



## QUALITATIVE PROFILING OF ANTIMALARIAL COMPOUNDS FROM ENDOPHYTIC FUNGI ASSOCIATED WITH *Rhizophora mucronata*

Usep Suhendar<sup>1)\*</sup>, Rieskha fawziah<sup>1)</sup>, Bina Lohita Sari<sup>1)</sup>, Sata Yoshida Srie Rahayu<sup>2)</sup>, Lilik Sulastr<sup>1)</sup>, Ratna Wulandari<sup>1)</sup>, Dede Anisa<sup>1)</sup>, Raisa Namira<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor, 16134, Indonesia

<sup>2)</sup>Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor, 16134, Indonesia

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 Feb 2025,

Revised 28 Aug 2025,

Accepted 29 Aug 2025,

Available online 17 Sep 2025

#### Keywords:

- ✓ Antimalarial;
- ✓ Endophytic Fungi;
- ✓ Mangrove Roots;
- ✓ *Rhizophora mucronata*;
- ✓ TLC

\*corresponding author:

[usep.suhendar@unpak.ac.id](mailto:usep.suhendar@unpak.ac.id)

[https://doi.org/10.31938/jsn.v](https://doi.org/10.31938/jsn.v15i3.816)

[15i3.816](https://doi.org/10.31938/jsn.v15i3.816)

### ABSTRACT

*Malaria remains one of the deadliest infectious diseases worldwide, underscoring the urgent need for novel antimalarial sources. Endophytic fungi associated with mangrove roots of *Rhizophora mucronata* represent promising candidates, as they are capable of synthesizing secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, and terpenoids with known antiplasmodial activity. This study aimed to qualitatively identify antimalarial bioactive compounds from endophytic fungal extracts previously exhibiting the highest heme polymerization–inhibition activity. Fungal isolates were fermented in liquid medium for 21 days and extracted with ethyl acetate. The extracts were profiled by Thin-Layer Chromatography (TLC) using two solvent systems: *n*-hexane : ethyl acetate (5:1) and dichloromethane : methanol (10:1). Band visualization was performed under UV light (254 nm and 366 nm) and with semi-specific reagents (Dragendorff and citro-boric), followed by *R<sub>f</sub>* value comparison. TLC analysis revealed blue-green fluorescent bands corresponding to flavonoids and brown-orange bands indicative of alkaloids, with optimal *R<sub>f</sub>* values of 0.46 (*n*-hexane : ethyl acetate) and 0.54 (dichloromethane : methanol). These findings confirm the presence of key antimalarial compound classes in the endophytic fungal extract, supporting its potential as a coastal bioresource for drug discovery and development.*

### ABSTRAK

#### Identifikasi Kualitatif Senyawa Antimalaria dari Cendawan Endofit Akar Mangrove *Rhizophora mucronata*

Malaria masih menjadi salah satu penyakit menular dengan angka mortalitas tinggi di dunia, sehingga pencarian sumber antimalaria baru sangat mendesak. Cendawan endofit yang berasosiasi dengan akar mangrove *Rhizophora mucronata* dipandang potensial karena mampu mensintesis metabolit sekunder alkaloid, flavonoid, dan terpenoid yang diketahui memiliki aktivitas antiplasmodial. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi secara kualitatif senyawa bioaktif antimalaria dari ekstrak cendawan endofit akar mangrove yang sebelumnya menunjukkan aktivitas penghambatan polimerisasi hem tertinggi pada uji pendahuluan. Isolat endofit difermentasi dalam medium cair selama 21 hari, kemudian diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Profil kimia ekstrak disaring melalui Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan dua sistem eluen: *n*-heksana:etil asetat (5 : 1) dan diklorometana : metanol (10:1). Deteksi pita dilakukan menggunakan sinar UV (254 nm dan 366 nm), serta pereaksi spesifik (Dragendorff dan sitro-borik), diikuti perbandingan nilai *R<sub>f</sub>*. Hasil KLT menunjukkan munculnya pita berpendar biru kehijauan (flavonoid) dan cokelat-oranye (alkaloid) dengan nilai *R<sub>f</sub>* optimum pada eluen *n*-heksana:etil asetat (0,46) dan diklorometana: metanol (0,54). Temuan ini mengindikasikan keberadaan dua kelas senyawa kunci antimalaria dalam ekstrak cendawan endofit akar mangrove, sehingga mendukung potensi pengembangan kandidat obat berbasis sumber hayati pesisir.

Kata kunci: Antimalaria; Cendawan Endofit; Akar Mangrove; *Rhizophora mucronata*; KLT

### PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit tropis yang masih menyumbang angka mortalitas tinggi

di dunia. Orga nisme penyebab utamanya adalah parasit *Plasmodium*, terutama *P. falciparum* dan *P. vivax*, yang ditularkan melalui gigitan nyamuk Anopheles betina. Menurut *World Health*



*Organization* (WHO), pada tahun 2023 tercatat sekitar 263 juta kasus malaria dengan ratusan ribu kematian yang tersebar di 83 negara, terutama di kawasan Afrika Sub-Sahara, Asia Tenggara, dan Amerika Latin (WHO, 2023). Di Indonesia, meskipun angka insidens menunjukkan tren penurunan, beban penyakitnya masih tergolong tinggi. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia melaporkan sebanyak 418.546 kasus malaria sepanjang tahun 2023 dan 350.478 kasus hingga awal tahun 2024 (Kemenkes RI, 2024). Data ini menunjukkan bahwa malaria tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang signifikan, tidak hanya karena tingginya morbiditas dan mortalitas, tetapi juga karena dampaknya terhadap produktivitas ekonomi, beban pelayanan kesehatan, dan kualitas hidup masyarakat di daerah endemis. Oleh karena itu, upaya pengendalian yang berkelanjutan, termasuk deteksi dini, pengobatan efektif, serta pengembangan strategi pencegahan berbasis bukti ilmiah, sangat diperlukan dalam mendukung eliminasi malaria secara global maupun nasional.

Keberhasilan pengendalian malaria terhambat oleh munculnya resistensi parasit terhadap obat-obat lini utama, misalnya klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin (Marhamah & Husna, 2019). Resistensi ini semakin meluas dan telah dilaporkan terjadi di berbagai wilayah endemis, termasuk Asia Tenggara dan Afrika Sub-Sahara, yang menjadi tantangan besar dalam pengobatan dan pengendalian penyakit ini secara global (WHO, 2023). Mutasi pada gen *Pfcr*, *Pfmdr1*, dan *dhfr/dhps* yang berkaitan dengan resistensi terhadap klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin telah dikonfirmasi secara molekuler, menunjukkan bahwa tekanan seleksi dari penggunaan obat antimalaria secara luas telah menyebabkan evolusi cepat dari strain yang resisten (Ashley et al., 2014; Menard & Dondorp, 2017).

Kondisi ini mendorong penelusuran sumber antimalaria baru, khususnya dari produk alam. Pemanfaatan tanaman obat tradisional di wilayah tropis kian berkembang karena dianggap lebih aman untuk penggunaan jangka panjang dibandingkan obat sintetis (Newman & Cragg, 2016). Beberapa senyawa aktif dari tanaman seperti *Artemisia annua* (penghasil artemisinin), *Azadirachta indica*, dan *Curcuma longa* telah menunjukkan aktivitas antiplasmodial yang signifikan melalui mekanisme yang beragam, seperti penghambatan metabolisme heme, stres oksidatif pada parasit, serta gangguan pada siklus hidup *Plasmodium* (Silva et al., 2024). Penelitian

bioaktivitas ekstrak dan fraksi tanaman lokal juga menunjukkan potensi antimalaria yang menjanjikan, yang belum banyak dieksplorasi secara sistematis, sehingga membuka peluang besar untuk riset penemuan obat baru berbasis keanekaragaman hayati lokal (Widyawaruyanti et al., 2020; Utami et al., 2022). Salah satu sumber hayati potensial adalah tanaman mangrove. Selain berperan melindungi ekosistem pesisir, bagian-bagian mangrove, akar, kulit batang, dan daun mengandung alkaloid, tanin, fenolat, klorofil, serta karotenoid yang berpotensi sebagai antibakteri, antioksidan, antimalaria, antikanker, dan antivirus (Ridlo et al., 2017). Namun eksploitasi langsung tanaman sering terkendala ketersediaan bahan dan perlindungan ekosistem.

Pendekatan alternatif yang menjanjikan adalah memanfaatkan cendawan endofit, mikroorganisme yang bersimbiosis secara mutualistik dalam jaringan tanaman dan mampu mensintesis metabolit sekunder yang serupa atau bahkan identik dengan senyawa dari inang tanaman mereka (Rohmawati & Harahap, 2017; Singh et al., 2021). Cendawan endofit diketahui menghasilkan beragam senyawa bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, lignan, kumarin, glikosida, kuinon, dan steroid, yang memiliki aktivitas antimikroba, antioksidan, antikanker, dan antiparasit (Toppo et al., 2024). Seperti pada *Fusarium* sp., endofit dari tanaman jahe (*Zingiber officinale*) menghasilkan senyawa antibakteri Dantron (Sharma et al., 2020), sementara *Cladosporium* sp. dari daun jambu biji (*Psidium guajava*) memproduksi asam protokatekuat dan asam asterrik yang diketahui bersifat antioksidan dan imunomodulator (Ujam et al., 2020). Temuan-temuan ini memperkuat prospek cendawan endofit sebagai pabrik alami senyawa bioaktif yang berpotensi dikembangkan menjadi agen terapeutik baru, termasuk antimalaria.

Penelitian sebelumnya telah mengungkapkan potensi antimalaria yang signifikan dari tanaman mangrove dan cendawan endofit yang hidup di dalamnya. Ekstrak ranting *Sonneratia alba* diketahui mengandung senyawa 2,6-dimethoxy-p-benzoquinone yang mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara in vitro dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 3,08 µg/mL (Chaiyadej et al., 2004). Calcul et al. (2013) melaporkan bahwa senyawa dicerandol D yang diisolasi dari cendawan endofit mangrove menunjukkan aktivitas antiplasmodial yang sangat kuat terhadap *P. falciparum* dengan kisaran efektivitas pada tingkat nanomolar. Penelitian in vivo oleh Muhaimin et al. (2019) juga

memperlihatkan bahwa fraksi bioaktif dari *S. alba* mampu menurunkan tingkat parasitemia hingga 97,5% pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*, menunjukkan efektivitas terapeutik yang tinggi. Selain itu, ekstrak kloroform dari *Rhizophora mucronata*, yang mengandung senyawa triterpenoid seperti lupeol dan betulin, dilaporkan memiliki aktivitas antiplasmodial dengan IC<sub>50</sub> sebesar 4,62 µg/mL terhadap *P. falciparum* strain 3D7 (Hridya et al., 2021). Penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa cendawan endofit dari ekosistem mangrove, seperti *Penicillium* sp., *Phoma* sp., dan *Aspergillus* sp., dapat menghasilkan senyawa unik seperti poliketida, depsipeptida, dan alkaloid siklik yang menunjukkan aktivitas penghambatan parasit malaria dalam berbagai model uji in vitro (Li et al., 2023). Keragaman senyawa dan mekanisme kerja dari metabolit cendawan endofit ini memberikan peluang besar dalam pengembangan obat antimalaria baru yang mampu mengatasi resistensi terhadap terapi konvensional.

Berdasarkan fakta di atas, mangrove khususnya *R. mucronata* dan cendawan endofitnya menjadi kandidat unggul untuk penemuan senyawa antimalaria baru. Ekosistem mangrove yang unik dengan kondisi lingkungan yang ekstrem memicu cendawan endofitnya untuk menghasilkan metabolit sekunder dengan struktur kimia dan aktivitas biologis yang khas, termasuk aktivitas antiplasmodial yang potensial (Kathiresan & Bingham, 2001). Penelitian oleh Hridya et al. (2021) melaporkan bahwa ekstrak kloroform dari akar *R. mucronata* memiliki aktivitas antiplasmodial dengan nilai IC<sub>50</sub> sebesar 4,62 µg/mL terhadap *Plasmodium falciparum* strain 3D7, dan fraksi bioaktif yang mengandung senyawa lupeol serta betulin memberikan efek toksisitas rendah pada sel mamalia, menunjukkan potensi terapeutik yang menjanjikan. Selain itu, isolasi cendawan endofit dari akar *R. mucronata* mengungkapkan keberadaan berbagai genus seperti *Fusarium*, *Aspergillus*, dan *Penicillium*, yang dikenal mampu mensintesis senyawa antimalaria seperti poliketida dan alkaloid (Singh et al., 2021; Artasasta et al., 2025).

Penelitian ini difokuskan pada identifikasi kualitatif metabolit antiplasmodial dari cendawan endofit akar *R. apiculata* guna mendukung pengembangan obat berbasis sumber hayati pesisir yang berkelanjutan. Pendekatan ini diharapkan dapat memperluas pemahaman tentang profil metabolit bioaktif dan mekanisme antimalaria yang dihasilkan oleh endofit

mangrove, sekaligus membuka peluang pemanfaatan sumber daya alam pesisir secara lestari melalui bioprospeksi yang bertanggung jawab. Dengan demikian, penelitian ini tidak hanya berkontribusi pada ilmu pengetahuan dan teknologi obat antimalaria, tetapi juga pada konservasi dan pemberdayaan ekosistem mangrove sebagai sumber biomolekul bernilai tinggi.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat cendawan endofit akar mangrove (*Rhizophora mucronata*), diklorometana, etil asetat p.a (Supelco®), kloramfenikol, media PDA (*Potato Dextrosa Agar*) (Himedia®), media PDB (*Potato Dextrose Broth*) (Himedia®), metanol, n-heksana, pelat KLT silika GF254 Merck. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat gelas (beaker glass, corong pisah, erlenmeyer, gelas ukur), autoklaf (Himaraya®), bunsen, cawan petri plastik (Onemed®), chamber KLT, gunting, *hot plate* (Thermo Scientific®), jarum ose, kaca arloji, kapas pembalut (Sari Bunga®), kasa steril (Kasa Husada®), kertas saring (Whatman®), *magnetic stirrer*, oven, pipa kapiler, penggaris, plastik wrap, *rotary evaporator* (Ika Rv 8 V®), spatel, timbangan analitik (LabPro®), dan UV Cabinet (Camag UV®).

### Metode

#### *Kultur Isolat Cendawan Endofit dan Karakterisasi*

Isolat cendawan endofit akar mangrove diinokulasikan ke dalam cawan petri plastik yang berisi media PDA sebanyak 10-15 mL, diinkubasi selama lima hingga tujuh hari di oven dengan suhu 28-30 °C. Isolasi cendawan endofit akar mangrove dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan cendawan endofit secara makroskopis dilakukan berdasarkan kriteria warna, bentuk permukaan, dan penyebaran koloni. Pengamatan secara mikroskopis mengacu Suryani et al. (2020) yang dilakukan berdasarkan bentuk konidiofor (bercabang atau tidak), fialid dan konidia (bulat, lonjong, ellips atau memanjang), serta warna konidia (terang, hijau pucat, gelap, hitam atau kecoklatan). Identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan pembuatan preparat miselium cendawan endofit. Preparat diidentifikasi dengan

menggunakan mikroskop binokuler pada perbesaran 100x (Dawolo et al., 2017).

### **Fermentasi Isolat Cendawan Endofit**

Proses fermentasi menggunakan isolat cendawan endofit yang dilakukan di atas *rotary shaker* pada kecepatan 120 rpm selama 21 hari. Isolat cendawan endofit yang telah dibiakan selama tujuh hari, diambil miselium cendawan dengan menggunakan ose steril untuk difermentasi dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dengan volume media sebanyak 5 mL, dan diinkubasi selama tujuh hari pada suhu 28-30°C. Kemudian, media tersebut difermentasi kembali pada hari ketujuh, dengan cara memindahkan 5 mL media berisi isolat yang telah ditumbuhkan ke dalam media PDB baru hingga mencapai 50 mL, lalu diinkubasi kembali selama tujuh hari dengan suhu yang sama. Pada hari ke-14, media yang berisi isolat dipindahkan kembali ke dalam media PDB baru hingga mencapai 500 mL, lalu diinkubasi selama tujuh hari dengan suhu yang sama (Septiana et al., 2017; Suhendar et al., 2024).

### **Ekstraksi Senyawa dari Isolat Cendawan Endofit**

Filtrat yang didapatkan diekstraksi dengan metode ekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1:1 pada corong pisah sebanyak tiga kali. Sedangkan, biomassa dikeringkan di dalam oven pada suhu 50°C selama 24 jam. Biomassa yang telah kering diekstraksi menggunakan etil asetat pada tabung kaca sebanyak tiga kali. Ekstrak filtrat dan biomassa masing-masing dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga menjadi ekstrak pekat (Septiana et al., 2017).

### **Analisis Kromatografi Lapis Tipis**

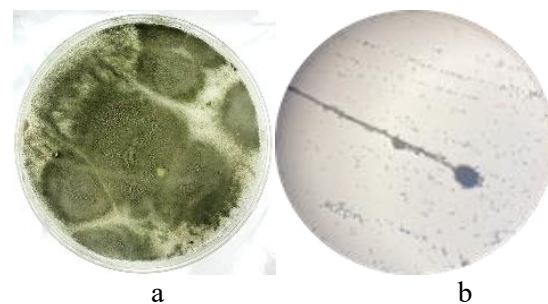
Pengujian dilakukan dengan optimasi eluen. Eluen yang digunakan adalah *n*-heksana:etil asetat dengan perbandingan 9:1; 5:1; dan diklorometana:metanol yaitu 10:1; 2:1. Pelat KLT dengan ukuran 8×2 cm diaktivasi dengan cara dipanaskan menggunakan oven pada suhu 110°C selama 10 menit. Ekstrak pekat cendawan endofit ditimbang sebanyak 200 mg, dilarutkan dalam metanol. Ekstrak etil asetat cendawan endofit akar mangrove ditotol pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah pelat menggunakan pipa kapiler. Kemudian, pelat KLT dimasukkan ke dalam *chamber* yang berisi eluen yang telah dijenuhkan. Proses ini akan menyebabkan eluen merambat naik pada lempeng tipis, sehingga akan terjadi pemisahan. Pola yang terbentuk diamati di bawah

sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, disemprot menggunakan reagen semprot sebagai pembangkit warna dan hitung nilai Rf (Pratiwi et al., 2023).

## **HASIL DAN PEMBAHASAN**

### **Morfologi Isolat Cendawan Endofit**

Isolat cendawan endofit dilakukan peremajaan dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) selama tujuh hari, dengan tujuan untuk memperoleh isolat yang masih aktif, segar, dan berada pada fase pertumbuhan optimal. Proses ini penting agar cendawan memiliki vitalitas tinggi, sebelum dilakukan tahap fermentasi dan ekstraksi metabolit. Peremajaan isolat merupakan langkah krusial dalam kultur mikroorganisme, khususnya untuk menjaga kemurnian dan daya tumbuh cendawan endofit. Media PDA dipilih karena kaya akan nutrisi yang mendukung pertumbuhan jamur secara optimal. Dalam waktu tujuh hari, cendawan umumnya mencapai fase eksponensial, dan aktivitas metabolisme sekunder mulai terbentuk. Penggunaan isolat yang segar juga dapat meningkatkan konsistensi hasil pada tahap produksi metabolit sekunder, mengingat kualitas dan kuantitas senyawa bioaktif sangat dipengaruhi oleh kondisi fisiologis cendawan saat awal proses fermentasi (*Figure 1*).



**Figure 1.** Macroscopic and Microscopic Isolation of Endophytic Fungi with 100x magnification. Description a. Upper part of endophytic fungi b. Image taken under a microscope.

Setelah proses peremajaan, isolat cendawan endofit ditanam kembali pada media PDA menggunakan metode zig-zag. Metode ini dipilih karena lebih praktis dan efisien dalam distribusi inokulum, serta mampu mempercepat pertumbuhan cendawan secara merata di seluruh permukaan media, dibandingkan dengan metode tuang yang memerlukan sterilisasi tambahan dan lebih banyak waktu. Pemilihan metode zig-zag

dalam inokulasi bertujuan untuk memperluas area kontak antara cendawan dan medium nutrisi, sehingga memungkinkan koloni tumbuh lebih cepat dan seragam. Setelah inkubasi tujuh hari, koloni cendawan endofit menunjukkan ciri morfologi khas. Secara makroskopis, koloni yang terbentuk berwarna hijau keabu-abuan dengan tepi yang lebih terang, menunjukkan karakter pertumbuhan yang padat dan konsisten. Warna bagian bawah media yang lebih gelap menunjukkan aktivitas metabolisme yang tinggi di area tersebut.

Pengamatan mikroskopis pada perbesaran 100x menunjukkan struktur konidia yang bulat hingga semi bulat, berdinding halus, serta konidiofor berdinding tebal dengan vesikel dan fialid yang jelas. Ciri-ciri ini sesuai dengan deskripsi morfologi genus *Aspergillus* sebagaimana dijelaskan oleh Suryani et al. (2020), sehingga isolat diperkirakan termasuk dalam kelompok *Aspergillus* sp. *Aspergillus* sp. memiliki spora kehitaman yang akan semakin pekat warnanya jika semakin tua umur koloninya (Putra et al., 2020). Berdasarkan hasil penelitian Bunbamrung et al. (2020), *Aspergillus terreus* BCC51799 memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antimalaria, dan antikolinesterase. Hasil penelitian lain juga mengungkapkan *Aspergillus* sp. memiliki potensi sebagai antimalaria (Artasata et al., 2025). Identifikasi awal ini sangat penting sebagai dasar untuk memahami kemampuan biosintetik cendawan tersebut dalam menghasilkan senyawa bioaktif yang diinginkan, seperti senyawa antimalaria. Peremajaan isolat dan karakterisasi awal morfologis tidak hanya berfungsi sebagai langkah teknis dalam kultur mikroorganisme, tetapi juga memiliki implikasi penting terhadap keberhasilan proses fermentasi dan produksi metabolit sekunder. Fakta bahwa isolat menunjukkan ciri morfologi *Aspergillus* sp. memperkuat dugaan bahwa cendawan ini berpotensi menghasilkan senyawa antimalaria, sehingga mendukung tujuan penelitian untuk mengeksplorasi cendawan endofit mangrove sebagai sumber biomolekul baru dalam pengembangan obat.

### Hasil Fermentasi Isolat Cendawan Endofit

Fermentasi merupakan metode bioteknologi yang umum digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dari mikroorganisme, termasuk cendawan endofit. Metabolit sekunder ini bersifat spesifik dan dapat dihasilkan dalam jumlah besar dengan kondisi lingkungan dan media yang dikontrol. Proses ini memanfaatkan

kemampuan alami mikroorganisme untuk mensintesis senyawa bioaktif selama masa pertumbuhannya (Mahfur et al., 2023). Proses fermentasi dibagi menjadi dua tipe utama, yaitu fermentasi padat (*Solid-State Fermentation* / SSF) dan fermentasi terendam (*Submerged Fermentation*/SmF). Perbedaan mendasar dari kedua jenis fermentasi ini terletak pada kandungan kadar air substrat. Pada fermentasi padat, mikroorganisme tumbuh di atas substrat padat dengan kadar air rendah, biasanya tanpa adanya fase cair bebas. Sebaliknya, pada fermentasi terendam, mikroorganisme tumbuh dalam medium cair yang memiliki kadar air tinggi (Christo & Sutedja, 2024). Fermentasi padat umumnya digunakan untuk mikroorganisme yang tumbuh secara alami pada lingkungan kering atau semi-kering, dan lebih hemat biaya karena tidak memerlukan aerasi serta lebih minim limbah cair. Namun, kontrol suhu dan distribusi nutrisi dalam SSF lebih sulit. Sementara itu, fermentasi terendam (yang digunakan dalam penelitian ini) lebih cocok untuk produksi skala besar karena lebih mudah dikontrol, homogen, dan efisien dalam ekstraksi produk metabolit sekunder dari medium cair (*Figure 2*).



**Figure 2.** Fermentation Results of Endophytic Fungal Isolates for 21 days.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa jenis fermentasi yang digunakan sangat memengaruhi jumlah dan jenis metabolit sekunder yang dihasilkan. Misalnya, penelitian oleh Gupta et al. (2021) menunjukkan bahwa *Penicillium* sp. menghasilkan konsentrasi senyawa antimikroba yang lebih tinggi dalam fermentasi terendam dibandingkan padat. Sementara itu, studi oleh Ranjan et al. (2020) mencatat bahwa SSF lebih efektif dalam produksi

enzim spesifik seperti amilase dan selulase. Hasil penelitian ini, fermentasi terendam selama 21 hari memungkinkan pertumbuhan optimal isolat cendawan endofit *Aspergillus* sp. serta menghasilkan ekstrak metabolit sekunder dalam jumlah cukup untuk analisis kualitatif menggunakan KLT. Hal ini menunjukkan bahwa metode SmF efektif dalam mendukung biosintesis senyawa bioaktif dari cendawan endofit akar mangrove.

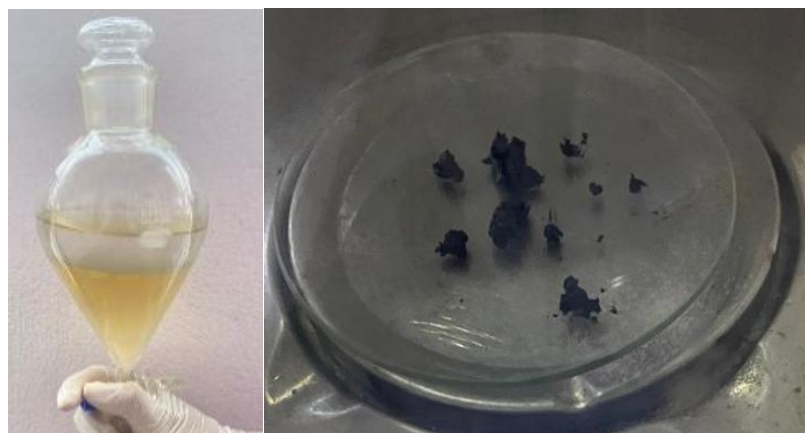
Proses fermentasi cendawan endofit dalam penelitian ini dilakukan menggunakan media cair (Submerged Fermentation/SmF), karena metode ini terbukti lebih efektif dalam menghasilkan biomassa dan metabolit sekunder dibandingkan media padat (Rohmawati & Harahap, 2017). Media cair memberikan kondisi lingkungan yang lebih homogen dan mendukung difusi nutrisi serta oksigen yang lebih baik ke seluruh bagian kultur, sehingga sangat mendukung pertumbuhan cendawan secara merata. Fermentasi dilakukan dalam volume total 3000 mL menggunakan media PDB, yang kaya akan nutrisi seperti karbohidrat dan protein, selama 21 hari inkubasi. Proses ini dijalankan menggunakan *shaker incubator* dengan suhu terkontrol 28°C dan kecepatan 120 rpm.

Penggunaan shaker sangat penting untuk menjaga homogenitas kultur dan mencegah pengendapan spora atau miselium di dasar wadah fermentasi. Gerakan dinamis ini memungkinkan seluruh bagian cendawan memperoleh akses yang merata terhadap oksigen dan nutrisi (Tumiwa et al., 2019). Tujuan dari kondisi fermentasi ini adalah menciptakan lingkungan yang optimal bagi aktivitas metabolisme cendawan, termasuk biosintesis senyawa bioaktif. Dengan menjaga homogenitas dan aerasi yang baik, maka produksi senyawa metabolit sekunder yang diharapkan

seperti alkaloid, flavonoid, atau terpenoid dapat berlangsung lebih maksimal dan terakumulasi dalam medium cair. Pada media padat, cendawan memang dapat tumbuh, tetapi distribusi nutrisi dan oksigen terbatas, serta sulit diekstraksi secara efisien. Selain itu, pemanenan biomassa dan senyawa target menjadi lebih rumit. Oleh karena itu, fermentasi dalam media cair menjadi pilihan ideal, terutama jika tujuan penelitian adalah analisis lebih lanjut terhadap senyawa aktif menggunakan metode seperti KLT atau spektroskopi. Hasil fermentasi berupa pertumbuhan biomassa cendawan dan perubahan warna media yang mengindikasikan aktivitas metabolik dapat dilihat pada *Figure 2*, yang memperlihatkan karakteristik visual dari kultur hasil fermentasi setelah 21 hari inkubasi.

### Hasil Ekstraksi Hasil Fermentasi

Setelah proses fermentasi selesai, langkah selanjutnya adalah proses ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction*) yang bertujuan untuk memisahkan dan mengisolasi senyawa bioaktif dari hasil fermentasi cendawan endofit akar mangrove. Ekstraksi ini penting untuk memindahkan senyawa target dari fase air (media fermentasi) ke dalam pelarut organik, sehingga dapat dikumpulkan dalam bentuk yang lebih murni untuk analisis lebih lanjut. Prinsip dasar ekstraksi cair-cair adalah pemisahan komponen berdasarkan perbedaan kelarutan senyawa dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, dalam hal ini air dan etil asetat. Etil asetat dipilih karena merupakan pelarut semi-polar yang efektif mengekstrak berbagai jenis metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid yang umumnya berada dalam fraksi organik (Suryanto, 2012).



*Figure 3. Separation process with ECC and the extract obtained*

Prosedur ekstraksi dilakukan dengan perbandingan 1:1 antara media fermentasi dan etil asetat, disertai pengocokan kuat sebanyak tiga kali untuk memaksimalkan transfer senyawa bioaktif dari fase air ke fase organik. Setelah proses pengocokan, fase organik (etil asetat) yang mengandung senyawa target dipisahkan dan dikumpulkan. Fase ini dikonsentrasi menggunakan *rotary evaporator* untuk menghilangkan pelarut dan mendapatkan ekstrak kental yang siap dianalisis. Hasil akhir dari proses ini menghasilkan ekstrak kering sebanyak 0,5 gram (Figure 3). Metode cair-cair dengan etil asetat terbukti efisien dalam berbagai penelitian untuk memperoleh senyawa metabolit dari media fermentasi cair. Jika dibandingkan dengan pelarut lain, seperti *n*-heksana (non-polar) atau metanol (polar tinggi), etil asetat memiliki keunggulan dalam mengekstraksi senyawa dengan polaritas menengah yang sering kali merupakan senyawa aktif biologis. Selain itu, etil asetat juga mudah diuapkan, sehingga mempermudah proses pemekatan ekstrak tanpa merusak senyawa bioaktif yang terkandung di dalamnya.

### Hasil Analisis Kualitatif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan metode kromatografi yang bekerja dengan prinsip pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan polaritas antara sampel dan pelarut fase gerak yang digunakan (Forestryana & Arnida, 2020). Teknik KLT dimanfaatkan untuk mengetahui jumlah komponen dalam suatu campuran, mengidentifikasi senyawa, serta memantau jalannya reaksi. Namun, fungsi utamanya adalah untuk mengevaluasi kemurnian dan mengidentifikasi suatu senyawa hasil isolasi melalui parameter berupa faktor retensi atau nilai  $R_f$  (Sarmadansyah et al., 2023). Dalam penelitian ini, analisis KLT terhadap ekstrak etil asetat dari cendawan endofit akar mangrove menggunakan berbagai kombinasi eluen menunjukkan variasi nilai  $R_f$  yang mencerminkan kompleksitas komponen senyawa bioaktif di dalam ekstrak. Pada sistem eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1), terdeteksi tiga noda dengan nilai  $R_f$  sebesar 0,116; 0,80; dan 0,93. Nilai  $R_f$  yang tinggi pada dua noda terakhir mengindikasikan senyawa dengan kelarutan tinggi dalam fase gerak yang sangat non-polar, namun rentang ini terlalu dekat dengan batas atas pelat KLT, sehingga kurang ideal untuk pemisahan dan analisis lanjutan. Kombinasi eluen *n*-heksana:etil asetat (5:1) menghasilkan dua noda dengan nilai  $R_f$  0,33 dan 0,53, sementara eluen

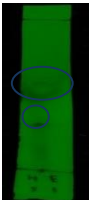
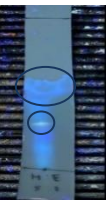

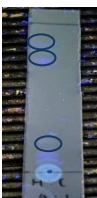

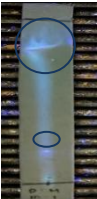
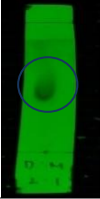

Diklorometana: metanol (10:1) menghasilkan dua noda dengan  $R_f$  0,23 dan 0,916. Sistem eluen ini dianggap lebih selektif dalam memisahkan senyawa-senyawa yang memiliki polaritas menengah, yang sangat sesuai untuk senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid dan alkaloid. Eluen Diklorometana:metanol (2:1) hanya menghasilkan satu noda ( $R_f = 0,42$ ), yang menunjukkan keterbatasan dalam daya pisah pelarut terhadap senyawa kompleks dalam ekstrak (Table 1).

Berdasarkan literatur, senyawa dengan nilai  $R_f$  antara 0,2–0,75 umumnya dikaitkan dengan flavonoid (Rahayu et al., 2015), sementara senyawa alkaloid memiliki kisaran  $R_f$  0,07–0,62 (Harborne, 1987). Dengan mengacu pada data tersebut, noda dengan  $R_f$  0,116; 0,23; 0,33; 0,42, dan 0,53 sangat mungkin merupakan senyawa flavonoid dan/atau alkaloid. Noda dengan  $R_f$  0,80 dan 0,93, meskipun menunjukkan adanya senyawa aktif, lebih sulit dikategorikan karena nilainya yang mendekati batas maksimum pelat, dan kemungkinan merepresentasikan senyawa non-polar atau produk degradasi. Deteksi noda pada panjang gelombang UV 254 nm dan 366 nm mengonfirmasi keberadaan gugus aromatik atau kromofor, yang merupakan ciri khas dari metabolit sekunder seperti flavonoid dan alkaloid. Pendaran biru kehijauan dan warna cokelat-oranye yang muncul setelah penyemprotan dengan pereagen spesifik memperkuat dugaan ini. Hasil penelitian ini konsisten dengan penelitian Usman et al. (2020), yang melaporkan nilai  $R_f$  senyawa flavonoid dari ekstrak cendawan endofit berkisar antara 0,3–0,6 menggunakan eluen semi-polar.

Pemilihan eluen yang tepat sangat menentukan keberhasilan deteksi senyawa bioaktif. Eluen *n*-heksana:etil asetat (5:1) dan diklorometana:metanol (10:1) terbukti lebih selektif dan efektif untuk skrining awal senyawa antimalaria dari cendawan endofit akar mangrove. Langkah selanjutnya dilakukan adalah isolasi lebih lanjut terhadap fraksi dengan nilai  $R_f$  optimal dan pengujian aktivitas biologis untuk mengonfirmasi potensinya sebagai kandidat obat. Analisis KLT terhadap ekstrak etil asetat cendawan endofit akar mangrove menggunakan berbagai eluen dengan beberapa perbandingan menunjukkan variasi nilai  $R_f$ . Pada eluen *n*-heksana:etil asetat (9:1), terdeteksi tiga noda dengan nilai  $R_f$  0,12; 0,80; dan 0,93. Penggunaan eluen *n*-heksana:etil asetat (5:1) menghasilkan dua noda dengan nilai  $R_f$  0,33 dan 0,53. Sementara itu, eluen  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :metanol (10:1)

menghasilkan dua noda dengan nilai Rf 0,23 dan 0,916. Eluen CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:metanol (2:1) menghasilkan satu noda dengan nilai Rf 0,42 (Table 1).

**Table 1.** TLC analysis results

Sampel	Perbandingan Eluen	UV 254	UV 366
Ekstrak Etil asetat cendawan endofit akar mangrove	n-heksana:etil asetat 5:1		
	n-heksana:etil asetat 9:1		
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : metanol 10:1		
	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : metanol 2:1		

Adapun Nilai Rf yang diperoleh pada penelitian ini dibandingkan dengan literatur menunjukkan bahwa senyawa dengan nilai RF antara 0,2 hingga 0,75 kemungkinan merupakan flavonoid (Rahayu et al., 2015), sedangkan alkaloid umumnya memiliki nilai Rf antara 0,07 hingga 0,62 (Putri et al., 2024; Harborne, 1987). Pada penelitian lain, identifikasi flavonoid dengan kromatografi lapis tipis (KLT) pada ekstrak etil asetat daun gedi (*Abelmoschus manihot* L.) menghasilkan nilai Rf bervariasi, antara lain 0,97 (etanol:n-heksana 2:8), 0,93 (etanol), 0,025 (*n*-heksana), 0,96 (etanol:n-heksana 4:6), dan 0,95 (etanol:etil asetat:n-heksana 2:2:6). Pada ekstrak etanol akar bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk.), diperoleh nilai Rf=0,80 (etil asetat:metanol 3:2) dan Rf=0,75 (*n*-butanol:asam asetat:air 4:1:5). Daun kerahu (*Callicarpa longifolia* Lam.) menunjukkan nilai

Rf=0,92 (*n*-heksana:etil asetat 1:1), 0,87 (kloroform:etil asetat 6:4), 0,50 (*n*-heksana:aseton 1:1), dan 0,30 (kloroform 100%). Sementara itu, flavonoid dari daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) memiliki nilai Rf = 0,6 dengan eluen *n*-heksana:etil asetat (7:3) (Theodora et al., 2019; Natasa et al., 2021; Putri et al., 2024). Pada penelitian Daniswari et al. (2023) dengan pada ekstrak etanol daun sirih hijau (*Piper betle* L.) menggunakan eluen *n*-heksana:etil asetat (7:3) mampu memisahkan banyak noda dan terdapat noda yang menunjukkan adanya senyawa alkaloid. Dengan demikian, noda yang dihasilkan menunjukkan kemungkinan adanya senyawa flavonoid dan alkaloid. Deteksi noda pada panjang gelombang UV 254 dan 366 nm mendukung keberadaan senyawa aromatik atau yang mengandung kromofor, yang sering diasosiasikan dengan metabolit sekunder seperti flavonoid dan alkaloid. Pengamatan pada UV 254 dan 366 nm menghasilkan bercak berwarna biru dan meredam. Pereaksi yang digunakan yaitu Dragendroff didapatkan hasil berwarna orange, warna tersebut terbentuk karena ikatan kovalen koordinat dalam ion K<sup>+</sup> dari kalium tetraiodobismutat membentuk kompleks kalium alkaloid (Daniswari et al., 2023).

## KESIMPULAN

Hasil penelitian menunjukkan isolat cendawan endofit akar mangrove *Rhizophora mucronata* secara morfologis termasuk dalam genus *Aspergillus* sp. Proses fermentasi menggunakan metode *Submerged Fermentation* (SmF) dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) selama 21 hari pada suhu 28°C dan kecepatan 120 rpm menghasilkan biomassa dan metabolit sekunder secara optimal. Ekstraksi cair-cair dengan pelarut etil asetat terbukti efektif dalam memisahkan senyawa bioaktif dari media fermentasi, dengan hasil ekstrak kering sebanyak 0,5 gram. Analisis KLT menunjukkan adanya beberapa senyawa yang berhasil dipisahkan menggunakan sistem eluen yang berbeda. Kombinasi eluen *n*-heksana:etil asetat (5:1) dan eiklorometana:metanol (10:1) menghasilkan pemisahan paling optimal, ditandai dengan munculnya noda-noda dengan nilai Rf antara 0,23–0,53 yang konsisten dengan kisaran Rf senyawa flavonoid dan alkaloid, berdasarkan literatur. Deteksi noda pada panjang gelombang UV 254 dan 366 nm menguatkan keberadaan senyawa aromatik yang merupakan karakteristik

umum dari metabolit sekunder bioaktif. Adapun saran penelitian yang dapat dilakukan adalah melakukan proses permurnian senyawa untuk memperoleh senyawa bioaktif antimalaria.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Artasasta, M.A., Fardilla, D.M., Rasyid, H., Listyorini, D., Putra, W.E., Handayani, D., .....et al. 2025. Antimalarial Activity Screening from Endophytic Fungus of Red Ginger (*Zingiber officinale*): in vitro and in silico Studies. *Sains Malaysiana*, 54(6): 1523-1534.
- Ashley, E.A., Dhorda, M., Fairhurst, R.M., Amartunga, C., M.D. Lim., P. Suron, S., Sreng, S.....et al. (2014). Spread of Artemisinin Resistance in *Plasmodium falciparum* Malaria. *The New England Journal of Medicine*, 371, 411-423.
- Bunbamrung, N., Intaradom, C., Dramaee, A., Komwijit, S., Laorob, T., Khamsaeng, S., & Pittayakhajonwut, P. 2020. Antimicrobial, antimalarial and anticholinesterase substances from the marine-derived fungus *Aspergillus terreus* BCC51799. *Tetrahedron*, 76 (41), 131496.
- Calcul, L., Waterman, C., Ma, W. S., Lebar, M. D., Harter, C., Mutka, T., ... et al. (2013). Screening Mangrove Endophytic Fungi for Antimalarial Natural Products. *Marine Drugs*, 11(12), 5036-5050.
- Chaiyadej, K., Wongthap, H., Vadhanavikit, S., & Chantrapromma K. (2004). Bioactive Constituents from The Twigs of *Sonneratia Alba*. *Walailak Journal of Science and Technology*, 1,15–22.
- Christo, E. G., & Sutedja, A. M. (2024). Solid-State Fermentation Dengan Variasi Mikroorganisme. *Zigma*, 39(1), 37-48.
- Daniswari, A., Fitri, L.A., Putri, Y.H. & Mulayningtyas, A. (2023). Uji Kualitatif Senyawa Polifenol, Tanin, dan Alkaloid Pada Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* L.) Menggunakan Metode Kromatografi Lapis Tipis. *Institutional Repository UMS*, 116985.
- Dawolo, B., Puspita, F., & Armaini, A. (2017). Identifikasi Jamur Endofit dari Tanaman Karet Dan Uji In Vitro Anti Mikroba Terhadap *Rigidoporus Microporus*. *Journal Online Mahasiswa Faperta Universitas Riau*, 4(2), 1-11.
- Forestryana, D., & Arnida, A. (2020). Skrining Fitokimia Dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Hydrolea Spinosa* L.). *Jurnal Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2), 113-124.
- Gupta, V., Sharma, A., Jamwal, G., Gupta, S.K., & Razdan, V.K. 2025. Penicillium Genus as a Source of Metabolites for Agricultural Applications. *Fungal Metabolites for Agriculture Applications*, 181-198.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia*. Edisi Ke-2. ITB. Bandung.
- Hridya, V. K., Prince Godson, S., Chandrasekar, N., & Kumaresan, S. (2021). The Antimalarial Potential and Phytochemical Composition of Mangroves From Southeast India: An In Vitro Study. *Journal Of Aquatic Biology & Fisheries*, 9(S1), 29-34.
- Kathiresan, K., & Bingham, B.L. (2001). Biology of Mangroves and Mangrove Ecosystems. *Advances in Marine Biology*, 40, 81-251.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia [Kemenkes RI]. 2024. Pencegahan Dan Pengendalian Penyakit Kasus Malaria. <https://Malaria.Kemkes.Go.Id/Case> [Diakses Tanggal 13 Oktober 2024].
- Li, Z., Xiong, K., Wen, W., Li, L., & Xu, D. 2023. Functional Endophytes Regulating Plant Secondary Metabolism: Current Status, Prospects and Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2):1153.
- Mahfur, M., Mahbub, K., Salsabila, N. S., & Istiqomah, M. N. (2023). Optimasi Waktu Fermentasi Jamur Symbion Dari Sponge *Rhabdastrella* Sp. dan Uji Aktivitas Antibakterinya. *Jurnal Insan Farmasi Indonesia*, 6(1), 102-111.
- Marhamah, H. I., & Husna, I. (2019). Aktivitas Antimalaria Tanaman Tali Kuning (*Anamirta Cocculus*) Terhadap *Plasmodium* Sp. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*, 6(1), 66-74.
- Menard, D., & Dondorp, A. (2017). Antimalarial Drug Resistance: A Threat to Malaria Elimination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7, a025619.

- Muhaimin, Latief, M., Putri, R.D., Chaerunisaa, A.Y., Aditama, A.Y., Pravitasari, N.E., & Siregar, J.E. (2019). Antiplasmodial Activity of Methanolic Leaf Extract of Mangrove Plants against *Plasmodium berghei*. *Pharmacognosy Journal*, 11(5), 929-935.
- Natasa, E., Ferdinan, A., & Kurnianto, E. (2021). Identifikasi Senyawa Flavonoid Ekstrak Etanol Akar Bajakah (*Spatholobus littoralis* Hassk.). *Jurnal Komunitas Farmasi Nasional*, 1(2), 155-162.
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2016). Natural Products as Sources of Newdrugs From 1981 To 2014. *Journal of Natural Product*, 79(3), 629-661.
- Pratiwi, S. A., Februyani, N., & Basith, A. (2023). Skrining Dan Uji Penggolongan Fitokimia Dengan Metode Klt Pada Ekstrak Etanol Kemangi (*Officium Basilicum* L) Dan Sereh Dapur (*Cymbopogon Ciratus*). *Pharmacy Medical Journal*, 6(2), 140-147.
- Putra, G.W., Ramona, Y., & Proborini, M.W. (2020). Eksplorasi dan identifikasi mikroba pada rhizosfer tanaman stroberi (*Fragaria x ananassa* Dutch.) Di Kawasan Pancasari Bedugul. *Metamorfosa: Journal of Biological Sciences*, 7(2), 62.
- Putri, A.O., Hati, M.C., Ishanti, N.P., & Ilham, H.S. (2024). Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Beberapa Jenis Tanaman dengan Kromatografi Lapis Tipis: Literature Review. *PHARMADEMICA : Jurnal Kefarmasian dan Gizi*, 3(2), 45-54.
- Rahayu, S., Kurniasih, N., & Amalia, V. (2015). Ekstraksi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid dari Limbah Kulit Bawang Merah Sebagai Antioksidan Alami. *Al-kimiya: Jurnal Ilmu Kimia dan Terapan*, 2 (1), 1-8.
- Ranjan, A., Sahu, N.P., Deo, A.D., & Kumar, S. 2019. Solid state fermentation of de-oiled rice bran: Effect on in vitro protein digestibility, fatty acid profile and anti-nutritional factors. *Food Research International*, 119: 1-5.
- Ridlo, A., Pramesti, R., Supriyantini, E., & Soenardjo, N. (2017). Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Mangrove *Rhizophora mucronata*. *BULOMA: Buletin Oseanografi Marina*, 6(2), 1-8.
- Rohmawati, E. S., & Harahap, I. (2017). Isolasi Dan Karakterisasi Senyawa Antifungi Isolat Cendawan Endofit Dari Tumbuhan Senduduk (*Melastoma Malabathricum* L.). *Prosiding Celscitech*, 2, 43-49.
- Sarmadansyah, S., Nasution, H. M., Daulay, A. S., & Mambang, D. E. P. (2023). Skrining fitokimia dan isolasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol biji buah menteng (*Baccaurea racemosa* (Reinw.) Müll. Arg). *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 1748-1758.
- Septiana, E., Umaroh, A., Gangga, E., & Simanjuntak, P. 2017. Aktivitas Penghambatan Polimerasi HEME Ekstrak Daun Sembung (*Blumea blasamifera*) sebagai antimalaria. *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 28(1): 29.
- Sharma, A., Malhotra, B., Kharkwal, H., Kulkarni, G. T., & Kaushik, N. (2020). Therapeutic agents from endophytes harbored in Asian medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19, 691-720.
- Silva, N.I., Souza, P.F.L., Silva, B.F., Fonseca, S.G., & Gardinassi, L.G. (2024). Host Transcriptional Meta-signatures Reveal Diagnostic Biomarkers for *Plasmodium falciparum* Malaria. *The Journal of Infectious Diseases*, 230 (2), e474-e485.
- Singh, U., Akhtar, O., Mishra, R., Zoomi, I., Kehri, H.K. & Pandey, D. (2021). Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Biodiversity, Interaction with Plants, and Potential Applications. *Industrially Important Fungi for Sustainable Development*, 1(2).
- Suhendar, U., Julaehan, E., Gaffar, S., Ishmayan, S., & Soedjanaatmadja, U.M.S. (2024). Isolation, Identification, and Characterization of Indole Acetic Acid (IAA) Phytohormone From Sunflower Root Fungal Isolate of Dark Septate Endophyte (*Helianthus annuus*). *African Journal of Biological Science*, 6(5), 5959-5970.
- Suryani, Y., Taupiqurrhman, O., & Kulsum, Y. (2020). *Mikologi*. Padang: Freeline Cipta Granesia.

- Suryanto. (2012). *Fitokimia Antioksidan*. Surabaya: Putra Media Nusantara.
- Tanvir, R., Sajid, I. & Hasnain, S. (2014). Biotechnological potential of endophytic actinomycetes associated with Asteraceae plants: isolation, biodiversity and bioactivities. *Biotechnology Letters*, 36 (4), 767-773.
- Toppo, P., Jangir, P., Mehra, N., Kapoor, R., & Mathur, P. (2024). Bioprospecting of endophytic fungi from medicinal plant *Anisomeles indica* L. for their diverse role in agricultural and industrial sectors. *Scientific Reports*, 14(1), 588.
- Theodora, C. T., Gunawan, I W. G., & Swantara, I M. D. (2019). Isolasi Dan Identifikasi Golongan Flavonoid Pada Ekstrak Etil Asetat Daun Gedi (*Abelmoschus manihot* L.). *Journal of Chemistry*, 131-138.
- Tumiwa, P. I., Yudistira, A., & Wewengkang, D. S. (2019). Aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat Jamur laut yang diisolasi dari organisme laut Spons *phylospongioa Lamellosa* yang Diambil Dari Perairan Desa Tumbak, Kecamatan Pusomaen, Kabupaten Minahasa Tenggara Terhadap Mikroba *Staphylococcus Aureus*, *Escherich. Pharmacon*, 8(4), 851.
- Ujam, N.T., Adonu, C.C., Gugu, T.H., Onwusoba, R., Offiah, R.O., ... et al. (2020). Assessment of antiplasmodial and immunomodulatory activities of endophytic fungal metabolites from *Azadirachta indica* A. Juss. *African Journal of Microbiology Research*, 16(3), 121-131.
- Usman, Y., & Muin, R. 2023. Uji kualitatif dan perhitungan nilai Rf senyawa flavonoid dari ekstrak daun gulma siam. *Journal of Pharmaceutical Science and HerbalTechnology* : 1(1): 10-15.
- Utami, T. P., Hasyim, H., Kaltsum, U., Dwifitri, U., Meriwati, Y., Yuniwanti, Y., & Zulaiha, Z. (2022). Faktor Risiko Penyebab Terjadinya Malaria di Indonesia: Literature Review: Risk Factors Causing Malaria in Indonesia: Literature Review. *Jurnal Surya Medika (JSM)*, 7(2), 96-107.
- Widyawaruyanti, A., Harwiningtias, N., Tumewu, L., Hafid, A.F., & Soetjipto. (2020). Effect of Formulated Artocarpus champeden Extract on Parasite Growth and Immune Response of *Plasmodium berghei*-Infected Mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 4678634.
- World Health Organization. (2023). *World Malaria Report*. Geneva: Who Press. <https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2023> [Diakses Tanggal 28 September 2024].