

Aktivitas antioksidan dan antibakteri dari alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk asal daun waru (*Hibiscus tiliaceus*)

Purbowatiningrum Ria Sarjono, Nuraini Dwi Laksmitasari, Mukhammad Asy'ari, Ngadiwiyanana, Ismiyanto, dan Enny Fachriyah
Universitas Diponegoro, Indonesia
Email: purbowatining@live.undip.ac.id

Abstrak: Tujuan dari penelitian ini untuk melakukan isolasi alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk. dari daun waru. Hasil isolasi senyawa alkaloid dikarakterisasi menggunakan kromatografi lapis tipis. Senyawa alkaloid hasil isolasi dilakukan uji kadar total fenol dan aktivitas antioksidan. Hasil fitokimia hasil isolasi bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk positif mengandung alkaloid, diperkuat dengan nilai Rf sebesar 0,8125 yang mirip dengan nilai Rf alkaloid dari tanaman tapak dara yaitu vindoline (Rf = 0,85). Senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk memiliki kadar total fenol tertinggi sebesar 2,390 mg ekivalen asam galat/gram sampel. Hasil tersebut menandakan bahwa pada senyawa alkaloid yang diperoleh terdapat gugus fenol. Aktivitas antioksidan senyawa alkaloid hasil isolasi menunjukkan IC₅₀ sebesar 99,70 mg/L yang menunjukkan kemampuan antioksidan yang kuat. Senyawa hasil isolasi juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S.aureus*.

Kata Kunci: *tanaman waru, bakteri endofit, alkaloid, antioksidan*

Antioxidant and antibacterial activity of alkaloids endophyte bacterial *Pseudomonas hibiscicola* Wk origin of waru leaves (*Hibiscus tiliaceus*)

Abstract: The purpose of this study was to isolate alkaloids from endophytic bacteria *Pseudomonas hibiscicola* Wk. from waru leaves. The results of the isolation of alkaloid compounds were characterized using thin layer chromatography. The isolated alkaloid compounds were tested for total phenol content, and antioxidant activity. The phytochemical results from the isolation of alkaloid compounds from the endophytic bacteria *Pseudomonas hibiscicola* Wk were positive for containing alkaloids, confirmed by an Rf value of 0.8125 which is similar to the Rf value of alkaloids from the periwinkle plant, namely vindoline (Rf = 0.85). Alkaloid compounds from the endophytic bacteria *Pseudomonas hibiscicola* Wk had the highest total phenol content of 2.390 mg gallic acid/gram sample. These results indicate that the alkaloid compounds obtained contain phenol groups. The IC₅₀ value obtained from the isolated alkaloid compound was 99.70 mg/L, which shows that the isolated alkaloid has strong antioxidant capacity, and has the ability to inhibit the growth of *E.coli* and *S.aureus* bacterial.

Keywords: *hibiscus tiliaceus plant, endophytic bacteria, alkaloids, antioxidants, antibacterial*

How to Cite (APA 7th Style): Sarjono, P. R., Laksmitasari, N. D., Asy'ari, M., Ngadiwiyanana, Ismiyanto, & Fachriyah, E. (2025). Aktivitas antioksidan dan antibakteri dari alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk asal daun waru (*Hibiscus tiliaceus*). *Jurnal Penelitian Saintek*, 30(1), 10-26. <https://doi.org/10.21831/jps.v30i1.77501>.

PENDAHULUAN

Hibiscus tiliaceus merupakan salah satu tanaman yang bisa menghasilkan senyawa bioaktif. Daun *Hibiscus tiliaceus* diketahui kaya akan fenolik dan flavonoid dibandingkan dengan kulit kayu, buah, dan akar. Beberapa senyawa fenolik yaitu katekin, ellagic asam, quercetin, dan rutin hidrat, telah diisolasi dari ekstrak etanol daun *H. tiliaceus* (Michalak, 2023). Penelitian Purba *et al.* (2022) dan Surahmaida *et al.* (2020) melaporkan bahwa ekstrak etanol dan metanol daun waru terdapat kandungan senyawa seperti alkaloid, tannin, saponin, glikosida dan flavonoid. Selain dari tanaman, senyawa bioaktif juga bisa diperoleh dari bakteri endofit. Bakteri endofit ialah mikroorganisme yang hidup di dalam tubuh inangnya tanpa memberikan penyakit bagi tumbuhan inangnya (Bhore *et al.*, 2010). Bakteri endofit meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit, hama, dan parasit, serta merupakan sumber bioaktif penting dalam bidang farmasi yang menjanjikan. Bakteri endofit mampu memproduksi senyawa bioaktif (Purwestri, 2021). Penggunaan langsung tanaman *Hibiscus tiliaceus* membutuhkan waktu yang lebih lama untuk menghasilkan senyawa bioaktif dibandingkan menggunakan bakteri endofit. Keuntungan menggunakan mikroba endofit sebagai sumber senyawa bioaktif adalah dapat diproduksi secara cepat, tidak terbatas dan tidak tergantung cuaca atau musim (Sugijanto, 2011). Sarjono *et al.* (2022) telah memperoleh isolat bakteri endofit Wk dari daun waru yang memiliki ciri-ciri morfologi koloni berwarna putih, bentuk sel kokus termasuk bakteri gram negatif dan hasil dari genotifik memiliki kedekatan dengan *Pseudomonas hibiscicola* strain ATCC 19867, oleh karenanya diberi nama *Pseudomonas hibiscicola* Wk.

Hasil skrining fitokimia ekstrak metabolit sekunder mengandung alkaloid. Fase akhir stasioner (jam ke-34) bakteri endofit ini menghasilkan metabolit sekunder dengan aktivitas antioksidan tertinggi pada nilai IC_{50} sebesar 196,58 ppm, dan memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, dan *Escherichia coli*.

Berdasarkan penelitian terdahulu maka pada penelitian ini dilakukan ekstraksi senyawa alkaloid dari bakteri *Pseudomonas hibiscicola* Wk serta uji aktivitas antioksidan dan antibakteri dari senyawa alkaloid dari *Pseudomonas hibiscicola* Wk.

METODE

Penelitian ini menggunakan berbagai bahan seperti bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk, nutrisi agar, yeast, pepton, alkohol 96 dan 70%, akuades, safranin, iodine, kristal violet (pewarna), etanol, kloroform, HCl, pereaksi dragendroff, pereaksi mayer, serbuk Mg, $FeCl_3$ 1%, etil asetat, reagen *lieberman burchard*, NH_4OH , serbuk DPPH, asam galat, metanol p.a. (merck), reagen *folin ciocalteu*, dan Na_2CO_3 20 %.

Penelitian ini menggunakan alat-alat seperti mikroskop (*motic*), sentrifuge (*hettich eba 200*), *laminar air flow* (*innotech*), *rotary evaporator*, orbital shaker (*memmert waterbath shaking model wbn 14*), silika gel gf 254, spektrofotometer uv-vis (*genesys 10s uv vis spectrophotometer dan shimadzu uv-1280*), autoklaf (*all american 75x*), alat gelas, plastik wrap, aluminium foil, kaca preparate, mikro pipet (*thermo scientific finnpipette*), neraca analitik (*ohaus*), erlenmeyer (*herma, pyrex*), labu ukur (*pyrex*), corong pisah (*pyrex*), dan cawan petri (*herma*).

Pembuatan media modifikasi zobel dilakukan dengan melarutkan sebanyak 0,025 g yeast dan 0,125 g pepton dalam 50 mL akuades. Disterilisasi menggunakan autoklaf selama 45 menit didapatkan media cair steril. Pembuatan media modifikasi zobel padat dilakukan dengan melarutkan sebanyak 0,025 g yeast; 1,2 nutrient agar; dan 0,125 g pepton dalam 50 mL aquadest

dan disterilisasi menggunakan autoklaf selama 45 menit didapatkan media padat steril. Kedua media kemudian di UV dalam laminar air flow selama 15 menit.

Peremajaan bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri endofit dari agar miring ke media cair. Proses tersebut diinkubasi selama 24 jam lalu di streak ke media agar miring yang baru dengan menggoreskan bakteri menggunakan ose bulat. Agar miring baru yang sudah ditanam bakteri endofit diinkubasi di suhu ruang selama 24 jam hingga didapatkan isolat bakteri dalam stok agar miring. Pemisahan bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 ini dilakukan untuk mendapatkan isolat tunggal bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1. Bakteri endofit pada agar miring diinokulasi ke dalam media cair 50 mL dan inkubasi sekitar 24 jam. bakteri endofit pada media cair diinokulasi ke media padat pada cawan petri dengan metode *streak* lalu diinkubasi di suhu kamar selama 24 jam.

Konfirmasi karakterisasi fenotipik dilakukan dengan mengoleskan 1-2 tetes isolat bakteri endofit pada kaca preparat lalu dikeringkan dengan api bunsen. Penetesan dengan kristal violet lalu pendiaman 1 menit dan dibilas dengan akuades. Kaca preparat kemudian ditambahkan iodin dan dilakukan pendiaman sekitar 1 menit, dilanjutkan dengan ditetesi etanol dan pendiaman sekitar 30 detik lalu dibilas lagi dengan akuades. Penambahan safranin dan dilakukan pendiaman sekitar 1 menit lalu bilas dengan aquades. Pengamatan dengan mikroskop.

Pembuatan starter dilakukan dengan menginokulasi isolat bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk (sebanyak 1 % setelah mencapai McFarland) pada 50 mL media cair. Proses tersebut diinkubasi pada shaker selama 13 jam dengan kecepatan 125 rpm pada suhu kamar. Penambahan starter sebanyak 1500 yang berisi bakteri ke media 200 mL media cair zobel lalu diinkubasi selama 34 jam untuk mendapatkan metabolit sekunder. Metabolit sekunder disentrifugasi selama 15 menit dalam 6000 rpm didapatkan endapan yang merupakan bakteri yang telah mengalami lisis dan supernatan. Bagian supernatan diambil untuk dilakukan uji penapisan fitokimia.

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengamati zat metabolit sekunder apa yang terkandung pada bakteri endofit yang dapat berperan sebagai antioksidan. Pengujian yang akan dilakukan berupa pengujian alkaloid, steroid atau triterpenoid, flavonoid, tannin dan saponin. Supernatan diekstraksi dengan kloroform dan HCl 2N didapatkan dua bagian yaitu fraksi atas dan fraksi bawah. Fraksi bawah dibagi masing-masing 5 mL dalam 2 tabung reaksi. Penambahan reagen dragendorff dan mayer pada tabung 1 dan 2. Hasil positif penambahan reagen dragendorff terbentuk endapan merah bata dan penambahan reagen mayer terdapat endapan putih. Sebanyak 2 mL supernatant ditambahkan etanol 5 mL. Penambahan serbuk Mg kemudian penambahan 10 tetes HCl pekat kemudian dilakukan penggojogan hingga Mg bereaksi seluruhnya. Hasil positif akan terjadi perubahan warna kuning, oranye atau merah. Sebanyak 2 mL supernatan ditambahkan 5 mL etanol dan 3 tetes FeCl₃ 1% dan dilakukan pengamatan perubahan warna. Hasil positif terjadi perubahan warna biru atau hijau kehitaman. Sebanyak 2 mL supernatan ditambahkan 5 mL akuades, dilakukan penggojogan hingga timbul busa dan ditambahkan HCl 2 N. Hasil positif terbentuk busa. Sebanyak 2 mL supernatan ditambahkan 2 mL h-heksana dan digojog hingga terdapat dua lapisan. fraksi atas di tambahkan reagen Lieberman Burchard. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna biru kehijauan yang berarti mengandung steroid dan terjadi perubahan warna merah menunjukkan adanya triterpenoid.

Isolasi senyawa alkaloid dilakukan dengan menambahkan HCl hingga pH 3 pada supernatant dan diekstraksi dengan etil asetat selama 10 menit dan didapatkan menghasilkan 2 bagian yaitu lapisan bawah berupa air dan lapisan atas berupa etil asetat. Penambahan NH₄OH hingga pH

9 pada fraksi air dan diekstraksi dengan etil asetat selama 10 menit akan didapatkan 2 fraksi yaitu etil asetat (atas) dan air (bawah). Fraksi etil asetat (bagian atas) dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* didapatkan senyawa alkaloid.

Uji kromatografi lapis tipis dilakukan menggunakan eluen kloroform, etil asetat, etanol (7 : 2 : 1) sebagai fasa gerak dan pelat silika sebagai fasa diam. Eluen dijenuhkan di dalam chamber. Pembuatan batas atas dan bawah pada pelat. Pelarutan sampel dengan etil asetat dan dilakukan penotolan pada pelat KLT. Lalu pelat silika direndam dalam eluen jenuh hingga fase gerak mencapai batas atas pelat kemudian dikeringkan. Pengamatan noda yang terbentuk dilakukan di lampu UV 254 dan 365 nm. Noda yang didapat ditentukan nilai Rf serta dilakukan penyemprotan reagen dragendorff pada pelat silika akan terbentuk noda merah pada pelat.

Uji kadar total fenol dilakukan dengan melarutkan sebanyak 100 mg asam galat pada labu ukur 10 mL dengan akuades dan didapatkan larutan induk asam galat 10.000 ppm. Larutan induk 10.000 ppm diencerkan menjadi 1000 ppm. Larutan induk 1000 ppm diencerkan kembali dengan variasi konsentrasi 50; 60; 70; 80; 90 dan 100 ppm. Sebanyak 0,2 mL dari setiap konsentrasi diambil dan ditambahkan akuades 7,9 mL. Penambahan reagen folin ciocalteu 0,5 mL dan dilakukan penggojogan selama 8 menit. Penambahan 1,5 mL Na₂CO₃ 20 %, pengocokan selama 30 menit. Pengukuran absorbansi dari setiap konsentrasi pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran kadar total fenol pada sampel dilakukan dengan melarutkan sebanyak 0,2 mL sampel dalam 7,9 mL akuades. Penambahan *folin ciocalteu* sebanyak 0,5 mL dan dilakukan pengocokan selama 8 menit. Penambahan 1,5 mL Na₂CO₃ 20 %, pengocokan selama 30 menit dan dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 765 nm.

Pengujian kemampuan antioksidan pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan reagen DPPH. Pengukuran antibakteri menggunakan metode cakram, dalam berbagai pada konsentrasi 10.000-100.000 ppm. Bakteri patogen yang digunakan adalah *E. coli* (-) dan *S.aureus* (+).

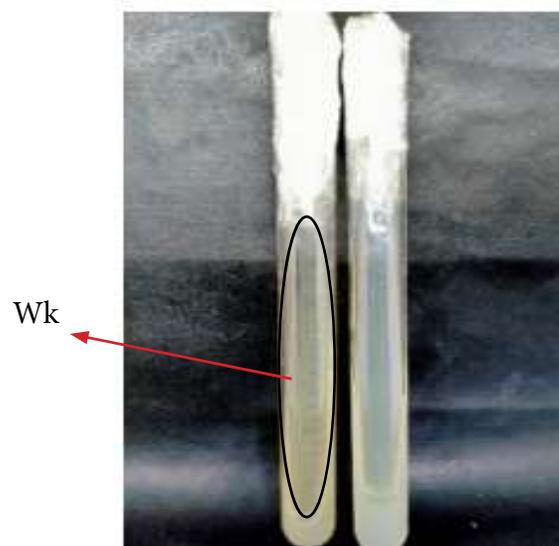
HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilaksanakan di laboratorium Biokimia, Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro. Tahapan penelitian ini yaitu peremajaan bakteri endofit, mengkarakterisasi bakteri endofit dengan metode pewarnaan gram, memproduksi metabolit sekunder, penapisan fitokimia, isolasi senyawa alkaloid dari bakteri endofit, mengkarakterisasi senyawa alkaloid hasil isolasi kromatografi lapis tipis (KLT) dan menguji kadar total fenol serta aktivitas antioksidan senyawa alkaloid yang diperoleh.

Peremajaan Bakteri Endofit. Bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk yang diperoleh dari penelitian Sholekhah (2021) diremajakan kembali dengan tujuan untuk memastikan bahwa bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk yang sebelumnya dalam keadaan inaktif menjadi aktif kembali. Bakteri endofit yang telah lama hidup di agar miring diinokulasi ke media cair zobel untuk mengaktifkan kembali bakteri kemudian bakteri dari media cair tersebut di inokulasi dengan metode streak pada media agar miring zobel yang baru. Hasil yang diperoleh dari peremajaan bakteri ini berupa bakteri hasil *streak* di media agar miring seperti pada Gambar 1.

Berdasarkan Gambar 1, bakteri endofit Wk tumbuh pada media agar miring baru ditandai dengan adanya warna putih pada permukaan media. Pada kontrol tetap bening menunjukkan bahwa tidak adanya kontaminan yang tumbuh.

Gambar 1. Stok agar miring bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk



Pemisahan bakteri endofit ini yang bertujuan untuk mendapatkan koloni tunggal bakteri dan melakukan pengamatan secara makroskopis dengan mengamati bentuk dan warna dari endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk. Identifikasi secara makroskopis dilakukan untuk mengamati warna, tekstur permukaan dan bentuk dari bakteri (Cowan & Smith, 2021; Dwidjoseputro, 1998).

Pada Gambar 2, pada bagian yang dilingkari terdapat bakteri yang tumbuh berwarna putih, berbentuk bulat dan memiliki bentuk tepi halus. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri yang tumbuh merupakan koloni tunggal. Koloni tunggal bakteri merupakan koloni dari bakteri yang tumbuh secara terpisah dari satu atau beberapa sel (Irianto, 2012, pp. 76-77). Penelitian Sarjono *et al.* (2023) menunjukkan bahwa koloni bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk memiliki bentuk bulat, berwarna putih, memiliki bentuk tepi yang halus.

Konfirmasi karakterisasi fenotipik bakteri endofit (Pewarnaan gram). Bakteri endofit dilakukan identifikasi secara mikroskopis dengan menggunakan metode pewarnaan gram. Konfirmasi ini bertujuan untuk memastikan jenis dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk masih sama seperti penelitian terdahulu.

Gambar 2. Isolat bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk



Dari hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk memiliki bentuk sel kokus dan berwarna merah yang merupakan bakteri gram negatif seperti pada Gambar 3. Berdasarkan hasil pewarnaan ini sesuai dengan penelitian Sarjono (2023) bakteri endofit Wk adalah bakteri gram positif yang memiliki sel berwarna merah dengan bentuk sel kokus. Hal ini terjadi karena lapisan peptidoglikan membran luar dari bakteri gram negatif relatif tipis dan lapisan lipopolisakarida yang dapat dirusak oleh alkohol sehingga warna dari kristal violet hilang dan terbilas alkohol (Pelczar & Chan, 2006). Berbeda dengan lapisan peptidoglikan pada bakteri gram positif yang tebal sehingga mampu mempertahankan warna dari kristal violet setelah penambahan alkohol. Alkohol akan mendehidrasi lapisan peptidoglikan dan dinding sel akan menjadi penghalang permeabilitas sehingga kristal violet dapat tertahan di dalam sel (Anderson *et al.*, 2021).

Gambar 3. Hasil pewarnaan gram bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk



Produksi metabolit sekunder. Produksi metabolit sekunder dilakukan untuk memperoleh metabolit sekunder bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk. Produksi metabolit sekunder ini dilakukan pada fase awal kematian. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri endofit yang diteliti oleh Sarjono *et al.* (2023) fase awal kematian adalah di jam ke-34 (M34), bahwa hasil uji aktivitas antibakteri tertinggi diperoleh di jam ke-34. Pada fase awal kematian metabolit sekunder yang diproduksi oleh bakteri cukup banyak sehingga produksi metabolit sekunder ini dilakukan di jam ke-34 untuk mengetahui seberapa besar kemampuan aktivitas antioksidan di jam ke-34. Metabolit sekunder bakteri endofit disentrifuge dengan kecepatan sekitar 6000 rpm dalam waktu 15 menit. Hal ini berfungsi agar terjadi pemisahan supernatan dan endapan bakteri yang telah lisis. Supernatan yang diperoleh berupa metabolit sekunder dan endapan yang diperoleh berupa hasil dari pelisisan sel bakteri. Hasil produksi metabolit ini berupa cairan berwarna bening sebanyak 7 liter yang kemudian dilakukan skrining fitokimia dan isolasi senyawa alkaloid.

Penapisan fitokimia. Pengujian ini berfungsi untuk mengamati golongan senyawa apa yang ada pada bakteri endofit yang dapat berperan sebagai antioksidan. *Pseudomonas hibiscicola* Wk yang berperan sebagai antioksidan. Kandungan kimia yang diujikan berupa alkaloid, tanin, flavonoid, saponin, steroid dan triterpenoid. Hasil yang diperoleh dari penapisan fitokimia bakteri endofit W1 dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1

Hasil penapisan fitokimia metabolit sekunder bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk

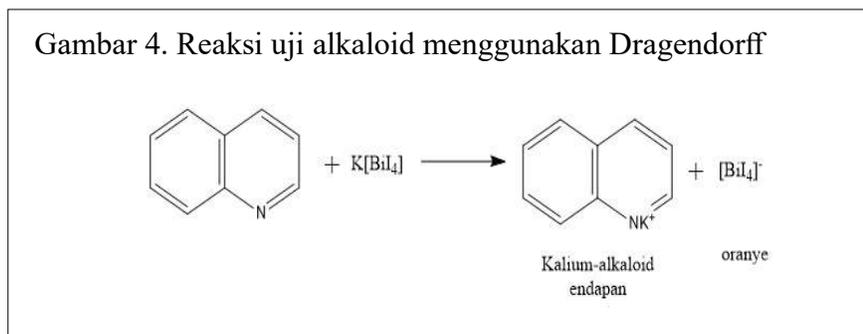
Senyawa	Metabolit Sekunder Bakteri Endofit Wk M34
Alkaloid	+
Flavonoid	-
Saponin	-
Tanin	-
Steroid	-
Triterpenoid	-

Berdasarkan Tabel 1, metabolit sekunder bakteri endofit positif mengandung senyawa alkaloid, ditandai dengan adanya endapan merah bata pada penambahan reagen dragendorff. Endapan merah bata tersebut merupakan kalium alkaloid. Alkaloid dan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat akan berikatan kovalen koordinat seperti yang ditunjukkan pada gambar (Illing *et al.*, 2017; Večeřa & Gasparič, 1971).

Purwestri (2021) menjelaskan bahwa bakteri endofit mempunyai kemampuan memproduksi metabolit sekunder. Golongan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, fenolik, dan yang lainnya sangat bermanfaat sebagai antioksidan, antibakteri, antidiabetes, antiinflamasi, antikanker dan antitripanosoma (Gunawan *et al.*, 2016).

Isolasi senyawa alkaloid. Isolasi senyawa alkaloid dilakukan dengan tujuan untuk memperoleh senyawa alkaloid dari metabolit sekunder bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk. Supernatan dari metabolit sekunder bakteri endofit dilakukan reaksi penggaraman dengan cara menambahkan HCl hingga pH 3. Hal ini dilakukan agar membentuk garam alkaloid yang mudah larut dalam air dan terpisah dari komponen lain (Robinson, 1991). Hasil penggaraman diekstraksi dengan etil asetat selama 10 menit hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas berupa fraksi etil asetat dan bawah berupa fraksi air. Penggunaan etil asetat bertujuan untuk memisahkan senyawa lemak dan campuran lain pada larutan asam. Garam alkaloid yang larut dalam fraksi HCl kemudian ditambahkan NH_4OH hingga pH 9. Penambahan NH_4OH hingga pH 9 dilakukan untuk mengubah garam alkaloid dari hasil penggaraman menjadi alkaloid bebas yang larut dalam pelarut organik dan diekstraksi dengan etil asetat yang bertujuan untuk menarik alkaloid bebas dari larutan (Robinson, 1991). Dari hasil ekstraksi diperoleh lapisan atas yang berupa etil asetat dan bawah berupa air. Lapisan atas (etil asetat) yang berisi senyawa alkaloid dipekatkan dengan *rotary evaporator* dan diperoleh hasil berupa pasta berwarna putih kekuningan sebanyak 2,5 gram. Hasil isolasi senyawa alkaloid kemudian diuji kembali dengan penambahan reagen dragendorff untuk memastikan hasil dari ekstraksi tersebut adalah senyawa alkaloid. Dari hasil penambahan diperoleh endapan berwarna merah bata yang menunjukkan hasil isolasi mengandung senyawa alkaloid.

Uji kromatografi lapis tipis. Pengujian kualitatif dari hasil isolasi alkaloid dilakukan metode kromatografi lapis tipis. Fase diam pada uji ini yaitu plat silika GF_{254} dan fasa geraknya berupa eluen yang berupa campuran dari kloroform, etil asetat, dan etanol dengan perbandingan 7 : 2 : 1. Penelitian Suswanti (2021) eluen kloroform : etil asetat : etanol dengan perbandingan 7 : 2 : 1 menghasilkan 5 noda terpisah pada plat silika yang disinari lampu UV 366 nm dan merupakan eluen yang menghasilkan pemisahan yang baik. Penyemprotan noda pada pelat silika menggunakan pereaksi dragendorff juga dilakukan dengan tujuan untuk membuktikan

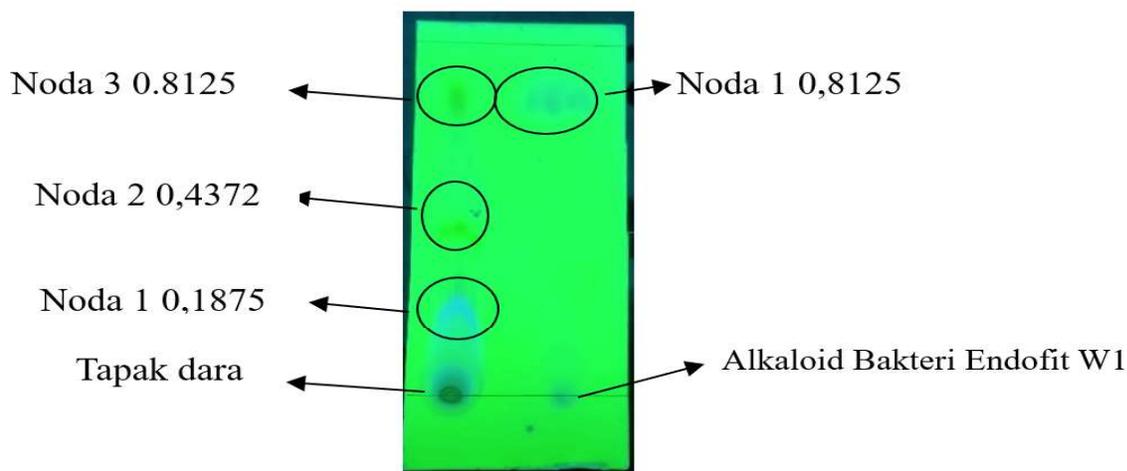


noda hasil pemisahan positif mengandung alkaloid. Hal ini ditandai dengan adanya noda berwarna merah pada plat. Tanaman tapak dara digunakan sebagai kontrol (+) karena tapak dara mengandung banyak alkaloid. Penggunaan ekstrak tapak dara ini untuk memastikan bahwa ekstrak dari bakteri endofit benar-benar merupakan alkaloid berdasarkan nilai Rf. Tapak dara atau *Catharanthus roseus* memiliki sekitar 120 senyawa alkaloid dan 70 di antaranya memiliki aktivitas farmakologis seperti vindoline, vinblastine, vindolicine, vincristine (Barrales-Cureño *et al.*, 2019 & Saiman *et al.*, 2018). *Catharanthus roseus* disebut sebagai sumber yang kaya akan senyawa alkaloid dan fenolik yang memiliki banyak sifat biologis seperti aktivitas antikanker, antioksidan, antibakteri, antidiabetes dan antihipertensi Ekstrak dari tapak dara diperoleh dari hasil maserasi. Perbandingan nilai Rf dan noda yang didapatkan dari kedua sampel digunakan untuk membuktikan bahwa hasil senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 positif mengandung senyawa alkaloid.

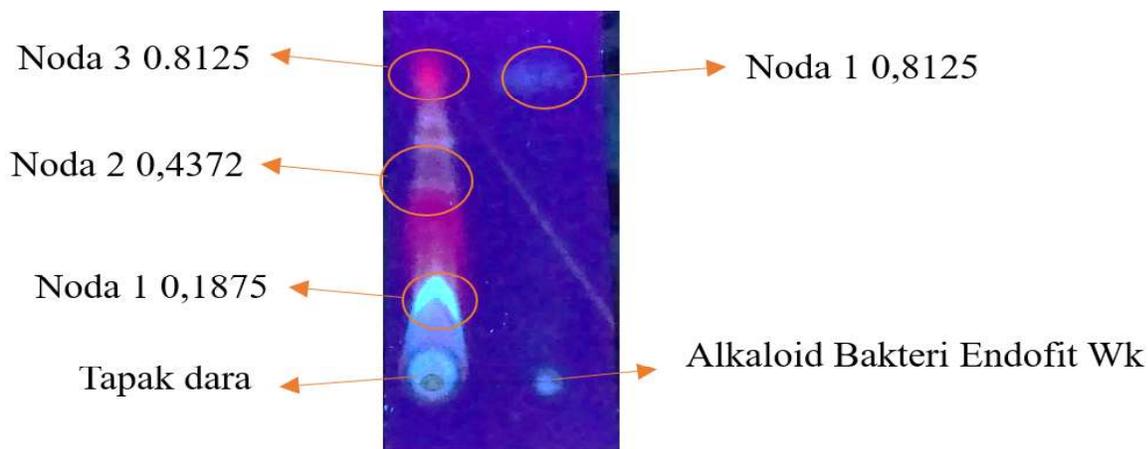
Terbentuknya banyak noda pada tapak dara menunjukkan banyaknya senyawa yang terekstraksi ditandai dengan nilai Rf yang beragam. Ekstrak tapak dara diperoleh dengan cara maserasi 3x24 jam. Lama waktu maserasi juga mempengaruhi banyaknya senyawa yang terekstraksi (Istiqomah, 2013). Perbedaan konsentrasi dari larutan di luar dan dalam sel menyebabkan terjadinya proses ekstraksi maserasi. cairan penyari akan memasuki sel yang terdapat bahan aktif, lalu bahan aktif tersebut larut dan terekstraksi. Proses terjadi secara kontinyu hingga mengalami kesetimbangan konsentrasi. Penggunaan pelarut etanol pada maserasi ekstrak tapak dara dikarenakan etanol distribusi polaritasnya besar (Handoyo, 2020). Nilai Rf yang diperoleh dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan menunjukkan sifat senyawa pada sampel (Gandjar & Rohman, 2007, pp. 224-228). Pemilihan eluen dilakukan berdasarkan kemampuan eluen untuk mengelusi senyawa. Eluen dikatakan baik apabila mampu memisahkan banyak senyawa ditandai dengan munculnya noda. Semakin banyak jumlah noda yang diperoleh, eluen yang digunakan semakin bersifat nonpolar (Forestryana & Arnida, 2020). Deteksi noda dilakukan di bawah lampu UV 254 dan 366 nm yaitu panjang gelombang pendek dan panjang serta pereaksi dragendorff. Prinsip pengamatan dengan UV 254 nm yaitu didasarkan pada fluoresensi dari pelat sedangkan noda akan berwarna hitam atau gelap, noda-noda yang terlihat akibat adanya interaksi indikator fluoresensi pada pelat dengan sinar (Forestryana & Arnida, 2020). Prinsip pengamatan dengan lampu UV gelombang panjang 366 nm yaitu noda berfluoresensi berpendar dan pelat menjadi gelap, noda-noda yang terlihat merupakan interaksi dari kromofor pada noda dengan sinar UV (Maulana, 2018).

Berdasarkan Gambar 5 dan 6, hasil uji kromatografi lapis tipis dengan penyinaran lampu UV 254 nm dan 366 nm dari senyawa alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk

Gambar 5. Hasil kromatografi lapis tipis senyawa alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk (kanan) dan ekstrak tapak dara (Kiri) pada lampu UV 254 nm

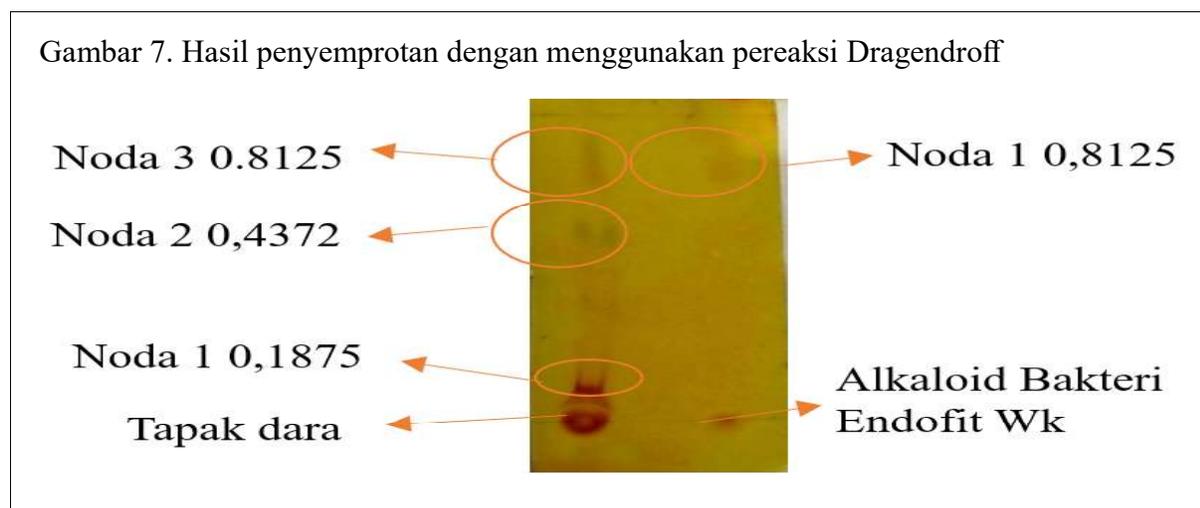


Gambar 6. Hasil kromatografi lapis tipis senyawa alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk (kanan) dan ekstrak tapak dara (Kiri) pada lampu UV 366 nm



diperoleh 1 noda dengan nilai Rf 0,8125. Suatu senyawa dapat dianggap murni jika hanya muncul satu titik noda pada pelat KLT (Rahmi *et al.*, 2016). Pada penyinaran dengan lampu UV 366 nm muncul warna biru pada noda 0,8125 menandakan bahwa senyawa alkaloid *Pseudomonas hibiscicola* Wk mengandung alkaloid sedangkan pada UV 254 nm menunjukkan adanya noda. Penyinaran dengan lampu UV 366 nm akan menunjukkan positif alkaloid apabila terdapat warna biru, ungu atau biru kehijauan (Večeřa & Gasparič, 2000). Pada ekstrak tapak dara didapatkan 3 noda dengan nilai Rf pada noda 1, 2, dan 3 sebesar 0,1875; 0,4372 dan 0,8125. Serpentine (nilai Rf = 0,1), vincristine (nilai Rf = 0,44) dan vindoline (nilai Rf = 0,85)

(Ataei-Azimi *et al.*, 2008, Magagula *et al.*, 2012, & Baerheim-Svendsen & Verpoorte, 1983). Pada ekstrak tapak dara diperoleh warna biru pada noda 0,1875 dan ungu pada noda 0,4372 dan 0,8125 dengan penyinaran UV 366 nm dan 254 nm yang menunjukkan bahwa terdapat alkaloid pada ekstrak tapak dara. Hasil penyemprotan menggunakan pereaksi dragendorff juga diperoleh noda kecokelatan yang menunjukkan bahwa noda-noda hasil pemisahan mengandung alkaloid seperti pada Gambar 7. Menurut Wullur *et al.* (2012), setelah penyemprotan menggunakan dragendorff akan muncul noda-noda berwarna jingga atau coklat yang menunjukkan sampel positif mengandung alkaloid. Berdasarkan hal tersebut disimpulkan bahwa bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 mampu menghasilkan senyawa alkaloid.



Penentuan kadar total fenol. Uji kadar senyawa fenol dilakukan untuk mengamati banyaknya senyawa fenolik yang terkandung pada senyawa alkaloid bakteri endofit. Pengujian kadar total senyawa fenol ini dilakukan dengan reagen *Folin-ciocalteu* dan diukur pada panjang gelombang 765 nm menggunakan spektrofotometer. Reaksi senyawa fenol dan *Folin-ciocalteu* menghasilkan terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru (Hapsari *et al.*, 2018). Reagen *Folin-ciocalteu* adalah larutan kompleks ion polimer yang terdiri dari heteropolifosfatungstat dan asam fosfomolibdat. Reagen ini apabila bereaksi dengan gugus hidroksil dari fenolik akan membentuk kompleks molybdenum-tungsten berwarna biru. Senyawa kompleks ini yang diukur pada spektrofotometer. Semakin banyak fenol yang terkandung pada sampel, semakin banyak terbentuknya senyawa kompleks molybdenum-tungsten sehingga menghasilkan warna biru yang pekat (Singleton & Rossi, 1965). Asam galat digunakan sebagai standar untuk mendapatkan kurva standar fenol yang digunakan untuk mengukur seberapa banyak senyawa fenolik pada sampel alkaloid bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk. Pada asam galat terdapat fenol yang sehingga mudah bagi asam galat bereaksi membentuk kompleks berwarna biru dengan pereaksi *Folin-Ciocalteu* (Adawiah & Muawanah, 2015 & Julkunen-Tiitto, 1985). Dari hasil pengukuran absorbansi asam galat menggunakan spektrofotometer diperoleh dari persamaan $y = 0,0254x + 0,1513$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9498.

Berdasarkan Tabel 2, diperoleh kadar total fenol dari senyawa alkaloid bakteri endofit pada konsentrasi 1000 ppm, 5000 ppm, dan 10.000 ppm sebesar 1,051; 2,114 dan 2,390 mg ekuivalen

Tabel 2

Data penentuan kadar total fenol

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi Sampel	Kadar Total Fenol (mgek asam galat/gram sampel)
1000	0,178	1,051
5000	0,205	2,114
10000	0,212	2,390

asam galat/gram sampel. Kadar total fenol dengan nilai yang kecil membuktikan bahwa senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 terdapat fenol pada struktur alkaloidnya. Salah satu contoh alkaloid yang memiliki fenol pada strukturnya yaitu alkaloid *7-O-methylvariecolortide A* ditemukan pada jamur endofit *Eurotium rubrum* dari tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus*) (Li *et al.*, 2010).

Uji aktivitas antioksidan. Senyawa alkaloid hasil isolasi diuji aktivitas antioksidannya dengan menggunakan metode DPPH. Pada pengujian ini bertujuan untuk mengukur seberapa besar senyawa alkaloid mampu menghambat radikal bebas. Larutan pembanding yang digunakan pada uji ini yaitu larutan asam galat. Penggunaan asam galat sebagai pembanding karena asam galat terbukti paling reaktif dan efektif meredam radikal bebas DPPH daripada asam askorbat, kuersetin dan trolox (Maesaroh *et al.*, 2018; Yoga, 2015). DPPH atau *1,1-diphenyl-2-picrylhydazyl* adalah radikal bebas yang memiliki panjang gelombang maksimum 515-520 nm (Bandonienè *et al.*, 2002; Pavlov *et al.*, 2002). Aktivitas antioksidan senyawa alkaloid dari bakteri endofit diukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum 516 nm dan didapatkan persamaan $y = 0,5069x - 0,5395$ dengan nilai koefisien korelasi atau R^2 sebesar 0,9362. Larutan pembanding asam galat juga diukur dengan panjang gelombang yang sama yaitu 516 nm dan didapatkan persamaan $8,8124x + 31,809$ dengan nilai R^2 sebesar 0,9919. Hasil pengukuran absorbansi aktivitas antioksidan senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk dan larutan pembanding yang diperoleh seperti pada Tabel 3.

Tabel 3

Data hasil uji aktivitas antioksidan senyawa alkaloid dari bakteri endofit *pseudomonas hibiscicola* Wk

Absorbansi Kontrol	Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi Sam- pel	% Inhibisi	IC ₅₀
1,065	50	0,788	26,01	99,70
	60	0,746	29,95	
	70	0,725	31,96	
	80	0,629	40,94	
	90	0,577	45,82	
	100	0,531	50,17	

Berdasarkan Tabel 3 dan 4, persen inhibisi dari senyawa alkaloid dan asam galat mengalami kenaikan sebanding dengan kenaikan konsentrasi sampel. Besar IC₅₀ yang diperoleh

Tabel 4

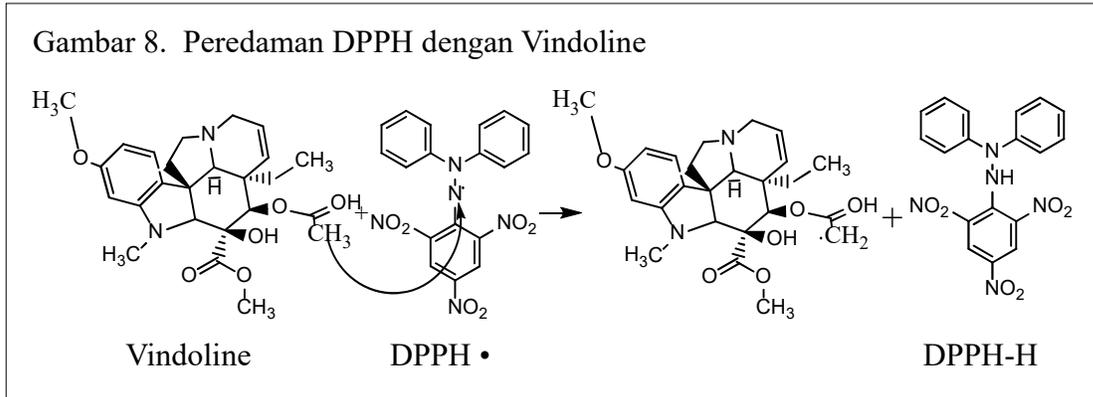
Data hasil uji aktivitas antioksidan larutan pembanding (Asam Galat)

Konsentrasi Asam Galat (mg/L)	Absorbansi Kontrol	Absorbansi Asam Galat	% Inhibisi	IC ₅₀
1	0,901	0,548	39,1787	2,064
2		0,445	50,6104	
3		0,370	58,9345	
4		0,289	67,9245	
5		0,229	74,5838	

dari senyawa alkaloid yaitu 99,70 mg/L yang menandakan bahwa senyawa alkaloid memiliki kemampuan antioksidan yang kuat. Konsentrasi inhibisi 50 (IC₅₀) ialah konsentrasi dari sampel yang dibutuhkan untuk menangkal radikal bebas DPPH sebanyak 50 % (Maryam, 2015). Nilai IC₅₀ sebesar 99,70 mg/L yang berarti dengan konsentrasi sebesar 99,70 mg/L radikal bebas DPPH dapat dihambat sebesar 50%. Menurut Badarinath et al. (2010), senyawa dengan nilai IC₅₀ < 50 merupakan antioksidan yang sangat kuat. Senyawa dengan nilai IC₅₀ sekitar 50-100 maka dikatakan sebagai antioksidan kuat, antioksidan sedang jika nilai IC₅₀ sekitar 100-150 dan lemah apabila nilai IC₅₀ sekitar 151-200. Penelitian Sholekhah (2021) melaporkan bahwa aktivitas antioksidan yang diperoleh dari metabolit sekunder bakteri endofit W1 pada jam ke-34 sebesar 277,15 ppm. Nilai IC₅₀ senyawa alkaloid yang didapatkan dari hasil memiliki nilai lebih kecil daripada nilai IC₅₀ senyawa metabolit sekunder bakteri endofit yang menunjukkan senyawa alkaloid hasil isolasi lebih murni daripada ekstrak metabolit sekunder. Besar IC₅₀ dari asam galat sebesar 2,064 mg/L yang menandakan bahwa antioksidan asam galat sangat kuat. Asam galat memiliki nilai IC₅₀ yang kecil karena asam galat adalah senyawa senyawa fenolik murni (Sholekhah, 2021). Kemampuan antioksidan dari asam galat dikarenakan adanya gugus hidroksil pada fenol yang melepaskan atom hidrogen dan berikatan pada radikal bebas DPPH (Maesaroh et al., 2018; Sirivibulkovit et al., 2018). Berdasarkan hasil kromatografi lapis tipis alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 memiliki kemiripan nilai Rf dengan alkaloid tapak dara yaitu vindoline. Vindoline merupakan salah satu alkaloid yang terdapat pada tanaman tapak dara (*Catharanthus roseus*) dan dipercaya memiliki aktivitas sebagai antioksidan dan antidiabetes. Vindoline dilaporkan dapat menghambat DPPH dengan konsentrasi sebesar 73,0 µM dan menunjukkan kemampuan antioksidan yang baik dibandingkan asam askorbat (92,6 µM) (Tiong et al., 2013).

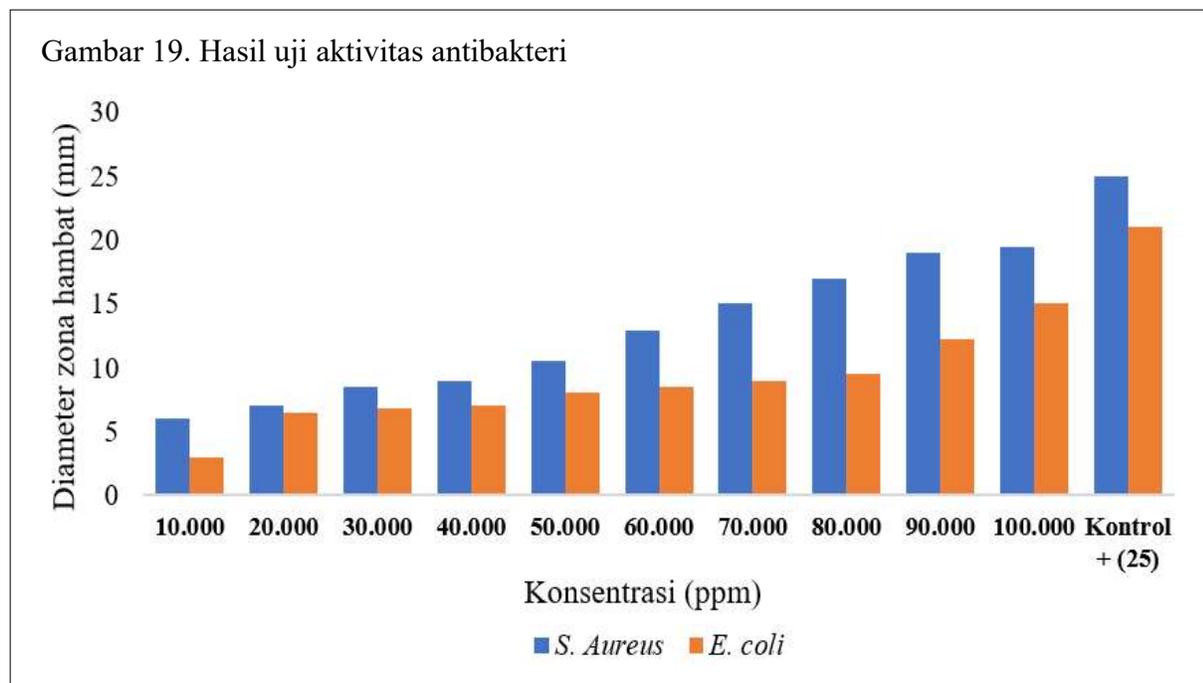
Aktivitas antioksidan dari vindoline disebabkan oleh hidrogen alfa pada alkaloid dapat lepas dan berikatan dengan DPPH. Hal ini dikarenakan karbonil menarik elektron dari karbon alfa yang membuat karbon alfa bermuatan parsial positif dan hidrogen alfa yang terikat pada karbon alfa mudah lepas dan bersifat asam (Fessenden et al., 1986, pp. 441-442).

Uji aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri dari ekstrak alkaloid dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji *Escherichia coli* sebagai bakteri gram negatif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif menggunakan metode difusi cakram. Uji difusi cakram dapat dilakukan menggunakan pengukuran pada diameter zona bening yang terbentuk, yang menandakan bahwa terdapatnya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak (Intan et al., 2021). Pada metode difusi cakram, ekstrak



alkaloid pada kertas cakram akan berdifusi ke dalam media sehingga akan terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram. Mikroba uji yang digunakan diantaranya ialah *Escherichia coli* yang merupakan bakteri gram negatif dan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri gram positif. Bakteri uji yang digunakan harus disesuaikan dengan standar 0,5 McFarland atau setara dengan $1,510^8$ CFU/mL. Hal ini bertujuan agar jumlah sel bakteri patogen yang digunakan sama sehingga hasil uji aktivitas antibakteri dapat dibandingkan. Hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak alkaloid bakteri *Pseudomonas hibiscicola* Wk disajikan pada Gambar 9.

Berdasarkan Gambar 9, dapat dilihat bahwa alkaloid bakteri *Pseudomonas hibiscicola* Wk lebih kuat menghambat bakteri uji *Staphylococcus aureus* daripada *Escherichia coli* dilihat dari diameter zona bening yang dihasilkan lebih besar. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak alkaloid ini lebih efektif menghambat bakteri uji gram positif daripada bakteri gram negatif. Hal ini terjadi disebabkan struktur dinding sel pada bakteri gram positif dan negatif yang berbeda.



Bakteri gram positif tersusun peptidoglikan sebanyak 50%, polisakarida (asam teikoat) dan lipid sebanyak 1-4%. Bakteri gram negatif sendiri memiliki susunan peptidoglikan hanya 10% dan lipid 11-22% (Pelczar & Chan, 2006).

Bakteri gram positif akan bersifat lebih polar karena mengandung asam teikoat yang merupakan salah satu polimer yang larut dalam air (Karlina *et al.*, 2013). Senyawa alkaloid yang merupakan senyawa semipolar akan lebih mudah larut dalam pelarut polar menyebabkan alkaloid lebih mudah menembus lapisan yang sifatnya lebih polar. Berbeda dengan bakteri gram negatif yang lapisan paling luarnya adalah lipid yang sifatnya nonpolar sehingga sulit ditembus oleh alkaloid. Lapisan terluar dari bakteri negatif memiliki permeabilitas yang tinggi sehingga senyawa seperti alkaloid tidak bisa masuk ke dalam sel sehingga bakteri tidak terganggu pertumbuhannya.

SIMPULAN

Senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* W1 memiliki nilai Rf sebesar 0,8125 yang mirip dengan nilai Rf alkaloid dari tanaman tapak dara yaitu vindoline (Rf = 0,85). Senyawa alkaloid dari bakteri endofit *Pseudomonas hibiscicola* Wk memiliki kadar total fenol tertinggi sebesar 2,390 mg ekuivalen asam galat/gram sampel yang menandakan bahwa senyawa alkaloid yang dihasilkan pada strukturnya terdapat gugus fenol. Senyawa alkaloid tersebut bersifat antioksidan dengan nilai IC₅₀ sebesar 99,70 mg/L, serta mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S. Aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Adawiah, A., & Muawanah, A. (2015). Aktivitas antioksidan dan kandungan komponen bioaktif sari buah Namnam. *Jurnal Kimia VALENSI*, 1(2), 130-136. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15408/jkv.v0i0.3155>.
- Anderson, D. G., Salm, S., Beins, M., & Nester, E. W. (2021). *Nester's microbiology: A human perspective* (10th ed.). McGraw-Hill. <https://doi.org/LK> - <https://worldcat.org/title/1261497925>.
- Ataei-Azimi, A., Hashemloian, B. D., Ebrahimzadeh, H., & Majd, A. (2008). High in vitro production of ant-canceric indole alkaloids from periwinkle (*Catharanthus roseus*) tissue culture. *African Journal of Biotechnology*, 7(16). <https://doi.org/10.4314/AJB.V7I16.59172>.
- Badarinath, A. V, Rao, K. M., Chetty, C. M. S., Ramkanth, S., Rajan, T. V. S., & Gnanaprakash, K. (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*, 2(2), 1276-1285. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2012.05.002>.
- Baerheim-Svendsen, A., & Verpoorte, R. (1983). Chapter 19 colchicine and related alkaloids *Journal of Chromatography Library*, 23(Part A), 469-476. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60919-7](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60919-7).
- Bandonienè, D., Murkovic, M., Pfannhauser, W., Venskutonis, P., & Gruzdienè, D. (2002). Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. *European Food Research and Technology*, 214, 143-147. <https://doi.org/10.1007/s00217-001-0430-9>.
- Barrales-Cureño, H. J., Reyes, C. R., García, I. V., & Valdez, L. G. L. (2019). Alkaloids of pharmacological importance in *Catharanthus roseus*. Dalam J. Kurek (Ed.), *Alkaloids*

- *Their importance in nature and human life*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82006>.
- Bhore, S. J., Ravichantar, N., & Loh, C. Y. (2010). Screening of endophytic bacteria isolated from leaves of Sambung Nyawa [*Gynura prostrata* (Lour.) Merr.] for cytokinin-like compounds. *Bioinformation*, 5(5), 191. <https://doi.org/10.6026/97320630005191>.
- Cowan, M. K., & Smith, H. (2021). *Microbiology: A systems approach (6th ed.)*. McGraw Hill. <https://doi.org/v9781260451290>.
- Dwidjoseputro. (1998). *Dasar-dasar mikrobiologi*. <https://doi.org/IOS2779.slims-29602>.
- Fessenden, R. J., & Fessenden, J. S. (1986). *Kimia organik dasar edisi ketiga (Jilid I)*. (Terj: A. H. Pudjaatmaka). Erlangga. <https://doi.org/10.3390/molecules15085445>.
- Forestryana, D., & Arnida. (2020). Phytochemical screenings and thin layer chromatography analysis of ethanol extract jeruju leaf (*Hydrolea spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.52434/jfb.v11i2.859>.
- Gandjar, I. G., & Rohman, A. (2007). *Kimia farmasi analisis*. Pustaka Pelajar.
- Gunawan, G., Chikmawati, T., Sobir, S., & Sulistijorini, S. (2016). Review: Fitokimia genus *Baccaurea* spp. *Bioeksperimen*, 2(2), 96-110. <https://doi.org/10.23917/bioeksperimen.v2i2.2488>.
- Handoyo, D. L. Y. (2020). Pengaruh lama waktu maserasi (Perendaman) Terhadap kekentalan ekstrak daun sirih (*Piper betle*). *Jurnal Farmasi Tinctura*, 2(1), 34-41. <https://doi.org/10.35316/tinctura.v2i1.1546>.
- Hapsari, A. M., Masfria, M., & Dalimunthe, A. (2018). Pengujian kandungan total fenol ekstrak etanol tempuyung (*Shoncus arvensis* L.). *Talenta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*, 1(1), 284-290. <https://doi.org/https://doi.org/10.32734/tm.v1i1.75>.
- Intan, K., Diani, A., & Nurul, A. S. R. (2021). Aktivitas antibakteri kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *JURNAL KESEHATAN PERINTIS (Perintis's Health Journal)*, 8(2), 121-127. <https://doi.org/10.33653/jkp.v8i2.679>.
- Illing, I., Safitri, W., & Erfiana, E. (2017). Uji fitokimia ekstrak buah dengen. *Dinamika*, 8(1), 66-84.
- Irianto, K. (2012). *Mikrobiologi menguak dunia mikroorganisme*, Yrama Wigya.
- Istiqomah. (2013). *Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap kadar piperin buah cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)* (Skripsi, UIN Syarif Hidayatullah).
- Julkunen-Tiitto, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of northern willows: Methods for the analysis of certain phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(2), 213-217. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/jf00062a013>.
- Karlina, C. Y., Ibrahim, M., & Trimulyono, G. (2013). Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Lentera Bio*, 2(1), 87-93.
- Li, D.-L., Li, X.-M., Proksch, P., & Wang, B.-G. (2010). 7-O-Methylvariecolortide A, a new spirocyclic diketopiperazine alkaloid from a marine mangrove derived endophytic fungus, *Eurotium rubrum*. *Natural Product Communications*, 5(10). <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/1934578X1000501014>.
- Maesaroh, K., Kurnia, D., & Al Anshori, J. (2018). Perbandingan metode uji aktivitas antioksidan DPPH, FRAP dan FIC terhadap asam askorbat, asam galat dan kuersetin. *Chimica et Natura Acta*, 6(2), 93-100. <https://doi.org/10.24198/cna.v6.n2.19049>.

- Magagula, N. L., Mohanlall, V., & Odhav, B. (2012). Optimized thin layer chromatographic method for screening pharmaceutically valuable alkaloids of *Catharanthus roseus* (Madagascar Periwinkle). *International Journal of Sciences*, 2012(12). <https://ssrn.com/abstract=572091>.
- Maryam, S. (2015). Kadar antioksidan dan IC50 Tempe kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L) yang difermentasi dengan la^{ma} fermentasi berbeda. *Prosiding Seminar Nasional MIPA* (pp. 347-352).
- Maulana, M. (2018). *Profil kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak daun bidara Arab (Ziziphus spina-cristi. L) berdasarkan variasi pelarut* (Thesis tidak diterbitkan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim).
- Michalak, M. (2023). Plant extracts as skin care and therapeutic agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(20), 15444. <https://doi.org/10.3390/ijms242015444>.
- Pavlov, A., Kovatcheva, P., Georgiev, V., Koleva, I., & Ilieva, M. (2002). Biosynthesis and radical scavenging activity of betalains during the cultivation of red beet (*Beta vulgaris*) hairy root cultures. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 57(7-8), 640-644. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-7-816>.
- Pelczar, M. J., & Chan, E. C. S. (2006). *Dasar-dasar mikrobiologi*. UI Press. <https://doi.org/IOS4868.ai:slims-2731>
- Purba, N., & Putri, N. (2022). Test of antibacterial activity from the combination of ethanol extract of waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) leaves and leaf red pucuk (*Syzygium oleana*) against *Salmonella thypi* on 2021. *JURNAL FARMASIMED (JFM)*, 4(2), 44-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.35451/jfm.v4i2.1009>.
- Purwestri, Y. A. (2021). Kemampuan antibakteri metabolit sekunder bakteri endofit tanaman Purwoceng terhadap *Escherechia coli*. *Jurnal Ilmu Hayat*, 5(1), 17-24. <http://dx.doi.org/10.17977/um061v5i12021p17-24>.
- Rahmi, R., Herawati, N., & Dini, I. (2016). Isolasi dan identifikasi senyawa metabolit sekunder ekstrak etil asetat kulit batang belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn). *Jurnal Ilmiah Kimia Dan Pendidikan Kimia*, 17(1), 98-107. <https://doi.org/doi.org/10.24114/jpkim.v14i2.33706>.
- Robinson, T. (1991). *The organic constituents of higher plants: Their chemistry and interrelationships*. Cordus Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ed040pA983>.
- Saiman, M. Z., Miettinen, K., Mustafa, N. R., Choi, Y. H., Verpoorte, R., & Schulte, A. E. (2018). Metabolic alteration of *Catharanthus roseus* cell suspension cultures overexpressing geraniol synthase in the plastids or cytosol. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134(1), 41-5. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1398-5>.
- Sarjono, P. R., Anggraeni, A., Monita, A., Asy'ari, M., Ismiyanto, I., Ngadiwiyana, N., & Prasetya, N. (2022). Antibacterial and antioxidant activity of endophytic bacteria isolated from *Hibiscus tiliaceus* leaves. *Jurnal Kimia Valensi*, 8, 199-210. <https://doi.org/10.15408/jkv.v8i2.25686>.
- Sarjono, P. R., Solekhah, P. S., Iskandarsyah, M. R., Asy'ari, M., Ismiyanto, Ngadiwiyana, Basid, N., Prasetya, A., & Andriani, Y. (2023). Antibacteria and Antioxidant Activity of Endophytic Bacteria Isolated from *Hibiscus tiliaceus* Leaves with zobell as Growth Media. *AIP Conference Proceedings*, 1-11. <https://doi.org/https://doi.org/10.1063/5.0140270>.
- Sholekhah, P. S. (2021). *Isolasi dan aktivitas antioksidan metabolit dari bakteri endofit daun Waru (Hibiscus tiliaceus)* (Skripsi, Universitas Diponegoro).

- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
- Sirivibulkovit, K., Nouanthavong, S., & Sameenoi, Y. (2018). Based DPPH assay for antioxidant activity analysis. *Analytical Sciences*, 34(7), 795-800. <https://doi.org/10.2116/analsci.18P014>
- Sugijanto, N. E. (2011). *Produksi bahan bioaktif berkhasiat obat menggunakan jamur endofit* (pp. 5-31). Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP).
- Surahmaida, S., Rachmawati, A., & Handayani, E. (2020). Kandungan senyawa kimia daun waru (*Hibiscus Tiliaceus*) di Kawasan Lingkar Timur Sidoarjo. *Journal Pharmasci*, 5(2), 39-42. <https://doi.org/10.53342/pharmasci.v5i2.167>.
- Suswanti, E. Y. (2021). *Isolasi dan Uji aktivitas antioksidan senyawa alkaloid bakteri endofit Pseudomonas azotoformans DP-1* (Skripsi, Universitas Diponegoro).
- Tiong, S. H., Looi, C. Y., Hazni, H., Arya, A., Paydar, M., Wong, W. F., Cheah, S.-C., Mustafa, M. R., & Awang, K. (2013). Antidiabetic and antioxidant properties of alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Molecules*, 18(8), 9770-9784. <https://doi.org/10.3390/molecules18089770>.
- Večeřa, M., & Gasparič, J. (1971). *Detection and identification of organic compound (1st ed.)*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-1833-0>.
- Wullur, A. C., Schaduw, J., & Wardhani, A. N. K. (2012). Identifikasi alkaloid pada daun sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Ilmiah Farmasi (JIF)*, 3(2), 54-56.
- Yoga, I. B. K. W. (2015). Penentuan konsentrasi optimum kurva standar antioksidan; asam galat, asam askorbat dan trolox® terhadap radikal bebas DPPH (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 0, 1 mM. *Prosiding Seminar Nasional MIPA*.