat yang memiliki terbaik potensi antibakteri pada BlaR1 MRSA dilihat dari energy ikatan adalah senyawa 2-Chlorounguinol. Senyawa tersebut berinteraksi dengan

residu yang mirip dengan interaksi pada *native ligand* pembanding. Interaksi yang dihasilkan 2-chlorouguinol berupa ikatan hidrogen pada Ser59 dan Asn58 serta yang beda lainnya pada Ser107, Lys190, Thr197 dan Thr199 pada Imipenem. Peningkatan interaksi ikatan ligan dengan reseptor akan menyebabkan nilai energi ikatan semakin kecil. Namun, perbandingan nilai *binding affinity* dibanding Imipenem terlihat sama sebesar -7,8 kcal/mol. Selain ikatan hidrogen terjadi, interaksi yang lain juga dapat mempengaruhi salah satunya interaksi hidrofobik yang sama pada residu Ile201 dan Asn109.

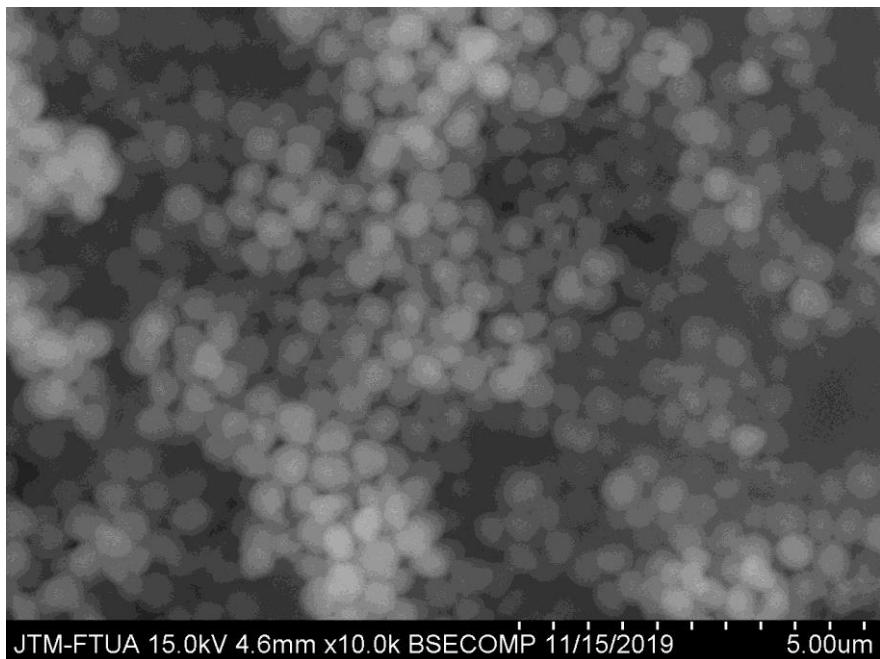
Resistensi terhadap methicillin dan oxacillin disebabkan oleh perolehan elemen genetik SCCmec (*staphylococcal kaset kromosom mec*) (Deurenberg and Stobberingh, 2009). Regulasi ekspresi *mecA* dikendalikan oleh regulatornya *mecR1* dan *mecl* yang dilakukan juga pada elemen SCCmec. Dengan tidak adanya antibiotik β -laktam, transkripsi *mecA* ditekan oleh *Mecl* yang terikat pada daerah promotornya. Deteksi β -laktam oleh domain sensorik di *MecR1* menghilangkan represi transkripsi *mecA* oleh *Mecl*, yang mengarah ke transkripsi *mecA*, terjemahan PBP2a, dan ekspresi resistensi methicillin (Tesch *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1993). Sistem BlaRI/Blal juga merespon oxacilin untuk menginduksi ekspresi *mecA* pada MRSA (Hackbarth and Chambers, 1993; Memmi *et al.*, 2008). Bagian yang berinteraksi pada senyawa oxacilin sebagai pembanding positif *MecR1* adalah residu pada Ser391, Trp426, Glu538, Thr531, Phe423, Asn441, Thr529, Asn478 dan Ser439. Ketiga senyawa kandidat memiliki potensi antibakteri terbaik pada PBP2a *MecR1* dilihat dari energi ikatan yang lebih kecil dibanding oxacilin. Interaksi yang dihasilkan berupa ikatan hidrogen pada Lys316. Peningkatan interaksi ikatan ligan dengan reseptor akan menyebabkan nilai energi ikatan semakin kecil. Hal ini ditunjukkan dengan perbandingan nilai *binding affinity*. Selain ikatan hidrogen terjadi, interaksi yang lain juga dapat mempengaruhi. 2-chlorouguinol dan unguinol juga memiliki interaksi hidrofobik yang sama pada residu Asn146 dan Lys273. Namun, adanya interaksi pada residu berikatan secara ikatan hidrogen akan memiliki respon lebih besar menurunkan nilai *binding affinity* seperti pada senyawa 2-chlorouguinol.

4.7. Morfologi Dinding Sel Bakteri MRSA setelah Perlakuan Senyawa

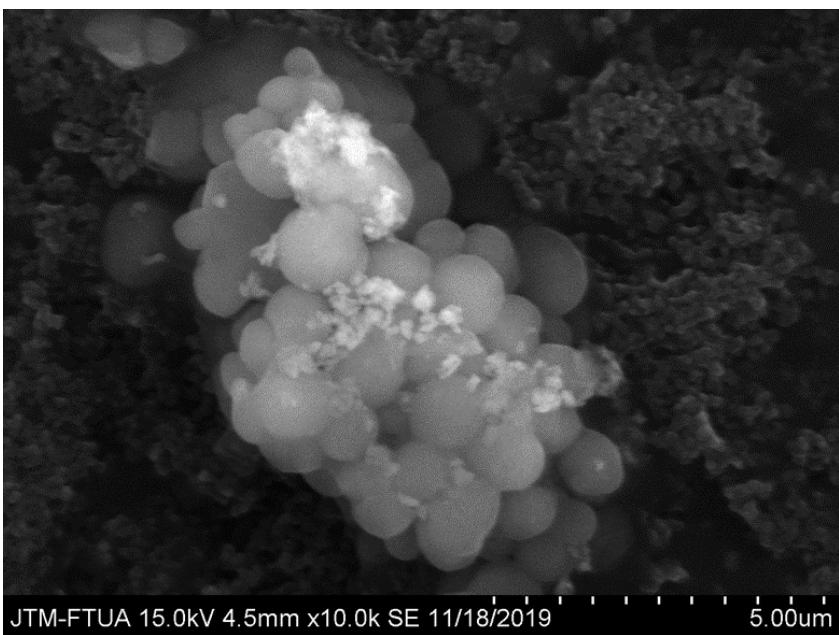
Aktivitas bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* menunjukkan kemampuan senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* yang mampu menghambat dan membunuh bakteri MRSA. Penentuan mekanisme aktivitas bakteri MRSA terhadap senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* dilakukan dengan menggunakan metode *Scanning Electron Microscope* (SEM). Penggunaan SEM ditujukan untuk mengamati perubahan pada morfologi dinding sel bakteri MRSA. Hasil SEM menunjukkan morfologi sel MRSA mengalami perubahan setelah

pemberian senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* jika dibandingkan dengan sel normal.

Bakteri MRSA dalam keadaan normal memiliki permukaan yang halus dan licin, berbentuk bulat dan bergerombol seperti terlihat pada gambar 4.31 , sedangkan dengan adanya pemberian senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* konsentrasi MIC 16 $\mu\text{g/mL}$ menjadikan permukaan sel yang kasar dan sel menjadi mengkerut seperti terlihat pada gambar 4.32, 4.33 dan 4.34. Pemberian senyawa 2-chlorounguinol (gambar 4.32) memperlihatkan permukaan sel yang kasar dan sel menjadi mengkerut lebih banyak dibandingkan pada pemberian senyawa unguinol (Gambar 4.33) dan nidulin (Gambar 4.34). Selain itu, pengamatan SEM dengan perbesaran yang sama pada gambar 4.31, ukuran sel bakteri MRSA dengan pemberian ketiga senyawa tersebut juga terlihat lebih besar daripada *native ligand*.



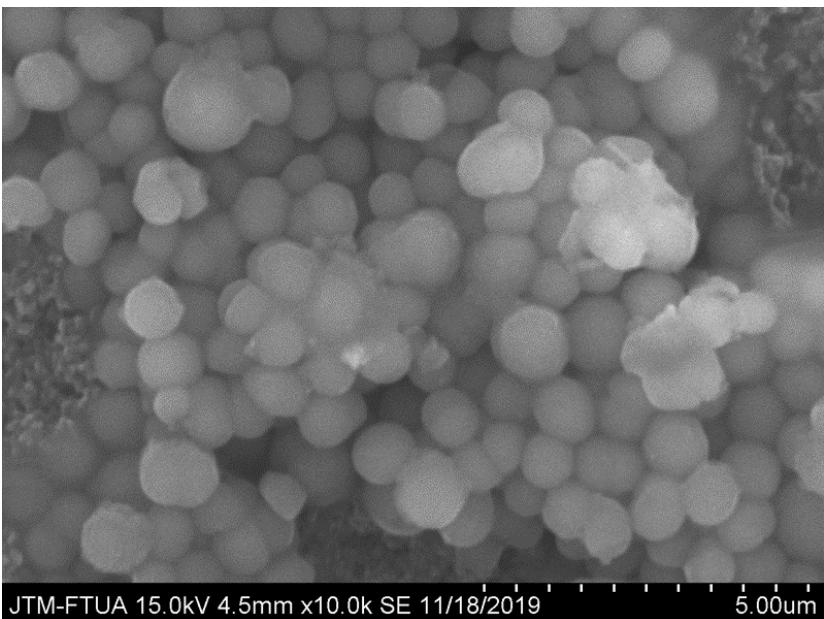
Gambar 4.30 SEM micrograph bakteri MRSA (normal)



Gambar 4.31 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian 2-chlorourguinol



Gambar 4.32 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian unguinol



JTM-FTUA 15.0kV 4.5mm x10.0k SE 11/18/2019 5.00um

Gambar 4.33 SEM micrograph bakteri MRSA setelah pemberian nisin

Permukaan sel mengkerut dan terdapat tonjolan-tonjolan kecil yang kasar akibatnya sel tersebut membulat dengan tidak teratur pada bakteri MRSA. Proses ini disebabkan karena pembelahan sel tidak dapat terjadi dengan sempurna akibat perlakuan dengan pemberian ketiga senyawa tersebut. Kerusakan dinding sel yang terjadi kemungkinan karena proses sintesis peptidoglikan sel yang terganggu dan tentunya mempengaruhi penghambatan MRSA. Menurut Gilbert (1984), terbentuknya tonjolan-tonjolan kecil pada sel bakteri disebabkan ketidakmampuan peptidoglikan sel yang rusak oleh senyawa antibakteri menahan tekanan intraseluler yang tinggi, sehingga sitoplasma dan membran sitoplasma keluar dan tonjolan ini biasanya muncul pada daerah-daerah yang dilemahkan oleh senyawa antibakteri (Gilbert, 1984). Terbentuknya tonjolan juga merupakan tanda terganggunya proses biosintesis dinding sel yang umumnya terjadi pada konsentrasi zat antibakteri pada nilai MIC.

Timbulnya perubahan pada permukaan bakteri MRSA karena pemberian hasil senyawa sintesis, senyawa hasil isolasi dari tumbuhan dan antibiotik β -laktam (oksasillin, ampisilin, vankomisin, gentamisin, dan eritromisin) melalui analisis SEM telah dilaporkan pada studi sebelumnya (Ramos *et al.*, 2006; Al-Habib *et al.*, 2010; Hirai *et al.*, 2010; Woźnicka *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2014; Chew *et al.*, 2018). Pada penelitian ini pola perubahan yang serupa diamati

dengan adanya pemberian ketiga senyawa (2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin) hasil isolasi jamur *A. unguis* dari spons *A. ingens*. Analisis *in silico* telah memberikan informasi tentang mekanisme interaksi antara ketiga senyawa ini dengan protein target PBP2a, MecR1 dan BlaR1. Senyawa 2-chlorounguinol dan unguinol memiliki ikatan hidrogen antar residu asam amino yang terikat bersifat hidrofilik dan berinteraksi dengan peptidoglikan yang hidrofobik. Proses ini mengganggu permeabilitas membran, sehingga memudahkan semua komponen senyawa tersebut masuk ke membran sitoplasma. Molekul kimia senyawa tersebut terakumulasi dalam membran sitoplasma menyebabkan membran sel mengembang (*swelling*). Proses *swelling* ini menyebabkan permeabilitas dan fluiditas membran berubah (Sikkema, de Bont and Poolman, 1994).

Senyawa-senyawa hidrokarbon yang mengandung gugus hidroksil yang bersifat asam lemah dalam senyawa tersebut dapat bertindak sebagai *carrier transmembran* dari kation monovalen dengan mengeluarkan kation monovalen dari membran dan menukarnya dengan proton. Proses ini mengganggu kestabilan membran dan menurunkan potensial membran. Nilai pH dalam membran akan menurun, dan merusak kerja normal enzim-enzim yang terlibat dalam metabolisme sel termasuk enzim yang berperan dalam pembentukan dinding sel (Ultee, Bennik and Moezelaar, 2002). Kerusakan dinding sel akibat pemberian senyawa hasil isolasi jamur *A. unguis* menyiratkan bahwa senyawa mengikat protein target yang memiliki peran pada sintesis dinding sel, sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri ataupun mengalami lisis yang menyebabkan kematian bakteri MRSA.

BAB 5

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Jamur *Aspergillus unguis* IB151 yang berasal dari spons laut *Acanthostrongylophora ingens* dapat menghasilkan senyawa bioaktif yang potensial dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA.
2. Dari ekstrak etil asetat *Aspergillus unguis* IB151 diperoleh 3 senyawa turunan depsidone yaitu 2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin. Semua senyawa tersebut dapat menghambat pertumbuhan MRSA dengan nilai MIC; 8 µg/mL (2-chlorounguinol dan unguinol) dan 2 µg/mL (nidulin), sedangkan nilai MBC; 16 µg/mL (2-chlorounguinol dan unguinol) dan 8 µg/mL (nidulin).
3. Interaksi yang terjadi antara ketiga senyawa turunan depsidon dengan sisi aktif protein target MRSA secara *in silico* ditentukan berdasarkan nilai *binding affinity*. 2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin terikat dengan protein target (PBP2a, MecR1 dan BlaR1) dengan nilai *binding affinity* -6,0 hingga -7,8 kkal/mol.
4. Berdasarkan hasil analisis SEM dapat diketahui bahwa morfologi sel MRSA mengalami perubahan setelah pemberian 2-chlorounguinol, unguinol dan nidulin jika dibandingkan dengan sel normal. Hal ini membuktikan ketiga senyawa tersebut menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri MRSA dan berakhir pada kematiannya.

5.2. Saran

1. Simulasi dinamika molekul (MD) dalam biologi molekuler dan penemuan obat telah berkembang dalam beberapa tahun terakhir, maka Penelitian lanjutan tentang kajian dinamika molekular ketiga senyawa depsidone perlu dilakukan.
2. Penelitian lanjutan terkait optimasi kultivasi jamur dan teknik isolasi untuk memperoleh ketiga senyawa golongan depsidone dari jamur *Aspergillus unguis* dalam jumlah besar perlu dilakukan.
3. Sesuai alur pengembangan obat baru, tahap penelitian praklinis secara *in vivo* dari senyawa tersebut sebagai anti MRSA juga perlu direncanakan.

DAFTAR PUSTAKA

- Absalon, M. J., and Smith, F. O. (2009). Treatment strategies for pediatric acute myeloid leukemia. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10, 57-79.
- Aldrich, T.J., E. Philippe, Rolshausen, C.M. Roper, J.M. Reader, M.J. Steinhaus (2015). Radicinin from *Cochliobolus* sp. inhibits *Xylella fastidiosa*, the causal agent of Pierce's Disease of grapevine. *Phytochemistry*, 116, 130-137. DOI:10.1016/j.phytochem.2015.03.015
- Al-Habib, A., Al-Saleh, E., Safer, A-H. and Afzal, M. (2010) 'Bactericidal effect of grape seed extract on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *The Journal of toxicological sciences*. The Japanese Society of Toxicology, 35(3), pp. 357–364. DOI: 10.2131/jts.35.357
- Al-Ruaily, M. A. and Khalil, O. M. (2011) 'Detection of (*mecA*) gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince a/Rhman Sidery hospital, al-Jouf, Saudi Arabia', *Journal of Medical Genetics and Genomics*. Academic Journals, 3(3), pp. 41–45. ISSN 2141-2278
- Alexander, J. A. N., Radeva, M., King, D. T., Chambers, H. F., Cherkasov, A., Chatterjee, S. S. and Strynadka, N. C. J. (2020) 'Structural analysis of avibactam-mediated activation of the bla and mec divergons in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, p. jbc-RA120. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013029
- Aligholi, M. Emameini, M., Jabalameli, F., Shahsavani, S., Dabiri, H. and Sedaght, H. (2008) 'Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini Hospital in Tehran', *Medical Principles and Practice*. Karger Publishers, 17(5), pp. 432–434. DOI: 10.1159/000141513
- Aly, A. H., Debbab, A., Edrada-Ebel, R. A., Müller, W. E. G., Kubbutat, M. H. G., Wray, V., Ebel R., & Proksch, P. (2010). Protein kinase inhibitors and other cytotoxic metabolites from the fungal endophyte *Stemphylium botryosum* isolated from *Chenopodium album*. *Mycosphere*, 1(2), 153-162.

Amagata, T., Doi, M., Ohta, T., Minoura, K., and Numata, A. (1998). Absolute stereostructures of novel cytotoxic metabolites, gymnastatins A–E, from a *Gymnascella* species separated from a *Halichondria sponge*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 3585–3600

Aminah, I., Putra, A. E. and Handayani, D. (2020) 'Antibacterial potential of fungi derived extracts of marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*', *AACL Bioflux* 13(2), pp. 1118–1125.

Arêde, P., Milheirico, C., de Lencastre, H. and Oliveira, D. C. (2012) 'The anti-repressor MecR2 promotes the proteolysis of the *mecA* repressor and enables optimal expression of β -lactam resistance in MRSA', *PLoS pathogens*. Public Library of Science, 8(7). DOI: 10.1371/journal.ppat.1002816

Arifan, F., Winarni, S., Wahyuningsih, W., Pudjihastuti, I. and Broto, W. RTD. (2019) 'Total Plate Count (TPC) Analysis of Processed Ginger on Tlogowungu Village', in *International Conference on Maritime and Archipelago (ICoMA 2018)*. Atlantis Press. DOI: 10.2991/icoma-18.2019.80

Artasasta, M. A., Taher, M., Djamaan, A., & Handayani, D. (2019). Cytotoxic and antibacterial activities of marine sponge-derived fungus *Aspergillus nomius* NC06. *Rasayan J. Chem*, 12(3), 1463-1469. DOI: 10.31788/RJC.2019.1235284

Artasasta, M. A., Yanwirasti, Y., Taher, M., Djamaan, A., Ariantari, N. P., Edrada-Ebel, R. A., & Handayani, D. (2021). Apoptotic activity of new oxisterigmatocystin derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus nomius* NC06. *Marine drugs*, 19(11), 631. DOI: 10.3390/md19110631

Aryee, A. and Edgeworth, J. D. (2016) 'Carriage, clinical microbiology and transmission of *Staphylococcus aureus*', in *Staphylococcus aureus. Springer*, pp. 1–19. DOI: 10.1007/82_2016_5

Avila, C., Taboada, S., and Núñez - Pons, L. (2008). Antarctic marine chemical ecology: what is next? *Marine Ecology* 29, 1-71.

Bagul, U. S. and Sivakumar, S. M. (2016) 'Antibiotic susceptibility testing: A review on current practices', *Int J Pharm*, 6(3), pp. 11–17. ISSN 2249-1848

Bai, Z.-Q., Lin, X., Wang, Y., Wang, J., Zhou, X., Yang, B., Liu, J., Yang, X., Wang, Y., and Liu, Y. (2014). New phenyl derivatives from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* AIL8 derived of mangrove plant *Acanthus ilicifolius*. *Fitoterapia* 95, 194-202.

Bal, A. M., David, M. Z., Garau, J., Gottlieb, T., Mazzei, T., Scaglione, F., Tattevin, P., and Gould, I. M. (2017) 'Future trends in the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection: an in-depth review of newer antibiotics active against an enduring pathogen', *Journal of global antimicrobial resistance*. Elsevier, 10, pp. 295–303. DOI: 10.1016/j.jgar.2017.05.019

Balagurunathan, R., and Radhakrishnan, M. (2007). Exploiting the less explored Microbial Endophytes. *Adv Biotechnol* 6, 20-3.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S. K. (2016) 'Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review', *Journal of pharmaceutical analysis*. Elsevier, 6(2), pp. 71–79. DOI: 10.1016/j.jpha.2015.11.005

Bao, J., Sun, Y.-L., Zhang, X.-Y., Han, Z., Gao, H.-C., He, F., Qian, P.-Y., and Qi, S.-H. (2013). Antifouling and antibacterial polyketides from marine gorgonian coral-associated fungus *Penicillium* sp. SCSGAF 0023. *Journal of Antibiotics* 66, 219-223.

Bauer AW, Perry DM, Kirby WMM. (1959) Single-disk antibioticsensitivity testing of Staphylococci: an analysis of technique and results. *Arch Intern Med*; 104(2):208–16.

Benyhe, S. (1994). Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. *Life Sciences* 55, 969-979.

Berdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics* 58, 1-26.

Bergmann, W., and Stempien Jr, M. F. (1957). Contributions to the Study of Marine Products. XLIII. The Nucleosides of Sponges. V. The Synthesis of Spongosine1. *The Journal of Organic Chemistry* 22, 1575-1577.

Bergquist, P. R., Lavis, A. and Cambie, R. C. (1986) 'Sterol composition and classification of the Porifera', *Biochemical systematics and ecology*. Elsevier, 14(1), pp. 105–112. DOI: 10.1016/0305-1978(86)90094-3

Besitulo, A. D., Sarma, V. V., and Hyde, K. D. (2002). Mangrove fungi from Siargao Island, Philippines. *Fungi in Marine Environments*, 7, 267-283.

Bhadury, P., Mohammad, B. T., and Wright, P. C. (2006). The current status of natural products from marine fungi and their potential as anti-infective agents. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 33, 325-337.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., and Prinsep, M. R. (2005). Marine natural products. *Natural Product Reports* 22, 15-61.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Hu, W.-P., Munro, M. H., Northcote, P. T., and Prinsep, M. R. (2009). Marine natural products. *Natural Product Reports* 26, 170-244.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M., and Prinsep, M. R. (2013). Marine natural products. *Natural Product Reports* 30, 237-323.

Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H., and Prinsep, M. R. (2014). Marine natural products. *Natural Product Reports* 31, 160-258.

Biantoro, I. (2008) 'Metichillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *Universitas Gajah Mada Yogyakarta*.

Bouley, R. et al. (2016) 'Structure–activity relationship for the 4 (3 H)-Quinazolinone antibacterials', *Journal of medicinal chemistry*. ACS Publications, 59(10), pp. 5011–5021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00372

Borel, J. F., Feurer, C., Magnee, C., and Stähelin, H. (1977). Effects of the new antilymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology* 32, 1017-1025.

Brandt, C., Makarewicz, O., Fisher, T., Stein, C., Pfeifer, Y., Werner, G., and Pletz, M. W. (2014) 'The bigger picture: the history of antibiotics and antimicrobial resistance displayed by scientometric data', *International*

journal of antimicrobial agents. Elsevier, 44(5), pp. 424–430. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.08.001

Brauers, G., Edrada, R. A., Ebel, R., Proksch, P., Wray, V., Berg, A., Grafe, U., Schachtele, C., Totzke, F., Finkezeller, G., Marme, D., Kraus, J., Munchbach, M., Michel, M., Bringmann, G. and Schaumann, K. (2000) 'Anthraquinones and betaenone derivatives from the sponge-associated fungus *Microsphaeropsis* species: novel inhibitors of protein kinases', *Journal of natural products*. ACS Publications, 63(6), pp. 739–745. DOI: 10.1021/np9905259

Breland, A. E. (2008) *A Supervised Strain Classifier*. University of Nevada, Reno.

Bringmann, G., Gulder, T. A., Lang, G., Schmitt, S., Stöhr, R., Wiese, J., Nagel, K., and Imhoff, J. F. (2007). Large-scale biotechnological production of the antileukemic marine natural product sorbicillactone A. *Marine Drugs* 5, 23-30.

Brooijmans, R. J. W., Pastink, M. I. and Siezen, R. J. (2009) 'Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew', *Microbial biotechnology*. Wiley-Blackwell, 2(6), p. 587. DOI: 10.1111/j.1751-7915.2009.00151.x

Bugni, T. S., and Ireland, C. M. (2004). Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports* 21, 143-163.

Bult, C. J. (1998) 'Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 282(5389), pp. 635–636.

Carter, G. T. (2011). Natural products and Pharma 2011: Strategic changes spur new opportunities. *Natural Product Reports* 28, 1783-1789.

Capra, J. A., Laskowski, R. A., Thornton, J. M., Singh, M. and Funkhouser, T. A. (2009) 'Predicting protein ligand binding sites by combining evolutionary sequence conservation and 3D structure', *PLoS Comput Biol*. Public Library of Science, 5(12), p. e1000585. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000585

Caralone, N. A. et al. (1987) 'Imipenem: morphological changes and lethal effects on *Pseudomonas aeruginosa*.', *Drugs under experimental and clinical research*, 13(10), pp. 623–629. PMID: 3123190

Ćetković, H. and Lukić-Bilela, L. (2003) 'HMGB2 protein from the marine sponge *Suberites domuncula*', *Food Technology and Biotechnology*. Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 41(4), pp. 361–365.

Chaeprasert, S., Piapukiew, J., Whalley, A. J., and Sihanonth, P. (2010). Endophytic fungi from mangrove plant species of Thailand: their antimicrobial and anticancer potentials. *Botanica Marina* 53, 555-564

Chelossi, E. Milanese, M., Milano, A., Pronzato, R. and Riccardi, G. (2004) 'Characterisation and antimicrobial activity of epibiotic bacteria from *Petrosia ficiformis* (Porifera, Demospongiae)', *Journal of experimental marine biology and ecology*. Elsevier, 309(1), pp. 21–33. DOI: 10.1016/j.jembe.2004.03.006

Chew, Y. L., Mahadi, A. M., Wong, K. M. and Goh, J. K. (2018) 'Anti-methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) compounds from *Bauhinia kockiana* Korth. And their mechanism of antibacterial activity', *BMC complementary and alternative medicine*. Springer, 18(1), p. 70. DOI: 10.1186/s12906-018-2137-5

Clinicalcalc.com., Cyclosporine, Drug Usage Statistics, United States, 2013 – 2020, <https://clinicalcalc.com/DrugStats/Drugs/Cyclosporine>

Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, C., Churcher, D., Harris, S. V., Gordon, K., Eiglmeier, S., Gas, C. E., Barry III, F., Tekaia, K., Badcock, D., Basham, D., Brown, T., Chillingworth, R., Connor, R., Davies, K., Devlin, T., Feltwell, S., Gentles, N., Hamlin, S., Holroyd, T., Hornsby, K., Jagels, A., Krogh, J., McLean, S., Moule, L., Murphy, K., Oliver, J., Osborne, M. A., Quail, M.-A., Rajandream, J., Rogers, S., Rutter, K., Seeger, J., Skelton, R., Squares, S., Squares, J. E., Sulston, K., Taylor, S., Whitehead and B. G. Barrell (1998) 'Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence', *Nature*. Nature Publishing Group, 396(6707), p. 190. DOI: 10.1038/24206

- Cooper, R. and Nicola, G. (2015) Natural Products Chemistry; Sources, Separations, and Structures, CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Clark, A. M. (1996). Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research* 13, 1133-1141.
- Cragg, G. M. (1998). Paclitaxel (Taxol®): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews* 18, 315-331.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., and Snader, K. M. (1997). Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products* 60, 52-60.
- Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2005a). International collaboration in drug discovery and development from natural sources. *Pure and Applied Chemistry* 77, 1923-1942.
- Cragg, G. M., and Newman, D. J. (2005b). Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 72-79.
- Cragg, G. M., Grothaus, P. G., and Newman, D. J. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Reviews* 109, 3012-3043.
- Craft, Kelly M. *et al.* (2019) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): antibiotic-resistance and the biofilm phenotype ', *MedChemComm*. Royal Society of Chemistry, 10(8), pp. 1231–1241. DOI: 10.1039/c9md00044e.
- Dallakyan, S. and Olson, A. J. (2015) 'Small-molecule library screening by docking with PyRx', in *Chemical biology*. Springer, pp. 243–250. DOI: 10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Das, K., Tiwari, R. K. S. and Shrivastava, D. K. (2010) 'Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agents: current methods and future trends', *Journal of medicinal plants research*. Academic Journals, 4(2), pp. 104–111. ISSN 1996-0875
- Datta, D. (2003) 'Protein-ligand interactions: Docking, design and protein conformational change'. California Institute of Technology.

Davis, W. W. and Stout, T. R. (1971) 'Disc plate method of microbiological antibiotic assay: I. Factors influencing variability and error', *Applied microbiology*. Am Soc Microbiol, 22(4), pp. 659–665. PubMed 5002143

Dean, F. M., Roberts, J. C. and Robertson, A. (1954) 'The Chemistry of Pungi. Part XII. Nidulin and Nornidulin (" Ustin ") : Chlorine-containing Metabolic Products of *Aspergillus nidulans*.', *J Chem Soc*, (1432), pp. 1432–1439. DOI: 10.1039/JR9540001432

DeLano, W. L. and Bromberg, S. (2004) 'PyMOL user's guide', *DeLano Scientific LLC*, 629.

Dembitsky, V. M. and Tolstikov, G. A. (2003) 'Halogenated Phenol Compounds in Lichens and Fungi', *Chemistry for Sustainable Development*, 11, pp. 557–565.

Deurenberg, R. H. and Stobberingh, E. E. (2009) 'The molecular evolution of hospital-and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Current molecular medicine*. Bentham Science Publishers, 9(2), pp. 100–115. DOI: 10.2174/156652409787581637

Dewi, A. S., Hadi, T. A., Fajarningsih, N. D., Blanchfield, J. T., Bernhardt, P. V. and Garson, M. J. (2014) 'Acanthocyclamine A from the Indonesian marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*', *Australian Journal of Chemistry*. CSIRO, 67(9), pp. 1205–1210. DOI: 10.1071/CH14107

Dias, D. A., Urban, S., and Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2, 303–336.

Dumontet, C., and Jordan, M. A. (2010). Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug discovery* 9, 790–803.

Edrada, R. A. Wray, V., Berg, A., Grafe, U., Sudarsono, Brauers, G. and Proksch, P. (2000) 'Novel spiciferone derivatives from the fungus *Drechslera hawaiiensis* isolated from the marine sponge *Callyspongia aerizusa*', *Zeitschrift für Naturforschung C*. De Gruyter, 55(3–4), pp. 218–221. DOI: 10.1515/znc-2000-3-413

El-Desoky, A. H., Kato, H., Eguchi, K., Kawabata, T., Fujiwara, Y., Losung, F., Mangindaan, R. E. P., de Voogd, N. J., Takeya, M., Yokosawa, H. and

- Tsukamoto, S. (2014) 'Acantholactam and pre-neo-kauluamine, manzamine-related alkaloids from the Indonesian marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*', *Journal of natural products*. ACS Publications, 77(6), pp. 1536–1540. DOI: 10.1021/np500290a
- Eltem, R., Askun, T., Sarigul, N., Taskin, E. O. and Efendiler, H. (2004) 'Colonial and morphological characteristics of some Aspergillus Fr.: Fr. species isolated from vineyards in Manisa and Izmir provinces (Turkey)', *Turkish Journal of Botany*. The Scientific and Technological Research Council of Turkey, 28(3), pp. 287–298.
- Espinel-Ingroff, A., Canton, E., Fothergill, A., Ghannoum, M., Johnson, E., Jones, R.N., Ostrosky-Zeichner, L., Schell, W., Gibbs, D. L., Wang, A. and Turnidge, J. (2011) 'Quality control guidelines for amphotericin B, Itraconazole, posaconazole, and voriconazole disk diffusion susceptibility tests with nonsupplemented Mueller-Hinton Agar (CLSI M51-A document) for nondermatophyte Filamentous Fungi', *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 49(7), pp. 2568–2571. W. Schell, D. L. DOI: 10.1128/JCM.00393-11
- Facciolà, A., Ceccarelli, M., Paolucci, I. A., d'Aleo, F., Cacopardo, B., Condorelli, F., Rullo, E. V., Lo Presti Costantino, M. R. and Pellicano, C. G. (2018) 'MRSA detection in South Italy: an epidemiological survey to evaluate the burden of this important public health issue', *Infect Dis Trop Med*, 4, p. e486.
- Fang, Y.-H., Hsueh, P. R., Hu, J. J., Lee, P. I., Chen, J. M., Lee, C. Y. and Huang, L. M. (2004) 'Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children in northern Taiwan.', *Journal of microbiology, immunology, and infection= Wei mian yu gan ran za zhi*, 37(1), pp. 29–34. PMID: 15060684
- Fang, W., Lin, X., Zhou, X., Wan, J., Lu, X., Yang, B., Ai, W., Lin, J., Zhang, T., and Tu, Z. (2014). Cytotoxic and antiviral nitrobenzoyl sesquiterpenoids from the marine-derived fungus *Aspergillus ochraceus* Jcma1F17. *Medicinal Chemistry Communications* 5, 701-705.
- Faulkner, D. J. (2000a). Highlights of marine natural products chemistry (1972–1999). *Natural Product Reports* 17, 1-6.

- Faulkner, D. J. (2000b). Marine pharmacology. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 135-145.
- Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., and Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization* 63, 965-981.
- Feher, M., and Schmidt, J. M. (2003). Property distributions: differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* 43, 218-227.
- Felsenstein, J. (1985) 'Phylogenies and the comparative method', *The American Naturalist*. University of Chicago Press, 125(1), pp. 1–15.
- Ferrer, E., Juan-García, A., Font, G., & Ruiz, M. J. (2009). Reactive oxygen species induced by beauvericin, patulin and zearalenone in CHO-K1 cells. *Toxicology in Vitro*, 23(8), 1504-1509. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.07.009
- Feßler, A. T., Li, J., Kadlec, K., Wang, Y. and Schwarz, S. (2018) 'Antimicrobial resistance properties of *Staphylococcus aureus*', in *Staphylococcus aureus*. Elsevier, pp. 57–85. DOI: 10.1016/B978-0-12-809671-0.00004-8
- Eguira, L. F.-B., Fotso, S., Ameur-Mehdi, R. B., Mellouli, L. and Laatsch, H. (2005) 'Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated Streptomyces sp. strain US80', *Research in Microbiology*. Elsevier, 156(3), pp. 341–347. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.10.006
- Firn, R. D., and Jones, C. G. (2000). The evolution of secondary metabolism—a unifying model. *Molecular Microbiology* 37, 989-994.
- Firsova, D., Mahajan, N., Solanki, H., Morrow, C., and Thomas, O. P. (2017). Current Status and Perspectives in Marine Biodiscovery. In *Bioprospecting*. Springer 16, 29-50.
- Flewelling, A. J., Currie, J., Gray, C. A., and Johnson, J. A. (2015). Endophytes from marine macroalgae: promising sources of novel natural products. *Current Science* (00113891) 109, 88-111.

Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2016) ‘Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite’, *Nature protocols*. Nature Publishing Group, 11(5), pp. 905–919. DOI: 10.1038/nprot.2016.051

Friesner, R. A. Banks, J. L. Murphy, R. B., Halgren, T. A., Klicic, J. J., Mainz, D. T., Repasky, M. P., Knoll, E. H., Shelley, M., Perry, J. K., Shaw, D. E., Francis, P. and Shenkin, P. S. (2004) ‘Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy’, *Journal of medicinal chemistry*. ACS Publications, 47(7), pp. 1739–1749. DOI: 10.1021/jm0306430

Funkhouser, T. (2007) ‘Lecture: Protein-ligand docking methods’, *Princeton University*.

Fu, J., Zhou, Y., Li, H. F., Ye, Y. H., & Guo, J. H. (2011). Antifungal metabolites from Phomopsis sp. By254, an endophytic fungus in *Gossypium hirsutum*. *Afr. J. Microbiol. Res*, 5(10), 1231-1236. DOI: 228474605

Furusato, A., Kato, H., Nehira, T., Eguchi, K., Kawabata, T., Fujiwara, Y., Losung, F., Mangindaan, R. E. P., de Voogd, N. J., Takeya, M., Yokosawa, H. and Tsukamoto, S. (2014) ‘Acanthomanzamines A–E with new manzamine frameworks from the marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*’, *Organic letters*. ACS Publications, 16(15), pp. 3888–3891. DOI: 10.1021/o15015569

Gamal-Eldeen, A. M., Abdel-Lateff, A., and Okino, T. (2009). Modulation of carcinogen metabolizing enzymes by chromanone A; a new chromone derivative from algalous marine fungus *Penicillium* sp. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 317-322

Gao, W., Jiang, L., Ge, L., Chen, M., Geng, C., Yang, G., & Liu, X. (2015). Sterigmatocystin-induced oxidative DNA damage in human liver-derived cell line through lysosomal damage. *Toxicology in Vitro*, 29(1), 1-7. DOI: 10.1016/j.tiv.2014.08.007

Gatadi, S. et al. (2019) ‘Synthesis and evaluation of new 4-oxoquinazolin-3 (4H)-yl) benzoic acid and benzamide derivatives as potent antibacterial agents effective against multidrug resistant *Staphylococcus aureus*’, *Bioorganic chemistry*. Elsevier, 83, pp. 569–579. DOI:

Gazave, E., Lapebie, P., Ereskovsky, A. V., Vacelet, J., Renard, E., Cardenas, P. and Borchiellini, C. (2012) 'No longer Demospongiae: Homoscleromorph sponges revisited by molecular phylogeny, Linnaean classification and the PhyloCode', *Hydrobiologia*. Springer Nature, 687(1), pp. 3–10. DOI: 10.1007/s10750-011-0842-x

Gerwick, W. H., and Fenner, A. M. (2013). Drug discovery from marine microbes. *Microbial Ecology* 65, 800-806.

Gilbert, P. (1984) 'The revival of micro-organisms sublethally injured by chemical inhibitors', in *Society for Applied Bacteriology symposium series*, pp. 175–197.

Gomes, N. G. M. (2014). Isolation, characterization, and biological activity evaluation of bioactive compounds from marine sponge-associated Fungi.

Grabley, S., and Sattler, I. (2003). Natural products for lead identification: nature is a valuable resource for providing tools. In *Modern methods of drug discovery*, Birkhäuser Basel 93, 87-107.

Grayson, M. L. (2006) 'The treatment triangle for staphylococcal infections'. Mass Medical Soc.

Gregory, P. D., Lewis, R. A., Curnock, S. P. and Dyke, K. G. H. (1997) 'Studies of the repressor (Blal) of β -lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*', *Molecular microbiology*. Wiley Online Library, 24(5), pp. 1025–1037. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1997.4051770.x

Hackbarth, C. J. and Chambers, H. F. (1993) 'blal and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 37(5), pp. 1144–1149. DOI: 10.1128/AAC.37.5.1144

Haefner, B. (2003). Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today* 8, 536-544

Hamano, K., Kinoshita-Okami, M., Hemmi, A., Sato, A., Hisamoto, M., Matsuda, K., Yoda, K., Haruyama, H., Hosoya, T. and Tanzawa, K. (1992)

'Folipastatin, a New Depsidone Compound from Aspergillus-Unguis as an Inhibitor of Phospholipase-A2 - Taxonomy, Fermentation, Isolation, Structure Determination and Biological Properties', *Journal of Antibiotics*, 45(8), pp. 1195–1201. DOI: 10.7164/antibiotics.45.1195

Handayani, D., Putri, R. A., Ismed, F., Hertiani, T., Ariantari, N. P. and Proksch, P. (2020a) 'Bioactive Metabolite From Marine Sponge Derived Fungus *Cochliobolus geniculatus* WR12', 13(1), pp. 417–422. DOI : 10.31788/RJC.2020.1315517

Handayani, D., Amalia, R., Aminah, I., Hertiani, T., Ariantari, N. P. and Proksch, P. (2020b) 'Bioactive Compounds From Marine Sponge Derived Fungus *Penicillium oxalicum* WR3', 13(3), pp. 1817-1823. DOI : 10.31788/RJC.2020.1335549

Handayani, D. Rendowati, A., Aminah, I., Ariantari, N. P. and Proksch, P. (2020) 'Bioactive Compounds From Marine Sponge Derived Fungus *A. unguis* WR8', 13(4), pp. 2633–2638. DOI: 10.31788/ RJC.2020.1345781

Handayani, D., Wahyuningsih, T., Rustini, M. A., Putra, A. E., & Proksch, P. Bioactive compound from the mangrove plant endophytic fungus *Diaporthe amygdali* SgKB4. DOI: 10.31788/RJC.2020.1315589

Handayani, D., Amilia, R., Aminah, I., Hertiani, T., Ariantari, N. P., & Proksch, P. Bioactive compounds from a marine sponge derived fungus *Penicillium oxalicum* WR3. DOI: 10.31788/ RJC.2020.1335549

Handayani, D., Dwinatrana, K., and Rustini, R. (2022). Antibacterial compound from marine sponge derived fungus *Aspergillus sydowii* DC08. *Rasayan J. Chem.*, 15(4), 2485-2492. DOI: 10.31788/RJC.2022.1546971

Handayani, D., Mulia, P., Andayani, R., Wahyuni, F. S., and Ariantari, N. P. (2021) 'Secondary Metabolite From Mangrove Endophytic Fungus *Fusarium proliferatum* AED3', Special Issue, pp. 150-155. DOI : 10.31788/RJC.2021.1456447

Handayani, D. and Aminah, I. (2017) 'Antibacterial and cytotoxic activities of ethyl acetate extract of symbiotic fungi from West Sumatra marine sponge *Acanthronylophora ingens*', *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(2). DOI: 10.7324/JAPS.2017.70234.

Hartman, B. J. and Tomasz, A. (1984) 'Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*.' *Journal of bacteriology*. Am Soc Microbiol, 158(2), pp. 513–516.

Harvey, A. L. (1993). Drugs from natural products: pharmaceuticals and agrochemicals, E. Horwood.

Hashizume, T. et al. (1984) 'Studies on the mechanism of action of imipenem (N-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in, *The Journal of antibiotics*. Japan Antibiotics Research Association, *E. coli*'37(4), pp. 394–400. DOI: 10.7164/antibiotics.37.394

Hassoun, A., Linden, P. K. and Friedman, B. (2017) 'Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations—a review of recent developments in MRSA management and treatment', *Critical Care*. BioMed Central, 21(1), p. 211. DOI: 10.1186/s13054-017-1801-3

Hackbarth, C. J. and Chambers, H. F. (1993) 'blaI and blaR1 regulate beta-lactamase and PBP 2a production in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.' *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 37(5), pp. 1144–1149. DOI: 10.1128/AAC.37.5.1144

Hill, R. A. (2013). Marine natural products. Annual Reports Section B (Organic Chemistry) 109, 146-166

Hirai, I. Okuno, M., Katsuma, R., Arita, N., Tachibana, M. and Yamamoto, Y. (2010) 'Characterisation of anti-*Staphylococcus aureus* activity of quercetin', *International journal of food science & technology*. Wiley Online Library, 45(6), pp. 1250–1254. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2010.02267.x

Hiramatsu, K., Asada, K., Suzuki, E., Okonogi, K. and Yokota, T. (1992) 'Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *FEBS letters*. Wiley Online Library, 298(2–3), pp. 133–136. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80039-J

Hong, W.-H., Chang, T., and Daly, R. E. (1986). Vidarabine. Analytical Profiles of Drug Substances 15, 647-672.

- Hooper, J. N. A. and Van Soest, R. W. M. (2002) 'Systema Porifera. A guide to the classification of sponges', in *Systema porifera*. Springer, pp. 1–7. DOI: 10.1007/978-1-4615-0747-5_1
- Hu, G.-P., Yuan, J., Sun, L., She, Z.-G., Wu, J.-H., Lan, X.-J., Zhu, X., Lin, Y.-C., and Chen, S.-P. (2011). Statistical research on marine natural products based on data obtained between 1985 and 2008. *Marine Drugs* 9, 514-525.
- Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S., and Yuan, J. (2015a). Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs* 13, 202-221.
- Hu, Y., Guo, R., Wei, J., Zhou, Y., Ji, W., Liu, J., Zhi, X. and Zhang, J. (2015b) 'Effects of PI3K inhibitor NVP-BKM120 on overcoming drug resistance and eliminating cancer stem cells in human breast cancer cells', *Cell death & disease*. Nature Publishing Group, 6(12), pp. e2020–e2020. DOI: 10.1038/cddis.2015.363
- Hussain, H., Kock, I., Al-Harrasi, A., Al-Rawahi, A., Abbas, G., Green, I. R., Shah, A., Badshah, A., Saleem, M., and Draeger, S. (2014). Antimicrobial chemical constituents from endophytic fungus *Phoma* sp. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 7, 699-702.
- Huyck, T. K., Gradishar, W., Manuguid, F., and Kirkpatrick, P. (2011). Eribulin mesylate. *Nature Reviews Drug Discovery* 10, 173-174.
- Hyde, K. (1988). Studies on the tropical marine fungi of Brunei. *Botanical Journal of the Linnean Society* 98, 135-151.
- Ibrahim, S. R. M., Mohamed, G. A., Zayed, M. F. and Sayed, H. M. (2015) 'Ingenines A and B, two new alkaloids from the Indonesian sponge *Acanthostrongylophora ingens*', *Drug research*. © Georg Thieme Verlag KG, 65(07), pp. 361–365. DOI: 10.1055/s-0034-1384577
- Ibrahim, S. R. M. and Mohamed, G. A. (2016) 'Ingenines C and D, new cytotoxic pyrimidine- β -carboline alkaloids from the Indonesian sponge *Acanthostrongylophora ingens*', *Phytochemistry Letters*. Elsevier, 18, pp. 168–171. DOI: 10.1016/j.phytol.2016.10.014

Igrejas, G., Correia, S., Silva, V., Hebraud, M., Canica, M., Torres, C., Gomes, C., Nogueira, F. and Poeta, P. (2018) 'Planning a One Health case study to evaluate methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and its economic burden in Portugal', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 9. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02964

IWG-SCC, I. W. G. on the C. of S. C. C. E. (2009) 'Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 53(12), pp. 4961–4967. DOI: 10.1128/AAC.00579-09

Jadhavar, P. S. et al. (2016) 'Synthesis, biological evaluation and structure–activity relationship of 2-styrylquinazolones as anti-tubercular agents', *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. Elsevier, 26(11), pp. 2663–2669. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.04.012

Jensen, P. R., and Fenical, W. (2000). Marine microorganisms and drug discovery: current status and future potential. In *Drugs from the Sea*. Karger Publishers, 6-29.

Jevons, M. P. (1961) "Celbenin"-resistant staphylococci', *British medical journal*. BMJ Publishing Group, 1(5219), p. 124. PMCID: PMC1952888

Ji, K., Chen, J., Li, M., Liu, Z., Xia, L., Wang, C., Zhan, Z. and Wu, X. (2009) 'Comments on serious anaphylaxis caused by nine Chinese herbal injections used to treat common colds and upper respiratory tract infections', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Elsevier, 55(2), pp. 134–138. DOI: 10.1016/j.yrtph.2009.06.008

Jia, B., Sohnlein, B., Mortelmans, K., Coggiola, M. and Oser, H. (2009) 'Distinguishing methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* using volatile headspace metabolites', *IEEE Sensors Journal*. IEEE, 10(1), pp. 71–75. DOI: 10.1109/JSEN.2009.2035671

Jimenez-Morales, D., Adamian, L., Shi, D. and Liang, J. (2014) 'Lysine carboxylation: unveiling a spontaneous post-translational modification', *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. International Union of Crystallography, 70(1), pp. 48–57. DOI: 10.1107/S139900471302364X

Jin, L., Quan, C., Hou, X., and Fan, S. (2016). Potential pharmacological resources: natural bioactive compounds from marine-derived fungi. *Marine Drugs* 14, 76.

Juhász-Kaszanyitzky, É., Janosi, S., Somogyi, P., Dan, A., van Bloois, L. V., van Duijkeren, E. and Wagenaar, J. A. (2007) 'MRSA transmission between cows and humans', *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 13(4), p. 630. DOI: 10.3201/eid1304.060833

Kahan, F. M. et al. (1983) 'Thienamycin: development of imipenem-cilastatin', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 12(suppl_D), pp. 1–35. DOI: 10.1093/jac/12.suppl_D.1

Kanoh, K., Kohno, S., Asari, T., Harada, T., Katada, J., Muramatsu, M., Kawashima, H., Sekiya, H., and Uno, I. (1997). (–)-Phenylahistin: A new mammalian cell cycle inhibitor produced by *Aspergillus ustus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 7, 2847–2852.

Kapetanovic, I. M. (2008) 'Computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico-chemico-biological approach', *Chemico-biological interactions*. Elsevier, 171(2), pp. 165–176. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.12.006

Kaur, S., Harjai, K. and Chhibber, S. (2012) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* phage plaque size enhancement using sublethal concentrations of antibiotics', *Applied and environmental microbiology*. Am Soc Microbiol, 78(23), pp. 8227–8233. DOI: 10.1128/AEM.02371-12

Kavlock, R. J., Ankley, G., Blancato, J., Breen, M., Conolly, R., Dix, D., Houck, K., Hubal, E., Judson, R., Rabinowitz, J., Richard, A., Setzer, W., Shah, I., Villeneuve, D. and Weber, E. (2008) 'Computational toxicology—a state of the science mini review', *Toxicological sciences*. Oxford University Press, 103(1), pp. 14–27. DOI: 10.1093/toxsci/kfm297

Kawahara, N., Nozawa, K., Nakajima, S., Kawai, K-J. and Yamazaki, M. (1988) 'Isolation and structures of novel fungal depsidones, emeguisins A, B, and C, from *Emericella unguis*', *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*. Royal Society of Chemistry, (9), pp. 2611–2614. DOI: 10.1039/P19880002611

- Kawahara, N., Nakajima, S., Kawai, K. and Udagawa, S. (1988) 'Studies on Fungal Products. XVIII. Isolation and Structure of a New Fungal Depsidone Related to Nidulin and a New Phthalide from *Emericella unguis*', *Chem. Pharm. Bull.*, 36(6), pp. 1970–1975. DOI: 10.1248/cpb.36.1970
- Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 74, 151-170.
- Kersten, R. D. and Dorrestein, P. C. (2009) 'Secondary metabolomics: natural products mass spectrometry goes global'. ACS Publications. DOI: 10.1021/cb900187p.
- Kijjoa, A., and Sawangwong, P. (2004). Drugs and cosmetics from the sea. *Marine Drugs* 2, 73-82.
- Kim, T., Yi, J., Hong, Ki H., Park, J., Kim, E . (2011) 'Distribution of virulence genes in spa types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from patients in intensive care units', *The Korean journal of laboratory medicine*, 31(1), pp. 30–36. DOI: 10.3343/kjlm.2011.31.1.30
- Kitani, H. et al. (1997) 'Synthesis and structural optimization of 7-(3, 3-disubstituted-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1, 4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylic acids as antibacterial agents', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. Elsevier, 7(5), pp. 515–520. DOI: 10.1016/S0960-894X(97)00054-1
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., Bajorath, J. (2004) 'Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications', *Nature reviews Drug discovery*. Nature Publishing Group, 3(11), pp. 935–949. DOI: 10.1038/nrd1549
- Kjer, J., Debbab, A., Aly A. H., Proksch, P. (2010) 'Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products', *Nature protocols*. Nature Publishing Group, 5(3), p. 479. DOI: 10.1038/nprot.2009.233
- Klaiklay, S., Rukachaisirikul,V., Aungphao, W., Phongpaichit, S., Sakayaro, J. (2016a) 'Depsidone and phthalide derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG199', *Tetrahedron Letters*. Elsevier, 57(39), pp. 4348–4351. Author links open overlay panel. DOI:

10.1016/j.tetlet.2016.08.040.

Klaiklay, S., Rukachaisirikul,V., Aungphao, W., Phongpaichit, S., Sakayaro, J. (2016b) 'Depsidone and phthalide derivatives from the soil-derived fungus *Aspergillus unguis* PSU-RSPG199', *Tetrahedron Letters*. Elsevier Ltd, 57(39), pp. 4348–4351. DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.08.040.

Kobayashi, M., Uehara, H., Matsunami, K., Aoki, S., and Kitagawa, I. (1993). Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale cecilia*. *Tetrahedron Letters* 34, 7925-7928.

Kobayashi, A., Hino, T., Yata, S., Itoh, T. J., Sato, H., & Kawazu, K. (1988). Unique spindle poisons, curvularin and its derivatives, isolated from *Penicillium* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52(12), 3119-3123. DOI:10.1271/bbb1961.52.3119

Kobayashi, J., and Tsuda, M. (2004). Bioactive products from Okinawan marine micro-and macroorganisms. *Phytochemistry Reviews* 3, 267-274.

Kohlmeyer, J., and Kohlmeyer, E. (1979). *Marine mycology : the higher fungi* Academic Press New York, USA.

Kohlmeyer, J. (1984). Tropical marine fungi. *Marine Ecology* 5, 329-378.

Konaté, K., Mavoungou, J. F., Lepengué, A. N., Aworet-Samseny, R. RR., Hilou, A., Souza, A., Dicko, M H., M'Batchi, B. (2012) 'Antibacterial activity against β - lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination', *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. DOI: 10.1186/1476-0711-11-18.

Kremsner, P. G., Winkler, S., Brandts, C., Neifer, S., Bienzel, U., and Graninger, W. (1994). Clindamycin in combination with chloroquine or quinine is an effective therapy for uncomplicated Plasmodium falciparum malaria in children from Gabon. *Journal of Infectious Diseases* 169, 467-470.

Kuiper-Goodman, T. and Scott, P. M. (1989) 'Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A.', *Biomedical and environmental sciences: BES*, 2(3), pp. 179–248. DOI: 10.1007/pl00007368

Kumar, S. G., Adithan, C., Harish, B. N., Sujatha, S., Roy, G., Malini, A. (2013) 'Antimicrobial resistance in India: A review', *Journal of natural science, biology, and medicine*. Wolters Kluwer--Medknow Publications, 4(2), p. 286. DOI: [10.4103/0976-9668.116970](https://doi.org/10.4103/0976-9668.116970)

Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016) 'MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets', *Molecular biology and evolution*. Society for Molecular Biology and Evolution, 33(7), pp. 1870–1874. DOI: [10.1093/molbev/msw054](https://doi.org/10.1093/molbev/msw054)

Kuntaman, K., Hadi, U., Setiawan, F., Koendori, E. B., Rusli, M., Santosaningsih, D., Severin, J., Verbrugh, H. A. (2016) 'Prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* from nose and throat of patients on admission to medical wards of DR Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia', *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. Central Coordinating Board, SEAMEO-TROPMED Project, 47(1), p. 66. PMID: 27086426

Kusari, S., Zühlke, S., and Spiteller, M. (2009). An endophytic fungus from *Camptotheca acuminata* that produces camptothecin and analogues. *Journal of Natural Products* 72, 2-7.

Lebar, M. D., Heimbegner, J. L., and Baker, B. J. (2007). Cold-water marine natural products. *Natural Product Reports* 24, 774-797.

Lee, A. S., Lencastre, H. D., Garau, J., Kluytmans, J., Malhotra-Kumar, S., Peschel, A., Harbarth, S. (2018) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*', *Nature reviews Disease primers*. Nature Publishing Group, 4(1), pp. 1–23. DOI: [10.1038/nrdp.2018.33](https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33)

Lee, Y.-K., Lee, J.-H. and Lee, H.-K. (2001) 'Microbial symbiosis in marine sponges', *Journal of Microbiology*. The Microbiological Society of Korea, 39(4), pp. 254–264. ISSN: 1225-8873

Li, J. W.-H., and Vedera, J. C. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161-165.

Li, S. H. E. N., Qian, L. U. O., Zhi-Ping, S. H. E. N., Ling-Yu, L. I., Zhang, X. J., Zhong-Qi, W. E. I., Yi FU., Yong-Chun SONG & Ren-Xiang, T. A. N. (2014). A new cytochalasin from endophytic *Phomopsis* sp. IFB-E060. *Chinese journal*

of natural medicines, 12(7), 512-516. DOI: 10.1016/S1875-5364(14)60080-7

Li, S., Shao, M. W., Lu, Y. H., Kong, L. C., Jiang, D. H., & Zhang, Y. L. (2014). Phytotoxic and antibacterial metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 isolated from the gut of long-horned grasshoppers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(36), 8997-9001. DOI:10.1021/jf502484n

Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997) 'Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings', *Advanced drug delivery reviews*. Elsevier, 23(1–3), pp. 3–25. DOI: [10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)

Lipinski, C. A. (2004) 'Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution', *Drug Discovery Today: Technologies*. Elsevier, 1(4), pp. 337–341. DOI: [10.1016/j.ddtec.2004.11.007](https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007)

Liu, J.-X., Zhang, J.-H., Li, H.-H., Lai, F.-J., Chen, K.-J., Chen, H., Luo, J., Guo, H.-C., Wang, Z.-H., and Lin, S.-Z. (2012). Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential. *Oncology reports* 28, 1991-1996.

Lowy, F. D. (1998) 'Staphylococcus aureus infections', *New England journal of medicine*. Mass Medical Soc, 339(8), pp. 520–532. DOI: [10.1056/NEJM199808203390806](https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390806)

Luscombe, N. M., Greenbaum, D. and Gerstein, M. (2001) 'What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field', *Methods of information in medicine*. Schattauer GmbH, 40(04), pp. 346–358. PMID: **11552348**

M.S. Elnaggar, S.S. Ebada, M. Ashour, L. Ebrahim, W.E. Müller, A. Mándi, T. Kurtán, A. Singab, W. Lin, Z. Liu and Proksch P. (2016). Xanthones and sesquiterpene derivatives from a marine-derived fungus *Scopulariopsis* sp. *Tetrahedron*, 72(19), 2411-2419. DOI:10.1016/j.tet.2016.03.073

Maldonado, L. A., Fenical, W., Jensen, P. R., Kauffman, C.A., Mincer, T. J., Ward, A.C., Bull, A. T., Goodfellow, M. (2005) 'Salinispora arenicola gen. nov.,

sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Microbiology Society, 55(5), pp. 1759–1766. DOI: [10.1099/ijs.0.63625-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.63625-0)

Maldonado, M., Cortadellas, N., Trillas, M. I., Rützler, K. (2005) 'Endosymbiotic yeast maternally transmitted in a marine sponge', *The Biological Bulletin*. Marine Biological Laboratory, 209(2), pp. 94–106. DOI: [10.2307/3593127](https://doi.org/10.2307/3593127)

Malmstrøm, J., Ryager, A., Anthoni, U., Nielsen, P.H. (2002) 'Unguisin C, a GABA-containing cyclic peptide from the fungus *Emericella unguis*', *Phytochemistry*. Elsevier, 60(8), pp. 869–872. DOI: [10.1016/s0031-9422\(02\)00150-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(02)00150-4)

Masalha, M., Borovok, I., Schreiber, R., Aharonowitz, Y., Cohen, G. (2001) 'Analysis of Transcription of the *Staphylococcus aureus* Aerobic Class Ib and Anaerobic Class III Ribonucleotide Reductase Genes in Response to Oxygen', *Journal of Bacteriology*. Am Soc Microbiol, 183(24), pp. 7260–7272. DOI: [10.1128/JB.183.24.7260-7272.2001](https://doi.org/10.1128/JB.183.24.7260-7272.2001)

Matsuda, K. et al. (1995) 'Autolysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is involved in synergism between imipenem and cefotiam', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 39(12), pp. 2631–2634. DOI: [10.1128/AAC.39.12.2631](https://doi.org/10.1128/AAC.39.12.2631)

Mehbub, M. F., Lei, J., Franco, C., and Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs* 12, 4539–4577.

Mayer, A. M., Glaser, K. B., Cuevas, C., Jacobs, R. S., Kem, W., Little, R. D., McIntosh, J. M., Newman, D. J., Potts, B. C., and Shuster, D. E. (2010). The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 255–265.

Mayer, A. M., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G., and Fusetani, N. (2011). Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of

- action. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology 153, 191-222.
- McDonnell, G. and Russell, A. D. (1999) 'Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance', *Clinical microbiology reviews*. Am Soc Microbiol, 12(1), pp. 147–179. PMCID: PMC88971
- Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson, W. M. (2000) 'Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance', *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 38(3), pp. 1032–1035. DOI: 10.1128/JCM.38.3.1032-1035.2000
- Memmi, G. et al. (2008) 'Staphylococcus aureus PBP4 is essential for β-lactam resistance in community-acquired methicillin-resistant strains', *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 52(11), pp. 3955–3966. DOI: 10.1128/AAC.00049-08
- Meng, X.-Y., Zhang, H-X., Mezei, M. and Cui, M. (2011) 'Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery', *Current computer-aided drug design*. Bentham Science Publishers, 7(2), pp. 146–157. DOI: 10.2174/157340911795677602
- Mishra, B. B., and Tiwari, V. K. (2011). Natural products: an evolving role in future drug discovery. European Journal of Medicinal Chemistry 46, 4769-4807.
- Molinari, G. (2009). Natural products in drug discovery: present status and perspectives. Pharmaceutical Biotechnology, 13-27.
- Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., and Saludes, J. P. (2009). Drug development from marine natural products. Nature Reviews Drug Discovery 8, 69-85
- Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B. and Theron, J. J. (1965) 'Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.', *Nature*. Nature Publishing Group, 205(4976), pp. 1112–1113. DOI: 10.1038/2051112a0

- Morris, G. M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M. F., Belew, R. K., Goodsell, D. S. and Olson, A. J. (2009) 'AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility', *Journal of computational chemistry*. Wiley Online Library, 30(16), pp. 2785–2791. DOI: 10.1002/jcc.21256
- Morshed, M. T., Vuong, D., Crombie, A., Lacey, A. E., Karuso, P., Lacey, E. and Piggott, A. M. (2018) 'Expanding antibiotic chemical space around the nidulin pharmacophore', *Organic & biomolecular chemistry*. Royal Society of Chemistry, 16(16), pp. 3038–3051. DOI: 10.1039/C8OB00545A
- Mukesh, B. and Rakesh, K. (2011) 'Molecular docking: a review', *Int J Res Ayurveda Pharm*, 2(6), pp. 1746–1751. ISSN 2229-3566
- Müller, W. E. G. (1982) 'Cell membranes in sponges', *International review of cytology*. Elsevier, 77, pp. 129–181. DOI: 10.1016/S0074-7696(08)62466-3
- Müller, W. E. G., Wiens, M., Batel, R., Steffen, R., Schroder, H. C., Borojevic, R. and Custodio, M. R. (1999) 'Establishment of a primary cell culture from a sponge: primmorphs from *Suberites domuncula*', *Marine Ecology Progress Series*, 178, pp. 205–219. DOI: 10.3354/meps178205
- Müller, W. E. G. (2006) 'The stem cell concept in sponges (Porifera): metazoan traits', in *Seminars in cell & developmental biology*. Elsevier, pp. 481–491. DOI: 10.1016/j.semcdbs.2006.05.006
- Murphy, J. T., Walshe, R. and Devocelle, M. (2008) 'A computational model of antibiotic-resistance mechanisms in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)', *Journal of theoretical biology*. Elsevier, 254(2), pp. 284–293. DOI: 10.1016/j.jtbi.2008.05.037
- Murtey, M. Das and Ramasamy, P. (2016) 'Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy –Life Sciences', in Janecek, M. and Kral, R. (eds) *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. London: Intechopen, p. 161. DOI: 10.5772/61720
- Murti, Y., and Agrawal, T. (2010). Marine derived pharmaceuticals-development of natural health products from marine biodiversity. International

Journal of ChemTech Research 2, 2198-2217.

Nastrucci, C., Cesario, A., and Russo, P. (2012). Anticancer drug discovery from the marine environment. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery 7, 218-232.

Newman, D. J., Cragg, G. M., and Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981– 2002. Journal of Natural Products 66, 1022-1037.

Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years ⊥. Journal of Natural Products 70, 461-477.

Newman, D. J., Cragg, G. M., and Battershill, C. N. (2009). Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year. Diving and Hyperbaric Medicine 39, 216-225.

Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. Journal of Natural Products 75, 311-335.

Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016). Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Product 79, 629-661.

Nicholson, B., Lloyd, G. K., Miller, B. R., Palladino, M. A., Kiso, Y., Hayashi, Y., and Neuteboom, S. T. (2006). NPI-2358 is a tubulin-depolymerizing agent: in-vitro evidence for activity as a tumor vascular-disrupting agent. Anti-Cancer Drugs 17, 25-31.

Nielsen, J., Nielsen, P. H. and Frisvad, J. C. (1999) 'Fungal depside, guisinol, from a marine derived strain of *Emericella unguis*', *Phytochemistry*. Elsevier, 50(2), pp. 263–265. DOI: 10.1016/S0031-9422(98)00517-2

Nijs, A., Cartuyvels, R., Mewis, A., Peeters, V., Rummens, L. and Magerman, K. (2003) 'Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory', *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 41(8), pp. 3627–3630. DOI: 10.1128/JCM.41.8.3627-3630.2003

Nong, X.-H., Wang, Y.-F., Zhang, X.-Y., Zhou, M.-P., Xu, X.-Y., and Qi, S.-H. (2014). Territrem and butyrolactone derivatives from a marine-derived fungus

Aspergillus terreus. Marine Drugs 12, 6113-6124.

Otero, L. H., Rojas-Altuve, A., Llarrull, L. I., Carrasco-Lopez, C., Kumarasiri, M., Lastochkin, E., Fishovitz, J., Dawley, M., Hesek, D., Lee, M., Johnson, J. W., Fisher., J. F., Chang, M., Mobashery, S. and Hermoso, J. A. (2013) 'How allosteric control of *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2a enables methicillin resistance and physiological function', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 110(42), pp. 16808–16813. DOI: 10.1073/pnas.1300118110

Pantosti, A., Sanchini, A. and Monaco, M. (2007) 'Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*'. Future Medicine. DOI: 10.2217/17460913.2.3.323

Patrick, G. (2001) 'Instant notes in Medicinal Chemistry', in *Instant notes in Medicinal Chemistry*. Oxford: BIOS Scientific.

Peng, J., Hu, J-F., Kazi, A. B., Li, Z., Avery, M., Peraud, O., Hill, R. T., Franzblau, S. G., Zhang, F., Schinazi, R. F., Wirtz, S. S., Tharnish, P., Kelly, M., Wahyuono, S. and Hamann, M. T. (2003) 'Manadomanzamines A and B: a novel alkaloid ring system with potent activity against mycobacteria and HIV-1', *Journal of the American Chemical Society*. ACS Publications, 125(44), pp. 13382–13386. DOI: 10.1021/ja030087z

Pendse, G. S. (1974). A note on new chemical compounds isolated from a fungus hitherto unknown. Experientia, 30(1), 107-108. DOI:10.1007/BF01921629

Petcher, T. J., Weber, H. P., and Rüegger, A. (1976). Crystal and molecular structure of an iodo - derivative of the cyclic undecapeptide cyclosporin A. Helvetica Chimica Acta 59, 1480-1488.

Pettit, G. R., Fujii, Y., Hasler, J. A., and Schmidt, J. M. (1982). Isolation and characterization of palystatins AD. Journal of Natural Products 45, 272-276.

Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., Tuinman, A. A., Boettner, F. E., Kizu, H., Schmidt, J. M., Bacynskyj, L., Tomer, K. B., and Bontems, R. J. (1987). The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. Journal of the American

Chemical Society 109, 6883-6885.

Petzinger, E. and Ziegler, K. (2000) 'Ochratoxin A from a toxicological perspective.', *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 23(2), pp. 91–98. DOI: 10.1046/j.1365-2885.2000.00244.x

Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R. A. (2007) 'Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans', *Molecular nutrition & food research*. Wiley Online Library, 51(1), pp. 61–99. DOI: 10.1002/mnfr.200600137

Pires, D. E. V., Blundell, T. L. and Ascher, D. B. (2015) 'pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures', *Journal of medicinal chemistry*. ACS Publications, 58(9), pp. 4066–4072. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104

Pokkuluri, K. S., Inampudi, R. B. & Nedunuri, S. (2014). IN-MACAMCC: Integrated Multiple Attractor Cellular Automata with Modified Clonal Classifier for Human Protein Coding and Promoter Prediction. *Advances in Bioinformatics*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/261362>

Pomponi, S. A. (1999). The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology* 70, 5-13.

Potts, R. O. and Guy, R. H. (1992) 'Predicting skin permeability', *Pharmaceutical research*. Springer, 9(5), pp. 663–669. DOI: 10.1023/A:1015810312465

Proksch, P., Ebel, R., Edrada, R. A., Schupp, P., Lin, W. H., Sudarsono, Wray, V. and Steube, K. (2003) 'Detection of pharmacologically active natural products using ecology. Selected examples from Indopacific marine invertebrates and sponge-derived fungi', *Pure and applied chemistry*. De Gruyter, 75(2–3), pp. 343–352. DOI: 10.1351/pac200375020343

Puttaswamy, S. et al. (2018) 'A comprehensive review of the present and future antibiotic susceptibility Testing (AST) systems', *Arch Clin Microbiol*, 9. DOI: 10.4172/1989-8436.100083

Putra, M. Y., and Murniasih, T. (2016). Marine soft corals as source of lead compounds for anti-inflammatories. *Journal of Coastal Life Medicine* 4, 73-77.

Raistrick H, Rice FAH (1971) 2,3-Dihydro-3,6-dihydroxy-2-methyl-4-pyrone and curvularin from *Penicillium gilmanii*. Journal of the Chemical Society C: Organic 1971 (18), 3069-3070

Robeson, D. J., & Strobel, G. A. (1982). Deoxyradicinin, a novel phytotoxin from *Alternaria helianthi*. *Phytochemistry*, 21(7), 1821-1823. DOI:10.1016/S0031-9422(82)85081-4

Radjasa, O. K., Vaske, Y. M., Navarro, G., Vervoort, H. C., Tenney, K., Linington, R. G., and Crews, P. (2011). Highlights of marine invertebrate-derived biosynthetic products: Their biomedical potential and possible production by microbial associates. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 19, 6658-6674.

Rajasree, K. P., Mathew, G. M., Pandey, A. and Sukumaran, R. V. (2013) 'Highly glucose tolerant β -glucosidase from *Aspergillus unguis*: NII 08123 for enhanced hydrolysis of biomass', *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Oxford University Press, 40(9), pp. 967–975. DOI: 10.1007/s10295-013-1291-5

Ramos, F. A. Takaishi, Y., Shirotori, M., Kawaguchi, Y., Tsuchiya, K., Shibata, H., Higuti, T., Tadokoro, T. and Takeuchi, M. (2006) 'Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin', *Journal of agricultural and food chemistry*. ACS Publications, 54(10), pp. 3551–3557. DOI: 10.1021/jf060251c

Rani, N., Vijayakumar, S., Velan, L. P. T. and Arunachalam, A. (2014) 'Quercetin 3-O-rutinoside mediated inhibition of PBP2a: computational and experimental evidence to its anti-MRSA activity', *Molecular BioSystems*. Royal Society of Chemistry, 10(12), pp. 3229–3237. DOI: 10.1039/C4MB00319E

Rani, N., Vijayakumar, S., Lakshmi, P. T. V. and Arunachalam, A. (2016) 'Allosteric site-mediated active site inhibition of PBP2a using Quercetin 3-O-rutinoside and its combination', *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. Taylor & Francis, 34(8), pp. 1778–1796. DOI: 10.1080/07391102.2015.1092096

Rao, K. V., Kasanah, N., Wahyuono, S., Tekwani, B. L., Schinazi, R. F. and Hamann, 150 | Senyawa Antibakteri dari Jamur Laut *Aspergillus unguis*

- M. T. (2004) 'Three new manzamine alkaloids from a common Indonesian sponge and their activity against infectious and tropical parasitic diseases', *Journal of natural products*. ACS Publications, 67(8), pp. 1314–1318. DOI: 10.1021/np0400095
- Rateb, M. E., and Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. *Natural Product Reports* 28, 290-344.
- Rauck, R. L., Wallace, M. S., Burton, A. W., Kapural, L., and North, J. M. (2009). Intrathecal ziconotide for neuropathic pain: a review. *Pain Practice* 9, 327-337.
- Reddy, A. S., Pati, S. P., Kumar, P. P., Pradeep, H. N., and Sastry, G. N. (2007) 'Virtual screening in drug discovery-a computational perspective', *Current Protein and Peptide Science*. Bentham Science Publishers, 8(4), pp. 329–351. DOI: 10.2174/138920307781369427
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. (2009) 'Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices', *Clinical infectious diseases*. The University of Chicago Press, 49(11), pp. 1749–1755. DOI: 10.1086/647952
- Rowinsky, E. K., Onetto, N., Canetta, R. M., and Arbuck, S. G. (1992). Taxol: the first of the taxanes, an important new class of antitumor agents. *Seminars in Oncology* 19, 646-662.
- Rozas, E. E. et al. (2011) 'Isolation and cultivation of fungal strains from in vitro cell cultures of two marine sponges (Porifera: Halichondrida and Haplosclerida)', *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(4), pp. 1560–1568. DOI: 10.1590/S1517-83822011000400043.
- Rozas, E. E., Mendes, M. A., Nascimento, C. A. O., Espinosa, D. C. R., Oliveira, R., Oliveira, G. and Custodio, M. R. (2017) 'Bioleaching of electronic waste using bacteria isolated from the marine sponge *Hymeniacidon heliophila* (Porifera)', *Journal of hazardous materials*. Elsevier, 329, pp. 120–130. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2017.01.037
- Saitoh, K., Togashi, K., Arie, T. and Teraoka, T. (2006) 'A simple method for a mini-preparation of fungal DNA', *Journal of General Plant Pathology*. Springer, 72(6), pp. 348–350. DOI: 10.1007/s10327-006-0300-1

Saitou, N. and Nei, M. (1987) 'The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees.', *Molecular biology and evolution*, 4(4), pp. 406–425. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454

Sallam, L. A., El-Refai, A.-M. H., Hamdi, A.-H. A., El-Minofi, H. A., and Abd-Elsalam, I. S. (2005). Studies on the application of immobilization technique for the production of cyclosporin A by a local strain of *Aspergillus terreus*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 51, 143-149.

Salomon, C. E., Magarvey, N. A., and Sherman, D. H. (2004). Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Natural Product Reports* 21, 105-121.

Samoylenko, V., Khan, S. I., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Walker, L. A., Hufford, C. D. and Muhammad, I. (2009) 'Bioactive (+)-manzamine A and (+)-8-hydroxymanzamine A tertiary bases and salts from *Acanthostrongylophora ingens* and their preparations', *Natural product communications*. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA, 4(2), p. DOI: 10.1177/1934578X0900400204

Samoylenko, V., Ashfaq, M. K., Jacob, M. R., Tekwani, B. L., Khan, S. I., Manly, S. P., Joshi, V. C., Walker, L. A. and Muhammad, I. (2009) 'Indolizidine, antiinfective and antiparasitic compounds from *Prosopis glandulosa* var. *glandulosa*', *Journal of natural products*. ACS Publications, 72(1), pp. 92–98. DOI: 10.1021/np800653z

Sanches, I. S., Mato, R., de Lancastre, H., Tomasz, A., Collaborators, C/N. and Collaborators, I. (2000) 'Patterns of multidrug resistance among methicillin-resistant hospital isolates of coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci collected in the international multicenter study RESIST in 1997 and 1998', *Microbial Drug Resistance*, 6(3), pp. 199–211. DOI: 10.1089/mdr.2000.6.199

Sandeep, G., Nagasree, K. P., Hanisha, M. and Kumar, M. M. K. (2011) 'AUDocker LE: A GUI for virtual screening with AUTODOCK Vina', *BMC research notes*. BioMed Central, 4(1), pp. 1–4. DOI: 10.1186/1756-0500-4-445

Santosaningsih, D., Santoso, S., Budayanti, N. S., Kuntaman, K., Lestari, E. S., Farida, H., Hapsari, R., Hadi, P., Winarto, W., Milheirico, C., Maquelin, K.,

- Willemse-Erix, D., van Belkum, A., Severin, J. A. and Verbrugh, H. A. (2014) 'Epidemiology of *Staphylococcus aureus* harboring the meca or Panton-Valentine leukocidin genes in hospitals in Java and Bali, Indonesia', *The American journal of tropical medicine and hygiene*. ASTMH, 90(4), pp. 728–734. DOI: 10.4269/ajtmh.13-0734
- Santosaningsih, D., Santoso, S., Verburgh, H. A. and Severin, J. A. (2017) 'Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carriage among patients at admission to the surgical ward in a resource-limited hospital in Indonesia', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. ASTMH, 97(5), pp. 1310–1312. DOI: 10.4269/ajtmh.16-0993
- Saravanan, G., Alagarsamy, V. and Prakash, C. R. (2013) 'Synthesis, analgesic, anti-inflammatory, and in vitro antimicrobial activities of some novel quinazolin-4 (3H)-one derivatives', *Medicinal Chemistry Research*. Springer, 22(1), pp. 340–350. DOI: 10.1007/s00044-012-0037-7
- Schlyer, S. and Horuk, R. (2006) 'I want a new drug: G-protein-coupled receptors in drug development', *Drug discovery today*. Elsevier, 11(11–12), pp. 481–493. DOI: 10.1016/j.drudis.2006.04.008
- Schumacher, M., Kelkel, M., Dicato, M., and Diederich, M. (2011). Gold from the sea: marine compounds as inhibitors of the hallmarks of cancer. *Biotechnology Advances* 29, 531–547.
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A., Arts, J. J. C. and Habibovic, P. (2018) 'In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. Springer, 37(2), pp. 187–208. DOI: 10.1007/s10096-017-3089-2
- Schwarz, S., Silley, P., Simjee, S., Woodford, N., van Duijkeren, E., Johnson, A. P. and Gaastra, W. (2010) 'Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals', *Journal of antimicrobial chemotherapy*. Oxford University Press, 65(4), pp. 601–604. DOI: 10.1093/jac/dkq037
- Sellick, H. E., Beresford, A. P. and Tarbit, M. H. (2002) 'The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery', *Drug Discovery Today*. Elsevier, 7(2), pp. 109–116. DOI: 0.1016/S1359-6446(01)02100-6

Severin, J. A., Lestari, E. S., Kuntaman, K., Melles, D. C., Pastink, M., Peeters, J. K., Snijders, S. V., Hadi, U., Duerink, D. O., van Belkum, A., Verbrugh, H. A. (2008) 'Unusually high prevalence of Panton-Valentine leukocidin genes among methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains carried in the Indonesian population', *Journal of clinical microbiology*. Am Soc Microbiol, 46(6), pp. 1989–1995. DOI: 10.1128/JCM.01173-07

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D. and Kamal, M. A. (2015) 'Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment', *Saudi Journal of Biological Sciences*. DOI: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002.

Shalaby, M.-A. W., Dokla, E. M. E., Serya, R. A. T (2020) 'Penicillin binding protein 2a: An overview and a medicinal chemistry perspective', *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier, p. 112312. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112312

Sharma, V. K., Hackbarth, C. J., Dickinson, T. M. and Archer, G. L. (1998) 'Interaction of native and mutant McI repressors with sequences that regulate *mecA*, the gene encoding penicillin binding protein 2a in methicillin-resistant staphylococci', *Journal of bacteriology*. Am Soc Microbiol, 180(8), pp. 2160–2166. DOI: 10.1128/JB.180.8.2160-2166.1998

Shearer, C. A., Descals, E., Kohlmeyer, B., Kohlmeyer, J., Marvanová, L., Padgett, D., Porter, D., Raja, H. A., Schmit, J. P., and Thorton, H. A. (2007). Fungal biodiversity in aquatic habitats. *Biodiversity and Conservation* 16, 49-67.

Sikkema, J., de Bont, J. A. and Poolman, B. (1994) 'Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes.', *Journal of biological Chemistry*. ASBMB, 269(11), pp. 8022–8028. DOI: 10.1016/S0021-9258(17)37154-5

Simon-Hettich, B., Rothfuss, A. and Steger-Hartmann, T. (2006) 'Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances', *Toxicology*. Elsevier, 224(1–2), pp. 156–162. DOI: 10.1016/j.tox.2006.04.032

Van Soest, R. W. M. Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, Dirk, E., de Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. and

- Hooper, J. N. A. (2012) 'Global diversity of sponges (Porifera)', *PLoS one*. Public Library of Science, 7(4), p. e35105. DOI: 10.1371/journal.pone.0035105
- Song, M. D., Wachi, M., Doi, M., Ishino, F. and Matsuhashi, M. (1987) 'Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion', *FEBS letters*. Wiley Online Library, 221(1), pp. 167–171. DOI: 10.1016/0014-5793(87)80373-3
- Sridhar, K. R. (2004). Mangrove fungi in India. *Current Science* 86, 1586-1587
- Sridhar, D., Fakhraei, S. and Getoor, L. (2016) 'A probabilistic approach for collective similarity-based drug–drug interaction prediction', *Bioinformatics*. Oxford University Press, 32(20), pp. 3175–3182. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw342
- Staats, P. S., Yearwood, T., Charapata, S. G., Presley, R. W., Wallace, M. S., ByasSmith, M., Fisher, R., Bryce, D. A., Mangieri, E. A., and Luther, R. R. (2004). Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *The Journal of the American Medical Association* 291, 63-70.
- Steindler, L., Huchon, D., Avni, A. and Ilan, M. (2005) '16S rRNA phylogeny of sponge-associated cyanobacteria', *Applied and Environmental Microbiology*. Am Soc Microbiol, 71(7), pp. 4127–4131. DOI: 10.1128/AEM.71.7.4127-4131.2005
- Strobel, G. A., Ford, E., Li, J., Sears, J., Sidhu, R. S., and Hess, W. (1999). Seimatoantlerium tepuiense gen. nov., a unique epiphytic fungus producing taxol from the *Venezuelan Guyana*. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 426-433.
- Strobel, G., Stierle, A., Stierle, D., and Hess, W. (1993). Taxomyces andreanae, a proposed new taxon for a bulbilliferous hyphomycete associated with Pacific yew (*Taxus brevifolia*). *Mycotaxon* 47, 71-80.
- Strobel, G., Yang, X., Sears, J., Kramer, R., Sidhu, R. S., and Hess, W. (1996). Taxol from Pestalotiopsis microspora, an endophytic fungus of *Taxus wallachiana*. *Microbiology* 142, 435-440.

Subramani, R., Kumar, R., Prasad, P. and Aalbersberg, W. (2013) 'Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of *Penicillium* sp.', *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. Elsevier, 3(4), pp. 291–296. DOI: 10.1016/S2221-1691(13)60065-9

Sudek, S., Lopanik, N. B., Waggoner, L. E., Hildebrand, M., Anderson, C., Liu, H., Patel, A., Sherman, D. H., and Haygood, M. G. (2007). Identification of the putative bryostatin polyketide synthase gene cluster from "Candidatus Endobugula sertula", the uncultivated microbial symbiont of the marine bryozoan Bugula neritina. *Journal of Natural Products* 70, 67-74.

Sundari, R. V., S; Yusoff, M; Jones, EBG (2010). Observations on tropical arenicolous marine fungi on driftwood from Malaysia and Singapore. *Botanica Marina* 53, 327–333

Sureram, S., Wiyakrutta, S., Ngamrojanavanich, N., Mahidol, C., Ruchirawat, S. and Kittakoop, P. (2012) 'Depsidones, aromatase inhibitors and radical scavenging agents from the marine-derived fungus *Aspergillus unguis* CRI282-03', *Planta Medica*. DOI: 10.1055/s-0031-1298228.

Sureram, S., Kesornpun, C., Mahidol, C., Ruchirawat, S. and Kittakoop, P. (2013) 'Directed biosynthesis through biohalogenation of secondary metabolites of the marine-derived fungus *Aspergillus unguis*', *RSC Adv.*, 3(6), pp. 1781–1788. DOI: 10.1039/C2RA23021F.

Suzuki, E. et al. (1993) 'Distribution of mec regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 37(6), pp. 1219–1226. DOI: 10.1128/AAC.37.6.1219

Tang, Y. et al. (1998) 'QSAR/QSTR of fluoroquinolones: an example of simultaneous analysis of multiple biological activities using neural network method', *European journal of medicinal chemistry*. Elsevier, 33(7–8), pp. 647–658. DOI: 10.1016/S0223-5234(98)80023-8

Tavakol, M., Riekerink, R. G. O., Sampimon, O. C., van Wamel, W. J. B., van Belkum, A. and Lam, T. JGM. (2012) 'Bovine-associated MRSA ST398 in

the Netherlands', *Acta Veterinaria Scandinavica*. BioMed Central, 54(1), pp. 1–4. DOI: 10.1186/1751-0147-54-28

Taylor, T. A. and Unakal, C. G. (2019) 'Staphylococcus aureus', in *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.

Tesch, W. et al. (1990) 'Evidence of a novel staphylococcal mec-encoded element (mecR) controlling expression of penicillin-binding protein 2', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 34(9), pp. 1703–1706. DOI: 10.1128/AAC.34.9.1703

Thakur, N. L. and Müller, W. E. G. (2004) 'Biotechnological potential of marine sponges', *Current science*. JSTOR, pp. 1506–1512.

Thakur, N. L., and Thakur, A. N. (2006). Marine Biotechnology: an overview. IndianJournal of Biotechnology 5, 263-268.

Thatoi, H., Behera, B. C., and Mishra, R. R. (2013). Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology* 4, 54-71.

Thomas, X. (2009). Chemotherapy of acute leukemia in adults. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 10, 221-237.

Thomas, T. R. A., Kavlekar, D. P. and LokaBharathi, P. A. (2010) 'Marine drugs from sponge-microbe association—A review', *Marine drugs*. Molecular Diversity Preservation International, 8(4), pp. 1417–1468. DOI: 10.3390/md8041417

Tao, Y., Zeng, X., Mou, C., Li, J., Cai, X., She, Z., Zhou S. & Lin, Y. (2008). 1H and 13C NMR assignments of three nitrogen containing compounds from the mangrove endophytic fungus (ZZF08). *Magnetic Resonance in Chemistry*, 46(5), 501-505. DOI: 10.1002/mrc.2194

Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Kaewpet, M., Phongpaichit, S., Hutadilok-Towatana, N., Preedanon, S., & Sakayaroj, J. (2011). Sesquiterpene and xanthone derivatives from the sea fan-derived fungus *Aspergillus sydowii* PSU-F154. *Journal of natural products*, 74(7), 1663-1667. DOI:10.1021/np200374j

Verweij, J. (2009). Soft Tissue Sarcoma Trials: One Size No Longer Fits All. *Journal of Clinical Oncology* 27, 3085–3087.

Uematsu, H., Yamashita, K., Kunisawa, S., Fushimi, K. and Imanaka, Y. (2016) ‘The economic burden of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-onset pneumonia inpatients’, *American journal of infection control*. Elsevier, 44(12), pp. 1628–1633. DOI: 10.1016/j.ajic.2016.05.008

Ultee, A., Bennik, M. H. J. and Moezelaar, R. (2002) ‘The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*’, *Applied and environmental microbiology*. Am Soc Microbiol, 68(4), pp. 1561–1568. DOI: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002

Uriz, M., Turon, X., Becerro, M. A. and Agell, G. (2003) ‘Siliceous spicules and skeleton frameworks in sponges: origin, diversity, ultrastructural patterns, and biological functions’, *Microscopy research and technique*. Wiley Online Library, 62(4), pp. 279–299. DOI: 10.1002/jemt.10395

Utsui, Y. and Yokota, T. (1985) ‘Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*’, *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Am Soc Microbiol, 28(3), pp. 397–403. DOI: 10.1128/AAC.28.3.397

Valgas, C., de Souza, S. M., Smania, E. F. A. and Smania Jr, A. (2007) ‘Screening methods to determine antibacterial activity of natural products’, *Brazilian journal of microbiology*. SciELO Brasil, 38(2), pp. 369–380. DOI: 10.1590/S1517-83822007000200034

Van Cleef, B., Broens, E. M., Voss, A., Huijsdens, X. W., Zuchner, L., Van Benthem, B. Kluytmans, J., Mulders, M. N. and Van De Giessen, A. W. (2010) ‘High prevalence of nasal MRSA carriage in slaughterhouse workers in contact with live pigs in The Netherlands’, *Epidemiology & Infection*. Cambridge University Press, 138(5), pp. 756–763. DOI: 10.1017/S0950268810000245

Van der Molen, K., Raja, H. A., El-Elimat, T. and Oberlies, N. H. M. (2013) ‘Evaluation of culture media for the production of secondary metabolites in a natural products screening program’, *Amb Express*.

Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B. and Theron, J. J. (1965) 'Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh.', *Nature*. Nature Publishing Group, 205(4976), pp. 1112–1113. DOI: 10.1038/2051112a0

Van Soest, R. W. M. Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, Dirk, E., de Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M. and Hooper, J. N. A. (2012) 'Global diversity of sponges (Porifera)', *PLoS one*. Public Library of Science, 7(4), p. e35105. DOI: 10.1371/journal.pone.0035105

Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaassen, C. and Wulf, M. (2005) 'Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming', *Emerging infectious diseases*. Centers for Disease Control and Prevention, 11(12), p. 1965. DOI: 10.3201/eid1112.050428

Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T. (1971). Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93, 2325-2327.

Wang, Jichun *et al.* (2019) 'Protein expression profiles in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) under effects of subminimal inhibitory concentrations of imipenem', *FEMS microbiology letters*. Oxford University Press, 366(15), p. fnz195. DOI: 10.1093/femsle/fnz195

Wang, Q., & Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules*, 17(3), 2367-2377. DOI: 10.3390/molecules17032367

Wu, S. N., Chen, H., Liu, Y. C., & Chiang, H. T. (2002). Block of L-type Ca²⁺ current by beauvericin, a toxic cyclopeptide, in the NG108-15 neuronal cell line. *Chemical research in toxicology*, 15(6), 854-860. DOI: 10.1021/tx020003k

Wiese, J., Ohlendorf, B., Blumel, M., Schmaljohann, R. and Imhoff, J. F. (2011) 'Phylogenetic identification of fungi isolated from the marine sponge *Tethya aurantium* and identification of their secondary metabolites',

Marine Drugs. Molecular Diversity Preservation International, 9(4), pp. 561–585. DOI: 10.3390/md9040561

Wilke, M. S., Hills, T. L., Zhang, H.-Z., Chambers, H. F and Strynadka, N. C. J. et al. 'The BlaR1 β -lactam sensor of *Staphylococcus aureus*', *Journal of Biological Chemistry*. ASBMB, 279(45), pp. 47278–47287. DOI: 10.1074/jbc.M407054200.

Witte, W. (1999) 'Antibiotic resistance in gram-positive bacteria: epidemiological aspects', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oxford University Press, 44(suppl_1), pp. 1–9. DOI: 10.1093/jac/44.suppl_1.1

World Health Organization (WHO). Antimicrobial Resistance 2020.

Workman, P., Draetta, G. F., Schellens, J. H. M. and Bernards R. (2017) 'How much longer will we put up with \$100,000 cancer drugs?', *Cell*. Elsevier, 168(4), pp. 579–583. DOI: 10.1016/j.cell.2017.01.034

Woźnicka, E., Kuźniar A, Nowak D, Nykiel E, Kopacz M, Gruszecka J. and Golec, K. (2013) 'Comparative study on the antibacterial activity of some flavonoids and their sulfonic derivatives.', *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(3), pp. 567–571. PMID: 23757948

Yauan, G., Wahlqvist, M., He, G., Yang, M., and Li, D. (2006). Natural products and anti-inflammatory activity. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 15, 143–152.

Yap, T. A., Carden, C. P., and Kaye, S. B. (2009). Beyond chemotherapy: targeted therapies in ovarian cancer. *Nature Reviews Cancer* 9, 167–181.

Yarden, O. (2014). Fungal association with sessile marine invertebrates. *Frontiers in Microbiology* 5, 228.

Yao, Q., Wang, J., Zhang, X., Nong, X., Xu, X., & Qi, S. (2014). Cytotoxic polyketides from the deep-sea-derived fungus *Engyodontium album* DFFSCS021. *Marine drugs*, 12(12), 5902–5915. DOI:10.3390/md12125902

Y. Tian, X. Qin, X. Lin, K. Kaliyaperumal, X. Zhou, J. Liu, Z. Ju, Z. Tu, and Y. Liu (2015). Sydoxanthone C and acremolin B produced by deep-sea-derived

- fungus *Aspergillus* sp. SCSIO Ind09F01. *The Journal of Antibiotics*, 68(11), 703-706. DOI:10.1038/ja.2015.55
- Zainuddin, N., Alias, S. A., Lee, C. W., Ebel, R., Othman, N. A., Mukhtar, M. R., and Awang, K. (2010). Antimicrobial activities of marine fungi from Malaysia. *Botanica Marina* 53, 507-513.
- Zayed, M. F. and Hassan, M. H. (2014) 'Synthesis and biological evaluation studies of novel quinazolinone derivatives as antibacterial and anti-inflammatory agents', *Saudi Pharmaceutical Journal*. Elsevier, 22(2), pp. 157–162. DOI: 10.1016/j.jsps.2013.03.004
- Zhao, D. et al. (2013) 'Synthesis of novel 4-thiazolidione derivatives as antibacterial agents against drug-resistant *Staphylococcus epidermidis*', *Medicinal Chemistry Research*. Springer, 22(8), pp. 3743–3750. DOI: 10.1007/s00044-012-0363-9
- Zhang, D., Yang, X., Kang, J. S., Choi, H. D. and Son, B. W. (2008) 'Chlorohydroaspyrones A and B, antibacterial aspyrone derivatives from the marine-derived fungus *Exophiala* sp.', *Journal of natural products*. ACS Publications, 71(8), pp. 1458–1460. DOI: 10.1021/np800107c
- Zhang, H. Z., Hackbarth, C. J., Chansky, K. M. and Chambers, H. F. (2001) 'A proteolytic transmembrane signaling pathway and resistance to β -lactams in staphylococci', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 291(5510), pp. 1962–1965. DOI: 10.1126/science.1055144
- Zhang, Y., Mu, J., Feng, Y., Wen, L. and Han, J. (2014) 'Short communication: Four chlorinated depsidones from a seaweed-derived strain of *Aspergillus unguis* and their new biological activities', *Natural Product Research*, 28(7), pp. 503–506. DOI: 10.1080/14786419.2013.879305.
- Zang, Y., Genta-Jouve, G., Sun, T. A., Li, X., Didier, B., Mann, S., Mouray, E., Larsen, A. K., Escargueil, A. E., and Nay, B. (2015). Unexpected talaroenamine derivatives and an undescribed polyester from the fungus *Talaromyces stipitatus* ATCC10500. *Phytochemistry* 119, 70-75.
- Zhang, P., Li, X., and Wang, B.-G. (2016). Secondary metabolites from the marine algal-derived endophytic fungi: chemical diversity and biological activity. *Planta Medica* 82, 832-842.

Zheng, L., Chen, H., Han, X., Lin, W. and Yan, X. (2005) 'Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Springer, 21(2), pp. 201–206. DOI: 10.1007/s11274-004-3318-6

Zhou, X., Hu, Y., Tian, Y., and Hu, X. (2009). Effect of N-trimethyl chitosan enhancing the dissolution properties of the lipophilic drug cyclosporin A. *Carbohydrate Polymers* 76, 285-290.

Zhou, X., Lin, X., Ma, W., Fang, W., Chen, Z., Yang, B., and Liu, Y. (2014). A new aromatic amine from fungus *Pestalotiopsis vaccinii*. *Phytochemistry Letters* 7, 35-37.

Zilla, M. K., Qadri, M., Pathania, A. S., Strobel, G. A., Nalli, Y., Kumar, S., Guru, S. K., Bhushan, S., Singh, S. J., Vishwakarma, R. A., Ul-Hassan, S. R. and Ali, A. (2013) 'Bioactive metabolites from an endophytic *Cryptosporiopsis* sp. inhabiting *Clidemia hirta*', *Phytochemistry*. Elsevier, 95, pp. 291-297. DOI:10.1016/j.phytochem.2013.06

GLOSARIUM

A

Absorbansi: Perbandingan intensitas sinar yang diserap dengan intensitas sinar datang

Antibakteri: Zat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan dapat membunuh bakteri penyebab infeksi.

Autoklaf: mesin yang digunakan untuk melakukan proses industri dan ilmiah yang membutuhkan suhu dan tekanan tinggi dalam kaitannya dengan tekanan dan/atau suhu sekitar. Autoklaf digunakan sebelum prosedur bedah untuk melakukan sterilisasi. Banyak autoklaf digunakan untuk mensterilkan peralatan dan perlengkapan dengan memasukkannya ke uap jenuh bertekanan pada 121 °C (250 °F) selama sekitar 30-60 menit pada tekanan 15 psi (103 kPa atau 1,02 atm) tergantung pada ukuran muatan dan isinya.

B

Betalaktam: Golongan antibiotik yang memiliki kesamaan komponen struktur berupa adanya cincin beta-laktam dan umumnya digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri.

Bilangan gelombang: *wavenumber*, satuan frekuensi, sering digunakan dalam spektroskopi atom, molekul, dan nuklir, sama dengan frekuensi sebenarnya dibagi dengan kecepatan gelombang dan dengan demikian sama dengan jumlah gelombang dalam satuan jarak. ·

Binding affinity: Kekuatan interaksi pengikatan antara biomolekul dengan ligan atau pasangan pengikatnya. Interaksi antarmolekul ini sering difasilitasi oleh cara non-kovalen seperti ikatan hidrogen, interaksi elektrostatik, hidrofobik dan gaya Van der Waals.

Bioautografi: Suatu metode pendekripsi untuk menemukan suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan cara melokalisir aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram.

Bioinformatika: Ilmu yang mempelajari penerapan teknik komputasional untuk mengelola dan menganalisis informasi biologis. Bidang ini mencakup penerapan metode-metode matematika, statistika, dan informatika untuk memecahkan masalah-masalah biologis, terutama dengan menggunakan sekuen DNA dan asam amino serta informasi yang berkaitan dengannya. Contoh topik utama bidang ini meliputi basis data untuk mengelola informasi biologis, penyejajaran sekuen (sequence alignment), prediksi struktur untuk meramalkan bentuk struktur protein maupun struktur sekunder RNA, analisis filogenetik, dan analisis ekspresi gen.

Biosintesis: Suatu proses yang dikatalisis oleh enzim yang terjadi dalam organisme hidup, dimana substrat diubah menjadi senyawa lain (produk) yang biasanya memiliki struktur lebih kompleks.

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*, algoritma dan program untuk membandingkan informasi sekuen biologis primer, seperti sekuen asam amino protein atau nukleotida DNA dan/atau sekuen RNA

C

Candida albicans: adalah ragi patogen oportunistik yang merupakan anggota umum dari flora usus manusia. Ia juga dapat bertahan hidup di luar tubuh manusia. Hal ini terdeteksi di saluran pencernaan dan mulut pada 40-60% orang dewasa yang sehat. Ini biasanya merupakan organisme komensal, tetapi dapat menjadi patogen pada individu dengan gangguan sistem imun dalam berbagai kondisi. Spesies ini adalah salah satu dari sedikit spesies genus Candida yang menyebabkan infeksi kandidiasis pada manusia, yang dihasilkan dari pertumbuhan jamur yang berlebihan.

D

Derivate: Turunan

DNA: Deoxyribonucleic acid, Asam deoksiribonukleat adalah molekul yang membawa informasi genetik untuk perkembangan dan fungsi suatu organisme. DNA terbuat dari dua untaian terkait yang saling berliku-liku menyerupai tangga bengkok - bentuk yang dikenal sebagai heliks ganda. Setiap untai memiliki tulang punggung yang terbuat dari gula bolak-balik (deoksiribosa) dan gugus fosfat.

Terikat pada setiap gula adalah salah satu dari empat basa: adenin (A), sitosin (C), guanin (G) atau timin (T). Kedua untai dihubungkan oleh ikatan kimia antara basa: ikatan adenin dengan timin, dan ikatan sitosin dengan guanin. Urutan basa di sepanjang tulang punggung DNA mengkodekan informasi biologis, seperti instruksi untuk membuat protein atau molekul RNA.

E

Endofit: Mikroorganisme yang hidup di dalam tumbuhan dan bersimbiosis dengan tumbuhan itu dengan menghasilkan metabolit sekunder yang membantu pertahanan tumbuhan tersebut.

Esterichia coli: adalah Bakteri Gram-negatif, anaerobik fakultatif, berbentuk batang, bakteri coliform dari genus Escherichia yang umumnya ditemukan di usus bawah organisme berdarah panas.

Eksitasi: Naiknya energi sebuah sistem sehingga lebih tinggi dari keadaan dasarnya

Ekstraksi: Proses pemisahan bahan dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai.

Eluen: Bagian pembawa dari fasa gerak, menggerakkan analit melalui kromatograf. Dalam kromatografi cair, eluen adalah cairan pelarut; sedangkan dalam kromatografi gas, eluennya adalah gas pembawa.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay, immunoassay berlabel yang dianggap sebagai standar emas immunoassay. Tes imunologi ini sangat sensitif dan digunakan untuk mendeteksi dan mengukur zat, termasuk antibodi, antigen, protein, glikoprotein, dan hormon. Deteksi produk ini dilakukan dengan mengkomplekskan antibodi dan antigen untuk menghasilkan hasil yang terukur. Antibodi adalah jenis protein yang diproduksi oleh sistem kekebalan individu. Jenis protein ini memiliki daerah spesifik yang mengikat antigen. Antigen adalah protein yang dapat berasal dari sumber asing dan, ketika terikat pada antibodi, menginduksi serangkaian peristiwa melalui sistem kekebalan tubuh. Interaksi ini digunakan dalam pengujian ELISA dan memungkinkan untuk mengidentifikasi antibodi dan antigen protein spesifik, dengan hanya sejumlah kecil sampel uji. Tes ELISA antara lain digunakan untuk mendiagnosis infeksi HIV, tes kehamilan, dan golongan darah.

Enzim: adalah protein yang bertindak sebagai katalis biologis dengan mempercepat reaksi kimia. Molekul di mana enzim dapat bertindak disebut substrat, dan enzim mengubah substrat menjadi molekul berbeda yang dikenal sebagai produk. Hampir semua proses metabolisme dalam sel membutuhkan katalisis enzim agar terjadi pada tingkat yang cukup cepat untuk menopang kehidupan. Jalur metabolisme bergantung pada enzim untuk mengkatalisis tahapan reaksi individual.

Etnobotani: kajian mengenai budaya, dan "botani" - kajian mengenai tumbuhan) adalah suatu bidang ilmu yang mempelajari hubungan antara manusia dan tumbuhan. Penelitian etnobotani diawali oleh para ahli botani yang memfokuskan tentang persepsi ekonomi dari suatu tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat lokal.

G

Gen: Materi genetik yang terdiri atas sepenggal DNA yang menentukan sifat individu.

H

HMBC: *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*, Hubungan dua dimensi proton dan karbon sampai 3 ikatan.

HMQC: *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*, Korelasi antara proton-karbon satu ikatan

HSQC: *Heteronuclear single-quantum correlation*, HSQC, sering digunakan dalam spektroskopi NMR molekul organik dan sangat penting dalam bidang protein NMR. Spektrum yang dihasilkan adalah dua dimensi (2D) dengan satu sumbu untuk proton (^1H) dan yang lainnya untuk heteronukleus (inti atom selain proton), yang biasanya ^{13}C atau ^{15}N . Spektrum berisi puncak untuk setiap proton unik yang melekat pada heteronukleus yang dipertimbangkan. HSQC 2D juga dapat digabungkan dengan eksperimen lain dalam eksperimen NMR berdimensi lebih tinggi, seperti NOESY-HSQC atau TOCSY-HSQC.

HPLC: *High performance liquid chromatography*, Kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC), sebelumnya disebut sebagai kromatografi cair tekanan tinggi, adalah

teknik dalam kimia analitik yang digunakan untuk memisahkan, mengidentifikasi, dan mengukur setiap komponen dalam campuran.

I

Isolasi: Proses pengambilan atau pemisahan senyawa bahan alam dengan menggunakan pelarut yang sesuai.

Isolasi bakteri: Suatu proses mengambil bakteri dari medium atau dari lingkungan asalnya lalu menumbuhkannya di medium buatan sehingga diperoleh biakan yang murni.

Infeksi nosocomial: jenis infeksi yang menyebar di rumah sakit dan fasilitas pelayanan kesehatan lainnya. Infeksi ini bisa disebabkan oleh virus, bakteri, dan parasit atau jamur yang ada di rumah sakit. Beberapa faktor yang dapat memicu seseorang terinfeksi di rumah sakit diantaranya, adalah rendahnya kekebalan tubuh, penggunaan teknologi dan prosedur medis yang meningkatkan risiko infeksi, dan penyebaran bakteri yang kebal obat/resisten di antara orang-orang di rumah sakit.

In vacuo: dalam keadaan vakum

In vitro: Eksperimen atau pengujian yang dilakukan dengan sel, jaringan atau komponen biologis lainnya yang telah dikeluarkan dari suatu makhluk hidup.

In vivo: pengujian dengan subjek hidup seperti hewan, tumbuhan atau sel utuh. Misalnya, uji klinis yang berfokus pada penilaian keamanan dan kemanjuran obat eksperimental pada manusia.

J

Jamur: Jamur (jamak: fungi) adalah anggota dari kelompok organisme eukariotik yang mencakup mikroorganisme seperti ragi dan jamur. Organisme ini diklasifikasikan sebagai kerajaan, terpisah dari kerajaan eukariotik lainnya, yang menurut satu klasifikasi tradisional termasuk Plantae, Animalia, Protozoa, dan Chromista. Ciri yang menempatkan jamur pada kingdom yang berbeda dari tumbuhan, bakteri, dan beberapa protista adalah kitin pada dinding selnya. Jamur, seperti hewan, adalah heterotrof; mereka memperoleh makanan

mereka dengan menyerap molekul terlarut, biasanya dengan mengeluarkan enzim pencernaan ke lingkungan mereka.

K

Konstanta Kopling (J): Kopling konstan mengacu pada kopling dari dua garis yang berdekatan di puncak NMR dari dua set inti hidrogen yang setara. Kita dapat menyatakan istilah ini sebagai J. Konstanta kopling ini mengukur efek ini secara numerik, dan satuan pengukuran untuk konstanta kopling adalah Hertz atau Hz. Ini adalah ukuran interaksi antara sepasang proton. Ada tiga jenis kopling yaitu kopling germinal, kopling vicinal, dan kopling jarak jauh.

Konidia: Spora yang dibentuk pada ujung hifa khusus yang disebut konidiofor

Kultivasi: Teknik meremajakan mikroba hasil seleksi (isolat) dalam media 1 kultur adalah 1 hasil biakan di luar habitat alami. Kondisi media kultivasi yaitu harus sesuai dengan habitat aslinya sehingga isolat yang dibiakkan dapat berkembang secara baik.

Kromatografi: suatu teknik pemisahan molekul berdasarkan perbedaan pola pergerakan antara fase gerak dan fase diam untuk memisahkan komponen (berupa molekul) yang berada pada larutan.

KLT: Kromatografi Lapis Tipis, metode yang digunakan untuk memisahkan komponen dalam sampel, dimana komponen tersebut didistribusikan diantara dua fase yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam bisa berupa cairan atau padatan yang dilapiskan pada gel atau padatan.

Kromosom: Sebuah molekul DNA panjang yang mengandung sebagian atau seluruh materi genetik suatu organisme.

L

LAF: laminar air flow, Aliran laminar didefinisikan sebagai aliran udara di mana seluruh badan udara dalam ruang yang ditentukan adalah seragam dalam kecepatan dan arah. Laminar Hood kadang-kadang juga dikenal sebagai Laminar Air Flow adalah bangku tertutup yang dirancang untuk mencegah kontaminasi seperti partikel biologis (SPM) atau perangkat sensitif partikel apa pun. Kabinet tertutup ini biasanya terbuat dari baja tahan karat tanpa celah atau sambungan

di mana spora dapat terkumpul. Udara ditarik melalui filter High Efficiency Particulate Air (HEPA) dan dihembuskan dalam aliran yang sangat halus atau aliran arus (ketika fluida mengalir dalam lapisan paralel tanpa gangguan antar lapisan)

Lead Structure: Senyawa model; Senyawa yang menjanjikan dikenal sebagai model. Senyawa ini sangat penting dalam pengembangan obat karena strukturnya memberikan fleksibilitas untuk memotong dan mengubah tanpa terlalu banyak konsekuensi. Setelah senyawa model dimodifikasi dan dioptimalkan, senyawa ini ibarat intan yang tidak dipoles, yang merupakan kandidat obat, siap untuk uji klinis.

Lisis: Peristiwa pecah atau rusaknya integritas membran sel dan menyebabkan keluarnya organel sel.

LC-MS: *Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy.* Kromatografi cair-spektrometri massa (LC-MS) adalah teknik kimia analitik yang menggabungkan kemampuan pemisahan fisik kromatografi cair (atau HPLC) dengan kemampuan analisis massa - spektrometri massa (MS). Pasangan Kromatografi - Sistem MS populer dalam analisis kimia karena kemampuan individu dari setiap teknik ditingkatkan secara sinergis. Sementara kromatografi cair memisahkan campuran dengan beberapa komponen, spektrometri massa memberikan informasi spektral yang dapat membantu mengidentifikasi (atau mengkonfirmasi dugaan identitas) setiap komponen yang dipisahkan. MS tidak hanya sensitif, tetapi menyediakan deteksi selektif, menghilangkan kebutuhan untuk pemisahan kromatografi lengkap. LC-MS juga sesuai untuk metabolomik karena cakupan yang baik dari berbagai bahan kimia. Teknik tandem ini dapat digunakan untuk menganalisis senyawa biokimia, organik, dan anorganik yang biasa ditemukan dalam sampel kompleks yang berasal dari lingkungan dan biologis. Oleh karena itu, LC-MS dapat diterapkan di berbagai sektor termasuk bioteknologi, pemantauan lingkungan, pengolahan makanan, dan industri farmasi, agrokimia, dan kosmetik. Sejak awal 2000-an, LC-MS (atau lebih khusus lagi LC-MS-MS) juga mulai digunakan dalam aplikasi klinis.

M

Makroskopik: Pengujian yang dilakukan dengan mata telanjang atau dengan bantuan kaca pembesar terhadap berbagai organ makhluk hidup. Identitas

makroskopis didasarkan pada bentuk, ukuran, warna, dan karakteristik permukaan

Mikroskopik: pengertian dari suatu sifat ukuran yang sangat-sangat kecil dan umumnya tidak bisa dilihat dengan mata biasa atau mata telanjang pada manusia, sehingga diperlukan alat bantu untuk melihat hal kecil itu yaitu mikroskop. dalam bahasa inggris (microscopic).

Maserasi: Metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan

Metabolit sekunder: Senyawa metabolit yang tidak esensial bagi pertumbuhan organisme dan ditemukan dalam bentuk yang unik atau berbeda-beda antara spesies yang satu dan lainnya

Metazoa: Organisme bersel bayak yang terbentuk melalui spesialisasi fungsi kerja sel-sel.

Molekuler Docking: Simulasi secara komputasi yang digunakan untuk memprediksi ikatan antara obat/ligan dan reseptor/protein dengan memasangkan suatu molekul kecil (ligan) pada sisi aktif dari reseptor.

Metabolit sekunder: hasil metabolisme yang dikeluarkan tanaman, metabolit sekunder yang diproduksi oleh berbagai organisme memang tidak memiliki peran yang cukup signifikan terhadap keberlangsungan hidup dari organisme penghasilnya.

MRSA: Metichillin resistant *Staphylococcus aureus*, bakteri jenis stafilocokus yang sudah kebal terhadap banyak jenis antibiotic golongan beta laktam, seperti amoxicillin dan penisilin.

MBC: *minimum bacteriocidal concentration*

MHA: *muller hinton agar*

MHB: *muller hinton broth*

MIC: *minimum inhibitor concentration*

Mikroba simbion: Mikroba simbiosis adalah mikroba (bakteri atau jamur) yang hidup bersimbiosis dengan organisme lain atau satu sama lain. Misalnya, rhizobia yang hidup di bintil akar legum memberikan aktivitas pengikatan

nitrogen bagi tanaman ini. Definisi simbiosis telah berkembang untuk mencakup hubungan yang berkelanjutan antara dua atau lebih organisme yang berbeda "selama sebagian besar kehidupan inang." Selain itu, hubungan ini sering bermanfaat untuk setidaknya satu dari organisme yang terlibat. Ada tiga jenis utama hubungan simbiosis: **komensalisme**, **mutualisme**, dan **parasitisme**. Komensalisme adalah ketika satu organisme diuntungkan dan yang lain tidak dirugikan atau diuntungkan. Mutualisme adalah ketika kedua organisme diuntungkan. Terakhir, parasitisme adalah ketika satu organisme diuntungkan sementara organisme lain dirugikan. Organisme juga dapat terlibat dalam beberapa hubungan simbiosis ini secara bersamaan.

N

NA: *Natrium agar*, Agar nutrisi adalah media pertumbuhan berbagai organisme. Biasanya berisi (massa/volume) 0,5% pepton - ini menyediakan nitrogen organik, 0,3% ekstrak daging sapi/ekstrak ragi - kandungan yang larut dalam air ini menyumbangkan vitamin, karbohidrat, nitrogen, dan garam, 1,5% agar - yang menghasilkan soliditas campuran, 0,5% natrium klorida - memberikan proporsi campuran mirip dengan yang ditemukan di sitoplasma sebagian besar organisme, air suling - berfungsi sebagai media transportasi untuk berbagai agar, pH disesuaikan ke netral (6,8) pada 25 °C (77 °F).

NCBI: *National Centre for Biotechnology Information*, Pusat Informasi Bioteknologi Nasional (NCBI) adalah bagian dari Perpustakaan Kedokteran Nasional Amerika Serikat (NLM), cabang dari Institut Kesehatan Nasional (NIH). NCBI menampung serangkaian database yang relevan dengan bioteknologi dan biomedis dan merupakan sumber penting untuk alat dan layanan bioinformatika. Basis data utama termasuk GenBank untuk urutan DNA dan PubMed, basis data bibliografi untuk literatur biomedis. Basis data lainnya termasuk basis data NCBI Epigenomics. Semua database ini tersedia secara online melalui mesin pencari Entrez.

Nukleotida: Senyawa organik yang terdiri dari sebuah nukleosida dan sebuah gugus fosfat, berperan sebagai monomer yang menyusun polimer berupa asam nukleat, yaitu asam deoksiribonukleat (DNA) dan asam ribonukleat (RNA); keduanya adalah biomolekul penting yang menyusun makhluk hidup di Bumi.

NMR: *Nuclear Magnetic Resonance*; Spektroskopi resonansi magnetik nuklir, adalah teknik karakterisasi tingkat lanjut. Metode ini digunakan untuk menentukan struktur molekul pada tingkat atom suatu sampel.

Neighbor Joining: Teknik pengelompokan lain yang digunakan untuk menghasilkan pohon filogenetik

P

Panjang gelombang (λ): wavelength, Dalam analisis secara spektrofotometri terdapat tiga daerah panjang gelombang elektromagnetik yang digunakan, yaitu daerah UV (200 – 380 nm), daerah visible (380 – 700 nm), daerah inframerah (700 – 3000 nm).

Pergeseran kimia (ppm): perubahan dalam frekuensi resonansi magnetik nuklir inti tergantung pada lingkungan elektronik. Istilah ini sebagai δ . Pergeseran kimia menggambarkan pergeseran posisi penyerapan NMR yang muncul karena melindungi atau melepaskan proton oleh elektron senyawa. Kita dapat menentukan pergeseran kimia dengan mengamati perbedaan antara posisi penyerapan proton sampel dan proton referensi dari senyawa standar. Pergeseran kimiawi memiliki nilai yang dapat kita ungkapkan dengan satuan ppm atau bagian per juta.

PBP: *Penicillin Binding Protein*

PB = phosphate buffer

PBS = phosphate buffer saline

PBP2a = penicilin binding protein 2a, protein yang dihasilkan MRSA, (dimediasi melalui gen *mecA*), yang dibawa pada *mec* kromosom kaset stafilocokus (SCCmec) yang setidaknya ada enam jenis yang dikenali, dan protein ini menyebabkan resistensi bakteri terhadap semua antibiotik beta-laktam.

PDB: Protein Data Bank, adalah database untuk data struktur tiga dimensi dari molekul biologis besar, seperti protein dan asam nukleat. Data, biasanya diperoleh dengan kristalografi sinar-X, spektroskopi NMR, mikroskop cryo-elektron, yang dikirimkan oleh ahli biologi dan biokimia dari seluruh dunia, dapat diakses secara bebas di Internet melalui situs web organisasi anggotanya

(PDBe, PDBj, RCSB, dan BMRB). PDB diawasi oleh sebuah organisasi bernama Worldwide Protein Data Bank, wwPDB.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, adalah metode revolusioner yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1980-an. PCR didasarkan pada penggunaan kemampuan DNA polimerase untuk mensintesis untai baru DNA yang melengkapi untai templat yang ditawarkan.

Peptidoglikan: Penyusun utama dinding sel bakteri yang bersifat kaku dan bertanggungjawab untuk menjaga integritas sel serta menentukan bentuknya.

Pohon filogenetik: Sebuah pohon filogenetik adalah matematika grafis representasi dari hubungan sejarah dan leluhur-keturunan kelompok, populasi, spesies, atau kategori taksonomi lainnya. Secara teoritis, semua pohon filogenetik dapat dikelompokkan dalam pohon kehidupan, yang merupakan pohon universal.

R

Resistensi: Kemampuan bakteri untuk menahan, melawan, dan menghentikan efek membinasakan dari obat antibiotik.

Rekrystalisasi: teknik pemurnian suatu zat padat dari pengotornya dengan cara mengkristalkan kembali zat tersebut setelah dilarutkan dalam pelarut yang sesuai

Rf: *Retardation Factor*, Jarak antara jalannya pelarut bersifat relative, sinonimnya faktor retensi.

RNA: ribonucleic acid

S

SCCmec: *Staphylococcal cassette chromosome mec*

SDA: *Saboroud dextrose agar*. Salah satu jenis media tumbuh agar yang mengandung pepton. Media ini digunakan untuk menumbuhkan dermatofita dan jenis jamur lainnya, dan juga dapat menumbuhkan bakteri berfilamen seperti Nocardia. Ini memiliki utilitas untuk penelitian dan perawatan klinis.

SEM: *Scanning electron microscopy.* Mikroskop pemindaian elektron (SEM) adalah jenis mikroskop elektron yang menghasilkan gambar sampel dengan memindai permukaan dengan berkas elektron terfokus. Elektron berinteraksi dengan atom dalam sampel, menghasilkan berbagai sinyal yang berisi informasi tentang topografi permukaan dan komposisi sampel.

SGP: *Step gradient polarity*, Gradien bertingkat (menggunakan serangkaian tingkatan isokratik yang semakin kuat dari waktu ke waktu).

Spektroskopi Infra Merah: *infrared (IR) spectroscopy*, Spektroskopi inframerah (IR) atau spektroskopi vibrasi adalah teknik analisis yang memanfaatkan transisi vibrasi molekul.

Spektroskopi Ultraviolet: *ultraviolet (UV) spectroscopy*, Spektroskopi ultraviolet-tampak (UV/Vis) didasarkan pada penyerapan radiasi elektromagnetik di wilayah UV/Vis, dengan rentang panjang gelombang 200-400 nm, yang disebut 'spektroskopi ultraviolet', dan 400-800 nm, yang disebut 'spektroskopi tampak'. Radiasi dalam panjang gelombang ini memiliki energi yang relatif tinggi dan cukup untuk menginduksi transisi elektronik dalam molekul atau atom. Spektroskopi UV berguna untuk menyelidiki struktur elektronik molekul tak jenuh dan untuk mengukur tingkat konjugasinya.

Spektroskopi massa: *mass spectrometry (MS)*, adalah teknik analisis yang digunakan untuk mengukur rasio massa terhadap muatan ion. Hasilnya disajikan sebagai spektrum massa, plot intensitas sebagai fungsi dari rasio massa terhadap muatan. Spektrometri massa digunakan di berbagai bidang dan diterapkan pada sampel murni serta campuran kompleks.

T

TPC: *total plate count*. Jumlah Lempeng Total adalah ukuran aktivitas biologis dalam sampel. Ini adalah hitungan semua bakteri (heterotrofik), jamur (jamur) dan ragi yang akan tumbuh dalam kondisi aerobik atau mikroaerofilik. Tes ini biasanya dilakukan pada suhu 35C untuk memperkirakan tingkat populasi yang mampu bertahan hidup di dalam atau pada manusia.

V

VLC: vacuum liquid chromatography

INDEKS

1

- 11 α , dehydroxyisoterreulactone A, 32, 33
¹³C NMR, 81, 85, 87, 91, 92, 96, 100, 103
18S rRNA, 80
¹H NMR, 81, 84, 87, 91, 92, 96, 100, 101, 103

2

- 2,4-cholorounguinol, 43
2-chlorounguinol, 43, 87, 88, 89, 96, 104, 107, 108, 109, 110, 111, 113, 114, 115, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 126, 128, 190

3

- 3-chlorounguinol, 43
3-ethyl-5,7-dihydroxy-3,6-dimethyl phthalide, 43

6

- 6 β -9 α -dihydroxy-14-pnitrobenzoylcinnamolide, 31

A

- Acanthostrongylophora ingens*, iv, 8, 9, 35, 36, 37, 71, 128, 131, 137, 140, 143, 157, 187, 190
Acanthus ilicifolius, 34, 131
Aeromonas hydrophila, 30
Agar overlay bioassay, 51
Agaricus blaze, 12
Alga laut, 29, 30
Alignment, 169

- Alumina, 57
Ampisilin, 126
Antibiotik, 7, 15, 190
Antibiotik β -laktam, 6, 7, 48, 114, 122, 126
Antrakuinon, 39
Aplysina aerophoba, 39
Arabinosil nukleosida, 20
Arisugacin K, 30, 31
Arteether, 14
Artemisia annua, 14
Artemisinin, 14
Asam lemak omega-3 etil ester, 22
Aspergillus flavipes, 34, 131
Aspergillus laokiashanensis, 42
Aspergillus mellinus, 42
Aspergillus ochraceus, 30, 138, 151, 164
Aspergillus sydowii, 41
Aspergillus terreus, 32, 153, 157
Aspergillus unguis, 2, 3, iii, iv, v, 9, 10, 42, 81, 128, 129, 146, 155, 161, 166, 187, 190
Aspergillusidones D-F, 43
Aspergillusidore C, 43
Aspergillusphenol A-B, 43
Aspergilluspherol A, 43
Asperlide, 43
Aspersidone, 43
Autodock, 65, 66, 68, 76, 77, 110
Autodock Vina, 68, 76, 110

B

- Bacillus subtilis*, 8, 51
Binding affinity, 77, 110, 111, 115, 121, 122, 128
Bioautografi langsung, 51
Bioinformatika, iv, 63, 169
Bionectin B, 41

Bionectria byssicola, 41
blaI, 7, 114, 141, 142
blaR1, 7, 114, 141, 142
BlaR1, 7, 49, 110, 114, 115, 117, 119, 120, 122, 126, 128, 164, 190
BLAST, 79, 169
blaZ, 7, 48, 49
Brentuximab vedotin (SGN-35), 22
Brentuximab vedotin 63 (Adcetris®), 21

C

Camptotheca acuminata, 34, 148
Catharanthus roseus., 14
Chlorine-releasing agents (CRAs), 109
Chlorohydroaspyrones A, 39, 165
Chondrus ocellatus, 30
Cinchona succirubra, 13
Citrinin, 41
Clidamia hirta, 41
Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 50, 104
Coelarthrumb sp, 30
Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), 52, 104
Conserved site, 80
Conus magus, 21
Cryptopsoriopsis sp., 41
Czapek-zox, 42

D

Depsidone, 104, 141, 145, 146
Destilasi, 53
Dicloxacillin, 46
Difusi agar, 51
Diploicin, 104
Drechslera hawaiiensis, 39, 137

E

Echinogorgia aurantiaca, 32
Eksosimbiosis ekstraseluler, 38

Ekstraksi, 53
ELISA, 68, 75, 105, 170
Emeguisin A-C, 43
Enzim β-laktamase, 6
Equisetin, 41
Eribulin mesylate (E7389), 22
Eribulin mesylate (Halaven®), 21
Eritromisin, 126
Escherichia coli, 9, 30, 51, 142
Exophiala sp., 39, 165

F

Flow cytofluorometric, 50
Flucloxacillin, 46
Fluiditas, 126
Folipastatin, 43
Fraksinasi, 54
Fusarium heterosporum, 41
Fusarium equiseti, 41
Fusarium graminearum, 30

G

Ganoderma lucidum, 11
Gentamisin, 126
Grateloupia turuturu, 30
Grid box, 76, 110
Guisinol, 43, 153
Gymnastatins A-C, 29

H

Halichondria japonica, 28
Halichondria okadai, 21
Halichondria panicea, 39
Hidrofilik, 126
HMBC, 63, 68, 82, 85, 86, 87, 88, 91, 93, 95, 97, 100, 102, 103, 171
HMQC, 68, 82, 171
Hortaea werneckii, 39

I

- Ikatan hidrogen, 114, 120, 121, 122, 126, 168
Imipenem, 110, 115, 117, 119, 121, 134
Inhibitor, 141
interaksi hidrofobik, 114, 120, 121, 122
interaksi van der waals, 121
Invertebrata, 8, 27
Ircinia fasciculata, 28
Isobutyrolactone II, 32, 33

J

- Jamur laut fakultatif, 26

K

- Kajian molekuler (in silico), 9
Karang lunak, 31
Kina, 13, 14
Kiselgur, 57
Klorokuin, 13, 14
KLT, 51, 52, 54, 55, 56, 68, 73, 81, 173
Konidia, 43, 173
Kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi, 51

L

- LC-MS, 68, 81, 82, 83, 89, 90, 174
LigPlot, 68, 111, 114, 120
Lisis, 7, 47, 127

M

- Makromolekul, 64, 66, 76, 77, 109, 110
Makroskopis, 42, 79, 174
Mangrove, iv, 33, 132, 160
Maserasi, 53, 175
mecA, 7, 48, 49, 114, 122, 130, 131, 142, 158, 159, 177
mecI, 7, 49, 114, 122

- mecR1*, 7, 49, 114, 122
MecR1, 7, 49, 110, 114, 115, 118, 119, 120, 122, 126, 128, 190
Media beras, 72, 78, 81
Media potato dextrose broth, 104
Meflokuin, 13, 14
Melophus sp., 41
Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), 6
Metil orselinat, 43
Metode Dilusi, 52
Metode kromatografi, 9, 73
Micrococcus luteus, 30
Micrograph, 124, 125
Microsphaeropsis sp, 39, 133
Mikroskopis, 42, 43, 79
Minimum Bacteriocidal Concentration (MBC), 9, 75
Minimum Inhibitor Concentration (MIC), 9
Molecular Docking, 76, 77, 109
Muller Hinton Broth (MHB), 75, 104

N

- Native ligand*, 108, 110, 111, 113, 114, 115, 117, 118, 120, 121, 122, 123
NCBI, 79, 176
Neighbor Joining, 80, 177
Nidulin, 98, 99, 101, 102, 103, 104, 106, 108, 111, 113, 115, 119, 120, 136, 145
Nornidulin, 43

O

- Oxacilin, 110, 115, 118

P

- Paclitaxel (Taxol®), 14, 16
Paecilomyces variotii, 30
Pairwise distance, 80
Papaver somniferum L., 13
Pengobatan Ayurveda, 11

Pengobatan Tradisional Cina (TCM), 11
Penicillin Binding Protein 2a (PBP2a), 111
Penicillium chrysogenum, 28
Penicillium echinulatum, 30
Penicillium montanense, 39
Penicillium notatum, 15, 41
Penicillium oxalicum, 32
Penisilin binding protein, PBP, 7
Penisilin G, 16
Peptidoglikan, 178
Perebusan, 54
Periconia sp., 34
Perkolasi, 53
permeabilitas, 126
Pestalotiopsis microspore, 34
Pestalotiopsis vaccinii, 34, 166
Pilobolusate, 43
Plate Count Agar (PCA), 105
Plinabulin, 29, 31
Protein Data Bank (PDB), 64, 68, 76, 110
Pseudomonas fluorescens, 41
Pseudopterogorgia elisabethae, 31
Pseudopterosin A-D, 33
PyMOL, 66, 68, 77, 111, 136
PyRx, 66, 68, 76, 110, 136

Q

Quinazolin, 112
Quinazolinon, 121

R

Resistensi, iii, 6, 7, 48, 111, 121, 122, 177
Resonansi magnetik inti, 9, 57, 85, 91, 100
RMSD, 111, 115

S

Salmonella typosa, 9
Scanning Electron Microscopy (SEM), 48
Seimatoantlerium tepuiense, 34, 160
Senyawa model (*lead structure*), 12

Siklosporin, 15, 16
Silika Gel, 57
Simbiosis intranuklear, 38
Simbiosis intraseluler, 38
Sitarabin (arabinosyl cytosine atau cytosine arabinoside, Ara-C), 22
Sitarabin (Ara-C), 22
Sokletasi, 53
Sorbicillactone A, 29, 134
Spektroskopi massa, 9
Spektroskopi ultraviolet, 9, 57, 81, 179
Spon, iv, v, 8, 27, 35, 36, 37, 39, 71, 78
Standar McFarland 0,5, 52
Staphylococcal Cassete Chromosome *mec* (SCCmec), 114
Staphylococcus aureus, 2, iv, 6, 7, 30, 34, 37, 39, 41, 46, 47, 48, 49, 51, 110, 130, 131, 133, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 152, 153, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 175, 187
Staphylococcus epidemidis, 8
Step gradient polarity (SGP), 81
Sterigmatocystis unguis, 42
Swelling, 126

T

Taxomyces andreanae, 34, 161
Taxus brevifolia Nutt., 14
Tethya aurantium, 41, 164
Tethya crypta, 20, 21, 22
Tolyphocladium inflatum, 15
Total Plate Count (TPC), 131
Trabectedin (ET-743), 22
Trabectedin (Yondelis®, ET-743), 20
Trichoderma harzianum, 28, 147
Trichoharzin, 29
Turunan betaenone, 39
Turunan spisiferon, 39

U

- Unguinol, 97, 106, 108, 111, 113, 115, 119
Unguisin, 43
UV, 56, 57, 61, 62, 68, 73, 74, 81, 82, 89,
177, 179

V

- Vankomisin, 126
Variable site, 80
Varioxepine A, 30, 31
Verticillium intertextum, 41
Vibrio anguillarum, 30
Vibrio harveyi, 30
Vibrio parahemolyticus, 30
Vidarabine (Ara-A), 22
Vidarabine (arabinofuranosyladenine atau
adenine arabinoside, Ara-A), 21
Vinblastine (VLB), 14, 16
Vincristine (VCR), 14, 16

X

- Xestodekalakton, 39

Z

- Ziconotide, 20, 22, 156, 160
Ziconotide (Prialt®), 21

PROFIL PENULIS

Prof. Dr. apt. Dian Handayani



Penulis lahir di Bandung, dan menyelesaikan semua jenjang pendidikan dasar dan menengah di Padang. Pendidikan tersebut ditempuhnya di Proyek Perintis Sekolah Pembangunan (PPSP) IKIP Padang. Kemudian di tahun 1985, penulis melanjutkan kuliah pada Program Studi Sarjana Farmasi di Universitas Andalas. Penulis melakukan tugas akhir jenjang S1 mengenai senyawa alkaloid dari tanaman *Phoebe rigida* dibawah bimbingan **Prof. apt. Dayar Arbain, PhD.** Tahun 1991, penulis menyelesaikan Program Profesi Apoteker dan kemudian lolos menjadi staf pengajar PS Sarjana Farmasi di almamaternya.

Pada tahun 1993, penulis berhasil mendapatkan beasiswa DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst e.V., Kennedyallee, 53175 Bonn) dari Pemerintah Jerman. Studi S3 dilakukan di *Institute for Pharmaceutical Biology, University of Wuerzburg* dibimbing **Prof. Dr. Peter Proksch** dengan kajian disertasi; Isolasi dan struktur elusidasi senyawa bioaktif dari invertebrate laut asal Sumatera Barat. Penelitian tersebut sukses diselesaikan selama 4 tahun dan membuat 2 artikel penelitian yang terbit di *Journal of Natural Products* pada tahun 1997. Sejak tahun 1999 hingga kini, penulis aktif sebagai dosen di Fakultas Farmasi Universitas Andalas (Unand). Penulis mengajarkan mata kuliah Kimia Organik, Biokimia, Kimia Bahan Alam, dan Kimia Bahan Alam kelautan. Selain mengajar, penulis terus aktif melakukan penelitian kajian senyawa bioaktif laut. Pada tahun 2015, penulis mendapat kesempatan menjadi promotor pada skim Pendidikan Magister menuju Doktor untuk Sarjana Unggul (PMDSU) Batch II dan III. Penulisan buku ini merupakan luaran tambahan dari hibah penelitian skim PMDSU batch II (2015–2019) yang telah dilaksanakan dengan sukses dan cemerlang oleh **Dr. Ibtisamatul Aminah, S.Si.** Hingga saat ini, penulis telah menghasilkan 54 artikel terindeks Scopus dari sejumlah proyek penelitian yang didanai Kemristekdikti dan Unand. Atas kinerja penelitian dan publikasi tersebut, penulis mendapat penghargaan Anugerah Universitas Andalas 2021 Sebagai Dosen Terproduktif Publikasi Artikel Ilmiah Sains dan Teknologi.



Dr. Ibtisamatul Aminah, S.Si

Penulis bernama lengkap Ibtisamatul Aminah dilahirkan di Ujung Pandang, 19 November 1992, ayah IR. H. Ahmad HS. dan ibu Hj. Madehura, SH. Pendidikan S-1 diselesaikan pada Jurusan Kimia Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam (FMIPA) Universitas Hasanuddin (2010-2015) dengan beasiswa Bidikmisi. Kemudian menyelesaikan pendidikan S-3 dengan beasiswa Program Menuju Doktoral Sarjana Unggulan (PMDSU) batch 2 di Program Studi Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas (2015-2021). Gelar S-3nya didapatkan tentunya atas berkat arahan dan bimbingan beliau **Prof. Dr. Apt. Dian Handayani** (promotor), **Dr. dr. Andani Eka Putra, M.Sc** (co-Promotor 1) dan **Prof. Dr. Apt. Dayar Arbain** (co-Promotor 2).

Penulis juga merupakan relawan analis laboratorium pemeriksaan covid di Laboratorium Pusat dan Riset Penyakit Infeksi (PDRPI) Fakultas Kedokteran Universitas Andalas (Maret 2020- Juni 2022). Beranjak dari pengalamannya, penulis juga sebagai Supervisor Laboratorium PCR di RSIA Budi Mulia Makassar (September 2021-sekarang). Berkat gelar doktor yang telah diraihnya, penulis mendapatkan piagam penghargaan “Nasaruddin Umar Award” sebagai Alumni Pondok Pesantren Al-Ikhlas Ujung-Bone yang pertama telah bergelar doktor yang diberikan langsung oleh Prof. Dr. Nasaruddin Umar, MA.

Buku penelitian ini merangkum bagian disertasinya dengan judul “Analisis *in vitro* dan *in silico* Senyawa antibakteri dari Jamur *Aspergillus unguis* IB151 terhadap Bakteri *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)”. Beberapa artikel hasil penelitiannya telah diterbitkan diantaranya;

1. “Antibacterial and cytotoxic activities of ethyl acetate extract of symbiotic fungi from West Sumatran marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*” pada *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2017)
2. “Screening of cytotoxic activities toward WiDr and Vero cell lines of ethyl acetate extract of fungi-derived from the marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*” pada *Journal of Applied Pharmaceutical Science* (2019)
3. Antibacterial potential of fungi derived extracts of marine sponge *Acanthostrongylophora ingens*” pada Jurnal AACL Bioflux (2020)



Prof. Dr. Apt. Dayar Arbain,

Lahir di Bukittinggi pada tanggal 27 November 1948. Gelar kesarjanaan Farmasinya diraih di Jurusan Farmasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (FIPIA) Universitas Andalas pada tahun 1976. Di tempat yang sama beliau meraih gelar Apotekernya pada tahun 1977. Beliau meraih gelar doktornya (PhD) di Department of Organic Chemistry University of Western Australia pada tahun 1986. Pada tahun 1993, beliau mendapatkan penghargaan *King Baudouin Award* dari International Foundation for Sciences (IFS) Stockholm, Swedia. Di tahun berikutnya (1994), beliau kembali mendapatkan penghargaan *Convocation Award* dari University of Western Australia, disamping penghargaan dari dalam negeri; Alumni Award (Unand, 2003), Tuah Sakato Award (Pemda Sumbar, 2009), Longlife Achievement Award (Unand, 2011).

Beliau merupakan Guru Besar Fakultas Farmasi Universitas Andalas (1995-2018), Ketua Lembaga Penelitian Universitas Andalas (1998-2006), Kepala UPT Sumber Daya Hayati pada perguruan tinggi tersebut hingga masa purnabaktinya (2008-2018). Selain itu juga beliau aktif sebagai anggota Dewan Pakar Ikatan Apoteker Indonesia (IAI) periode 2014-2018. Setelah masa purnabaktinya, beliau masih tetap aktif mengajar di Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta.

Beliau giat melakukan penelitian di bidang kimia bahan alam terutama terhadap tumbuhan yang ada di pulau Sumatra yang dijadikan obat tradisional oleh masyarakat. Setiap tahun semenjak 1987 sampai 2018 diundang sebagai invited speaker pada berbagai Seminar Ilmiah bergengsi di dalam dan luar negeri dan aktif mempublikasikan hasil penelitiannya di berbagai Jurnal Internasional seperti *Australian Journal of Chemistry*, *Journal of Chemical Society Perkin Trans I*, *Natural Product Communications*, *Phytochemistry*, *ACGC Chem Res.Commun*, *Indonesian Journal of Chemistry*, *Phytochemistry*, *Check List*, *Molecules*, *Journal of Ethnopharmacology*, *Frontiers in Pharmacology*, dll.



Dr. dr. Andani Eka Putra, M.Sc.,

Penulis lahir di Tarusan pada tanggal 15 Agustus 1972. Gelar kedokterannya diraih di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas pada tahun 1997. Jenjang Magister (S-2) diselesaikan di Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis peminatan imunologi dan molekuler penyakit tropis Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada pada tahun 2010. Jenjang doktoral (S-3) diselesaikan di Program Studi Biomedik pada tahun 2016 di Univesitas yang sama.

Sejak tahun 1999, beliau merupakan dosen Kedokteran umum, Biomedik, Kebidanan dan Pascasarjana di Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Selain mengajar dan aktif di bidang penelitian, beliau juga aktif di bidang pemerintah. Saat ini beliau menduduki beberapa jabatan sebagai Tenaga Ahli Menteri Kesehatan terkait Penanganan Pandemi COVID-19, Kepala Pusat Diagnostik dan Riset Penyakit Infeksi (PDRPI) Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Ketua *Transfer Technology Office* LPPM Universitas Andalas dan *Medical Research Consultant* PT. Kimia Farma.

Keaktifan, kerja keras dan kegigihannya beliau telah meraih beberapa penghargaan pada tahun 2020-2021 diantaranya beliau dinobatkan sebagai Warga Teladan Kota Padang oleh Pemko Padang, Pengendalian pandemic COVID-19 di Surabaya oleh Pemko Surabaya, Tokoh Profesional Indonesia oleh iNews/MNC TV (2020), Most Achievement Person oleh KPI, Tokoh Inovatif oleh FK Unand, Tokoh inspiratif oleh YBSI dan Inovasi Pemeriksaan COVID 19 oleh BNPB.

Resistensi antimikroba telah menjadi masalah kesehatan penduduk dunia secara global. Antibiotik β -laktam merupakan obat yang paling umum digunakan dalam pengobatan berbagai infeksi bakteri, tetapi sebagian besar diantaranya tidak lagi efektif dalam mengobati infeksi *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Sehingga diperlukan usaha penemuan anti MRSA yang baru. Salah satu sumber senyawa bioaktif alami berasal dari laut. Senyawa bioaktif laut telah banyak dilaporkan dalam penemuan obat baru dan telah banyak dipublikasikan.

Melalui buku ini, penulis bertujuan untuk menyusun referensi yang ringkas dan komprehensif terkait potensi senyawa antibakteri dari jamur *Aspergillus unguis* IB151 asal spons laut *Acanthostrongyllophora ingens* secara *in vitro*, dan mekanisme aktivitas terhadap bakteri (*in silico*).

Tiga senyawa bioaktif turunan depsidon telah berhasil diisolasi yaitu 2-chlorouruguinol, unguinol dan nidulin dari jamur tersebut. Ketiga senyawa memiliki nilai MIC dan MBC terhadap MRSA $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ dan $16 \mu\text{g/mL}$. Semua senyawa berinteraksi dengan respon yang serupa quinazolin, imipenem dan oxacilin terhadap protein PBP2a, MecR1 dan BlaR1 dari MRSA. Pengamatan SEM menunjukkan morfologi sel MRSA mengalami perubahan setelah pemberian senyawa hasil isolasi dibandingkan dengan sel normal.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa jamur *A. unguis* IB151 merupakan jamur yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri turunan depsidon.

Senyawa 2-chlorouruguinol, unguinol dan nidulin merupakan senyawa antibakteri potensial dalam mengatasi permasalahan infeksi MRSA, sehingga penelitian lanjutan masih perlu dilakukan.

ISBN 978-623-09-1210-8



9 786230 912108

Penerbit :
PT Nuansa Fajar Cemerlang
Grand Slipi Tower 5 Unit F
Jalan S. Parman Kav. 22-24
Kel. Palmerah, Kec. Palmerah
Jakarta Barat, DKI Jakarta, Indonesia, 11480
Telp: (021) 29866919