



Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Pelabuhan Besuki Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Mariatul Kibthiyah, Bawon Triatmoko, dan Ari Satia Nugraha*

Drug Utilisation and Discovery Research Groups, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jl. Kalimantan 1/2, Jember, Indonesia, 68121

*email korespondensi: arisatia@unej.ac.id

Received 10 November 2021, Accepted 7 June 2021, Published 15 July 2021

Abstrak: Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia. Terapi infeksi bakteri dengan antibiotik yang tidak tepat penggunaannya dapat menyebabkan resistensi. Penemuan antibiotik baru dapat berasal dari bahan alam, salah satunya fungi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi khamir tanah muara terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Isolasi fungi tanah dilakukan menggunakan media *Potato dextrose Agar* (PDA) dilarutkan dalam air laut. Proses tersebut menghasilkan 7 isolat fungi kemudian disebut IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, IS-PB-B2. Semua isolat fungi memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan uji antagonis. Pengujian aktivitas antibakteri dilanjutkan menggunakan metode mikrodilusi. Aktivitas antibakteri disajikan dalam bentuk persen penghambatan. Hasil uji antibakteri dari tujuh ekstrak konsentrasi 100 µg/mL menunjukkan persen penghambatan tertinggi dari kode IS-PB-A2 ($84,7 \pm 1,4\%$) dan terendah dari kode IS-PB-T2 ($30,5 \pm 3,3\%$). Senyawa yang berperan menghambat pertumbuhan bakteri dalam penelitian ini belum bisa dipastikan sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut.

Kata kunci: Antibakteri; *Pseudomonas aeruginosa*; Fungi Tanah

Abstract: Tracking and Isolation Estuary Soil Fungi in Harbor of Besuki and Screening Antibacterial Activities on *Pseudomonas aeruginosa*. Infectious disease is one of the causes of death worldwide. Inappropriate antibiotic treatment for bacterial infections causes resistance. New antibiotics can be sourced from nature including fungi. This study aims to determine the antibacterial activity of ethyl acetate extract from fermented estuarine yeast against *Pseudomonas aeruginosa*. Isolation of soil fungi using *Potato dextrose Agar* (PDA) media dissolved in sea water. This process resulted in 7 isolates of the fungus which were then called IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, IS-PB-B2. All fungal isolates have the potential to inhibit bacterial growth with antagonistic tests. Antibacterial activity testing was continued using the microdilution method. The antibacterial activity test were performed based on microdilution protocol. The antibacterial activity is presented in the form of percent inhibition. Antibacterial test results from seven extracts of concentration of 100 µg / mL showed the highest inhibitory percent of the IS-PB-A2 code ($84.7 \pm 1.4\%$) and the lowest from the IS-PB-T2 code ($30.5 \pm 3.3\%$). The compounds that play a role in inhibiting bacterial growth in this study cannot be ascertained so further research is needed

Keywords: Antibacterial; *Pseudomonas aeruginosa*; Soil Fungi

1. Pendahuluan

Masalah kesehatan di negara berkembang yang kerap menyebabkan kematian di seluruh dunia salah satunya adalah penyakit infeksi (Mustaqof *et al.*, 2015). *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa pada tahun 2017 penyakit infeksi menyebabkan 17% dari semua kematian di seluruh dunia terutama balita (WHO, 2017). Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti virus, bakteri, parasit atau jamur (Nursidika *et al.*, 2014). Antibiotik merupakan salah satu agen untuk memerangi penyakit infeksi yang disebabkan bakteri dengan menghambat sintesis sel, sintesis protein, asam deoksiribonukleat, dan asam ribonukleat (Stuart, 2014). Penggunaan antibiotik yang kurang tepat telah memberikan kontribusi signifikan terhadap munculnya kasus resistensi. Resistensi menyebabkan obat kehilangan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri sehingga bakteri menjadi “tahan” dan terus berkembang biak. Resistensi tersebut membuat penemuan alternatif antibiotik baru untuk melawan penyakit infeksi akibat bakteri menjadi sangat diperlukan (Zaman *et al.*, 2017). Penemuan antibiotik tersebut dapat bersumber dari fungi tanah seperti *Saccharomyces sp.*, *Cryptococcus sp.*, *Candida sp.*, dan spesies fungi lain dalam tanah.

Penelitian terkini terkait penemuan aktivitas antibakteri yang diisolasi dari fungi dilakukan oleh Wibowo (2017). Penelitian tersebut menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari fungi yang diisolasi dari tanah berasal dari Shah Alam Malaysia terhadap *B. subtilis* dan *E. coli*. Penelitian lain juga dilakukan oleh Anupama *et al.* (2017) yang melaporkan adanya aktivitas antibakteri dari *Candida sp.* yang diisolasi dari tanah terhadap bakteri *Staphylococcus sp.* dan *Bacillus sp.* yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat pada media agar menggunakan metode difusi cakram. Salah satu ekosistem tempat tumbuhnya fungi penghasil antibiotik adalah tanahmuara. Potensi antibakteri fungi tanah yang berasal dari kawasan pantai pasir putih Situbondo Kecamatan Bungatan sebelumnya telah diteliti (Pamungkas, 2021). Berdasarkan letak pengambilan sampel pada penelitian tersebut pada jarak 18,7 km terdapat pelabuhan Besuki. Potensi antibakteri fungi tanah muara di pelabuhan tersebut tidak pernah diteliti sebelumnya.

Muara dicirikan dengan gradien salinitas dalam sistem pesisir semi tertutup yang menghasilkan evolusi sekelompok organisme yang unik dan mampu beradaptasi menggunakan gradien salinitas sebagai keunggulan kompetitif dengan kemampuan osmoregulator yang baik (Elliott & Whitfield, 2011). Fungi tanah mampu mendegradasi selulosa, protein, dan lignin, tahan terhadap kerusakan serta dapat menghancurkan kayu keras yang ada didalam tanah. Fungi menyerap sebagian hasil penguraian tersebut dan melepaskan

bahan-bahan sederhana salah satunya metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Metabolit sekunder inilah yang kemudian dapat dijadikan sebagai sumber penemuan antibiotik baru. Potensi dari bagian ekosistem muara adalah ekosistem bakau yang mencerminkan hubungan timbal balik antara makhluk hidup dengan lingkungannya dan antar makhluk hidup itu sendiri. Ekosistem bakau menjadi habitat kaya akan bahan organik sebagai pendukung pertumbuhan fungi(Entwistle, 2016).

Bakteri penyebab infeksi secara garis besar si dibagi menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif hanya memiliki membran tunggal, sedangkan gram negatif memiliki membran ganda yang terdiri dari lipopolisakarida dan fosfolipid dengan permeabilitas rendah terhadap beberapa senyawa. Hal tersebut menyebabkan gram negatif lebih berbahaya dibanding gram positif (Kramer *et al.*, 2019). Salah satu bakteri gram negatif penyebab infeksi adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Beberapa penelitian di beberapa rumah sakit diIndonesia menyebutkan bahwa penyebab penyakit infeksi terbanyak disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan kejadian sekitar 3,3-30,8% (Taslim & Maskoen, 2016). Resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memicu eksplorasi agen antibakteri baru (Maulana *et al.*, 2020).

Penelitian ini bertujuan untuk menelusuri dan mengisolasi fungi dari tanah muara Pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo serta menskrining aktivitas antibakterinya terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Parameter aktivitas antibakteri yang digunakan adalah persentase hambat ekstrak etil asetat fungi tanah menggunakan metode mikrodilusi. Studi terkaitidentifikasi fungi dan skrining bioaktivitas terhadap pertumbuhan bakteri diharapkan dapat memberikan pengetahuan lebih banyak tentang keanekaragaman fungi serta untuk memberikan informasi potensi penemuan alternatif antibiotik baru.

2. Metode Penelitian

2.1 Alat

Laminar Air Flow (THERMO CIENTIFIC 1300 SERIES A2), *microplate flat bottom 96 wells* (IWAKI), *autoclave* (B-ONE), *microplate reader* (HumaReader HS), *shaker incubator* (B-ONE), neraca analitik (OHAUS), *hot plate* (HEIDOLPH), *vortex* (GENE-2), mikropipet (Socorex & Eppendorf), *centrifuge*, spektrofotometer UV-Vis (GENESYS) dan *chamberkromatografi lapis tipis/KLT* (CAMAG).

2.2 Bahan

Tanah muara dari Pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo, *sterile water for irrigation*, aqua demineralisata (HYDROBATT), air laut, larutan NaCl 0,9%, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), *Potato Dextrose Broth*(PDB) (HIMEDIA), *Mueller Hinton Agar* (MHA)

(Merck), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (HIMEDIA), bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, DMSO (Emsure), CaCl₂ (Sigma), MgCl₂ (Brataco), BaCl₂, H₂SO₄, etil asetat teknis, dan gentamisin sulfat.

2.3 Prosedur penelitian

2.3.1 Preparasi media

Media PDA ditimbang sejumlah 1,17g dan dilarutkan dengan aqua demineral sebanyak 250 mL. Media PDB ditimbang sebanyak 3,60g lalu dilarutkan dalam erlenmeyer dengan 150 mL aqua demineralisata. Media MHA ditimbang sebanyak 3,40g, dilarutkan dengan aqua demineralisata 150 mL dalam erlenmeyer. Media MHB ditimbang 1 g dilarutkan dalam 50 mL aqua demineralisata. Media CAMHB dibuat dengan media MHB steril ditambahkan Mg²⁺ dan CaCl₂ steril hingga konsentrasi keduanya berturut-turut 10-12,5 mg/L dan 20-25 mg/L (CLSI, 2012). Penambahan larutan induk Mg²⁺ dan CaCl₂ kedalam 50 mL media MHB steril masing-masing 56 µL untuk Mg²⁺ dan 110 µL untuk CaCl₂ sehingga diperoleh konsentrasi 11,25 mg Mg²⁺/L dan 22,5 mg CaCl₂/L.

2.3.2 Preparasi sampel tanah, pembiakan dan isolasi fungi

Sampel tanah diambil dari muara Pelabuhan Besuki, Kabupaten Situbondo di sekitar tanaman bakau dengan kedalaman 0-40 cm menggunakan pipa PVC. Sampel dibagi tiga bagian yaitu atas, tengah, dan bawah. 5 cm tanah yang terambil pada bagian atas pipa disebut bagian atas. 5 cm tanah terbawah pada pipa disebut sambel bagian bawah, sedangkan tanah ditengah-tengah pipa disebut bagian tengah. Sampel disuspensikan dengan air steril 10 mL, 2 mL dipipet ke *microtube* lalu disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit. Bagian supernatan diambil 100 µL dan dituang pada media PDA. Fungi yang tumbuh setelah inkubasi pada suhu 28± 2°C selama 7 hari dipindah berdasarkan morfologi yang berbeda secara visual pada media PDA yang baru kemudian diinkubasi kembali 7 hari pada suhu 28°C.

2.3.3 Identifikasi fungi makroskopis dan mikroskopis

Identifikasi fungi makroskopis dilakukan dengan pengamatan secara visual fungi yang tumbuh pada media PDA. Identifikasi fungi mikroskopis dilakukan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x.

2.3.4 Pembuatan suspensi bakteri

Hasil inokulumbakteri uji diambil 1 ose disuspensikan ke dalam tabungreaksi berisi NaCl fisiologis 0,9%, lakukan pengenceran hingga menghasilkan absorbansi sebesar 0,08 - 0,13 pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm.

2.3.5 Uji antagonis bakteri

Isolat fungi pada media PDA dicetak menggunakan sumuran diambil dengan ose dan dikontakkan dengan bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*, selanjutnya diinkubasi selama 18 jam pada suhu $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ menggunakan inkubator. Dilakukan pengukuran nilai diameter zona bening menggunakan jangka sorong.

2.3.6 Fermentasi dan ekstraksi fungi tanah

Fermentasi dilakukan menggunakan metode *batch fermentation* dengan memasukkan 5 potong bagian kultur fungi yang dicetak dengan sumuran berdiameter 0,9 cm ke dalam media PDB 150 mL. Campuran keduanya di letakkan pada *shaker incubator* hingga fungi mencapai fase stationer pada hari ke-14. Ekstraksi dilakukan dengan menyaring hasil fermentasi. Hasil saringan media fermentasi ditambah etil asetat 1:1 dan dilakukan partisi cair-cair selama lima belas menit sebanyak 3 kali replikasi. Hasil ekstraksi dengan etil asetat dituang ke dalam mangkok untuk menguapkan pelarut di dalam lemari asam. Setelah pelarut menguap seutuhnya, ekstrak dimasukkan ke dalam vial dan ditimbang bobotnya serta dihitung % rendemennya.

2.3.7 Skrining fitokimia

Skrining fitokimia terhadap ekstrak hasil fermentasi dilakukan guna mengetahui adanya senyawa fenolat dan terpenoid atau steroid. Larutan ekstrak hasil preparasi ditotolkan sebanyak 4 μL pada plat KLT F₂₅₄. Plat KLT tersebut kemudian dieluasi dengan eluen sesuai hasil optimasi. Eluen dianggap optimal ketika menghasilkan pemisahan pada lempeng KLT. Reagen vanilin-H₂SO₄ untuk mendeteksi adanya senyawa fenolat yang ditunjukkan dengan warna merah muda, sedangkan untuk terpenoid dapat dideteksi jika ditemukan noda berwarna merah keunguan pada lempeng KLT setelah dilakukan pemanasan pada *hot plate* (Sharifa *et al*, 2012).

2.3.8 Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri fungi tanah dilakukan dengan metode mikrodilusi konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ yang mengacu pada protokol standar CLSI M100-S25 (CLSI, 2017). Penentuan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah dilakukan dengan metode mikrodilusi. Suspensi bakteri dalam media CAMHB (1×10^8 CFU/mL) diencerkan 100 kali menggunakan media CAMHB hingga konsentrasi bakteri menjadi 1×10^6 CFU/mL. Setiap sumuran berisi 50 μL suspensi bakteri dalam media CAMHB. Penambahan larutan kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan uji masing-masing sebanyak 50 μL . Konsentrasi akhir bakteri dalam tiap sumuran 5×10^4 CFU. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah terdiri dari campuran 50 μL larutan ekstrak dalam DMSO 1% dan 50 μL bakteri (5×10^4 CFU/mL) dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak terdiri dari campuran 50 μL larutan ekstrak

etil asetat konsentrasi 100 µg/mL dalam DMSO 1% dan 50µL media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak terdiri dari campuran 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol DMSO 1% yaitu campuran 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50µL media CAMHB. Kontrol positif terdiri dari 50 µL campuran gentamisin konsentrasi 1 µg/mL dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin terdiri dari campuran 50µL gentamisin konsentrasi 1 µg/mL dan 50 µL media CAMHB. Campuran media CAMHB 50µL dan bakteri 50µL menjadi kontrol negatif gentamisin, sedangkan media CAMHB 100 µL merupakan kontrol media. Semua prosedur uji aktivitas antibakteri dilakukan dalam kondisi aseptis.

2.3.9 Analisis data

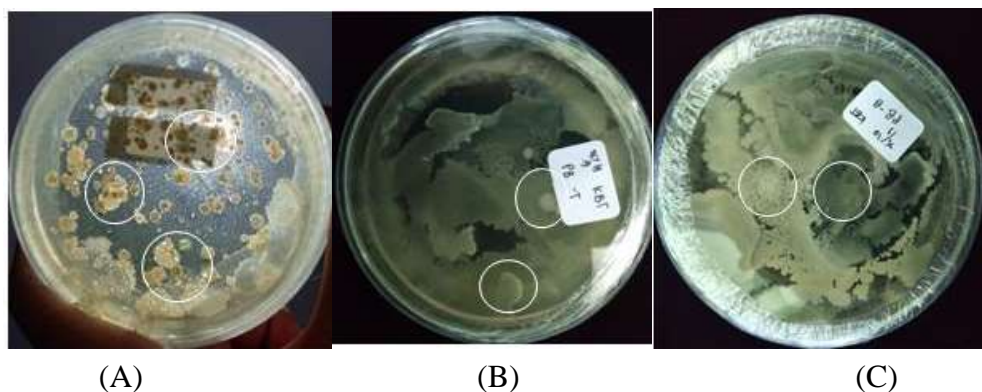
Persentase pertumbuhan bakteri dihitung berdasarkan rumus persamaan 1 (Queve *et al.*, 2008).

$$\% \text{ Penghambatan} = \left(1 - \frac{(Abs C - Abs D)}{(Abs A - Abs B)} \right) \times 100\%$$

Persamaan 1. Persentase pertumbuhan bakteri. Keterangan: Absorbansi (Abs), Kontrol DMSO 1% atau media CAMHB (A), Kontrol DMSO 1% atau media CAMHB (B), Larutan uji ekstrak/gentamisin (C) dan Kontrol ekstrak/gentamisin (D).

3. Hasil dan Pembahasan

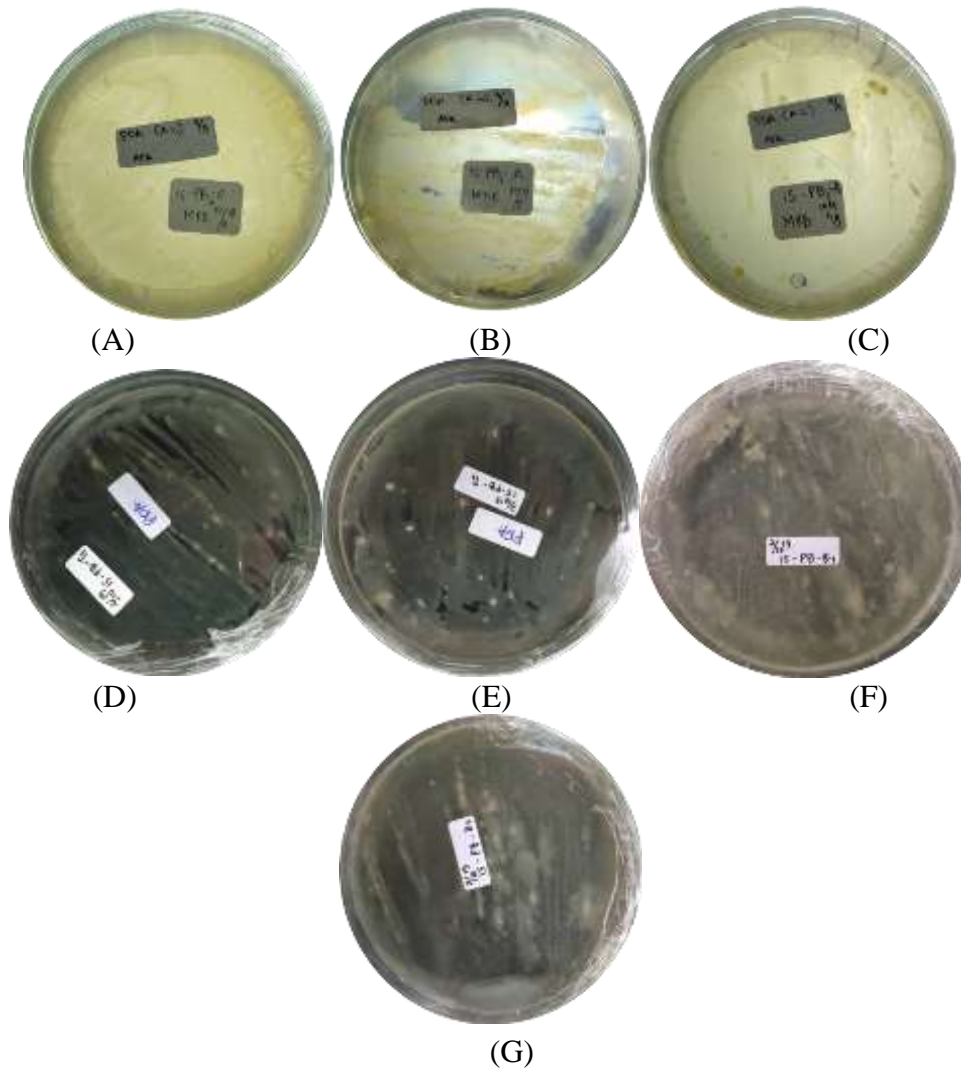
3.1 Pemiakan dan Isolasi Fungi Tanah



Gambar 1. Hasil kultur fungi yang berasal dari tanah muara dari pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo selama 7 hari pada media PDA-air laut. Sampel berasal dari tiga bagian tanah yang terambil pada pipa: (A) bagian tanah teratas yang terambil pada pipa, (B) bagian tanah yang terambil pada tengah pipa, (C) bagian tanah terbawah bawah yang terambil pada pipa.

Sampel yang berhasil dikumpulkan dibagi 3 bagian yaitu atas, tengah, dan bawah untuk melihat kemungkinan jenis fungi berbeda di setiap bagian tanah. Hasil pengamatan visual morfologi fungi hasil kultur didapatkan 2 sampai 3 perbedaandari sampel tanah atas, tengah, dan bawah yang disajikan pada Gambar 1. Hasil isolasi fungi tanah secara makroskopis pada 7 isolat fungi berumur 7 hari ditunjukkan pada Gambar 2. Masing-masing isolate tersebut

kemudian disebut dengan IS-PB-A1, IS-PB-A2, dan IS-PB-A3 untuk sampel tanah bagian atas, IS-PB-T1 dan IS-PB-T2 untuk sampel tanah bagian tengah, IS-PB-B1 dan IS-PB-B2 untuk sampel tanah bagian bawah.



Gambar 2. Hasil isolasi fungi tanah pada media PDA-air laut. Sampel berasal dari tiga bagian tanah yang terambil pada pipa: kode A1, A2 dan A3 untuk bagian tanah atas yang terambil pada pipa, kode T1 dan T2 untuk bagian tanah yang diambil dibagian tengah pipa, B1 dan B2 untuk bagian tanah terbawah yang terambil pada pipa. (A) IS-PB-A1, (B) IS-PB-A2, (C) IS-PB-A3, (D) IS-PB-T1, (E) IS-PB-T2, (F) IS-PB-B1, (G) IS-PB-B2.

Penambahan air laut pada proses pembiakan diharapkan dapat membuat pertumbuhan fungi menjadi lebih optimum sesuai proses optimasi media pada penelitian Pamungkas (2021). Proses isolasi bertujuan untuk memisahkan fungi tanah dari mikroorganisme lain yang tidak dibutuhkan dalam penelitian agar menghasilkan biakan fungi murni. Hasil isolasi tersebut diidentifikasi makroskopis dan mikroskopis untuk memastikan jenis fungi yang tumbuh. Jenis fungi kapang biasanya memiliki warna yang bervariasi dan terdapat hifa sebagai alat

reproduksi vegetatif sebagai ciri khasnya, sedangkan jenis fungi khamir tumbuh dengan morfologi menyerupai koloni bakteri (Campbell *et al.*, 2003).

3.2 Identifikasi makroskopis dan mikroskopis

Hasil isolasi fungi tanah masing-masing diamati secara visual untuk menentukan jenis fungi yang dihasilkan. Rincian morfologi hasil kultur fungi yang diamati secara makroskopis ditunjukkan pada Tabel 1, sedangkan morfologi hasil isolasi fungi secara makroskopis disajikan pada Tabel 2.

Tabel 1. Morfologi hasil kultur fungi tanah berumur 7 hari pada media PDA-air laut secara makroskopis. (A) sampel tanah teratas yang terambil pada pipa, (T) sampel tanah yang terambil dibagian tengah pipa, (B) sampel tanah terbawah yang terambil pada pipa.

Kode Sampel	Karakteristik makroskopis	
	Warna	Tekstur
IS-PB-A	Putihkecoklatan, buram, kusam	Halus, kental dan licin
IS-PB-T	Putih krem, buram, kusam	Halus, kental
IS-PB-B	Putih krem, buram, kusam	Halus, kental

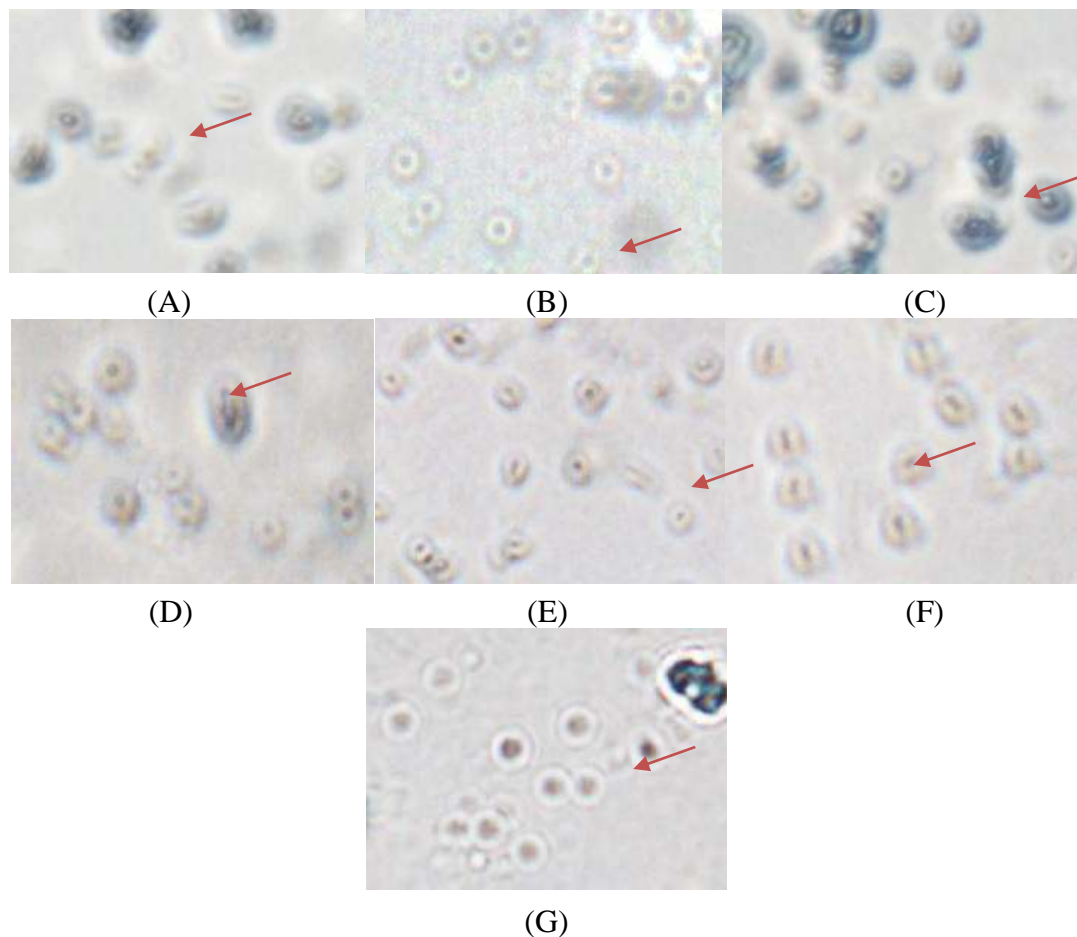
Hasil kultur fungi dari bagian tanah atas, tengah, dan bawah cenderung memiliki warna putih krem atau kekuningan, buram dan kusam serta bertekstur halus dan kental (Tabel 2). Hasil isolasi fungi selanjutnya disimpan dalam suhu $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan tujuan memperlambat pertumbuhan fungi untuk penyimpanan lebih lama. Pengamatan morfologi sel bertujuan untuk mengetahui bentuk dan ada tidaknya hifa atau pseudohifa. Fungi khamir dibawah mikroskop menyerupai koloni bakteri dengan bentuk oval atau telur, tetapi beberapa ada yang berbentuk bulat. Sebagian besar sel khamir memiliki ukuran lebih besar dibandingkan bakteri, tetapi khamir yang terkecil tidak sebesar bakteri yang terbesar (Volk & Wheeler, 1971).

Tabel 2. Morfologi hasil isolasi fungi pada media PDA-air laut. Sampel berasal dari tiga bagian tanah yang terambil pada pipa: kode A1, A2 dan A3 untuk bagian tanah atas yang terambil pada pipa, kode T1 dan T2 untuk bagian tanah yang diambil dibagian tengah pipa, B1 dan B2 untuk bagian tanah terbawah yang terambil pada pipa.

Kode Sampel	Karakteristik makroskopis	
	Warna	Tekstur
IS-PB-A1	Putih kekuningan, buram, kusam	Halus, kental bermembran
IS-PB-A2	Putih kekuningan, buram, kusam	Halus, kental bermembran
IS-PB-A3	Putih kekuningan, buram, kusam	Halus, kental bermembran
IS-PB-T1	Putih krem, buram, kusam,	Halus, kental
IS-PB-T2	Putih krem, buram, kusam,	Halus, kental
IS-PB-B1	Putih krem, buram, kusam,	Halus, kental
IS-PB-B2	Putih krem, buram, kusam,	Halus, kental

Selain pengamatan secara makroskopis, fungi tanah diidentifikasi menggunakan mikroskop untuk memastikan kembali jenis fungi yang dihasilkan melalui pengamatan morfologi sel fungi. Fungi tanah diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x. Pengamatan

secara mikroskopis dilakukan terhadap semua hasil isolasi fungi tanah atas, tengah dan bawah dengan hasil disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pengamatan bentuk sel fungi khamir sampel fungi tanah, perbesaran 1000x, *scale bar* 20 μm (A) IS-PB-A1 bulat, (B) IS-PB-A2 bulat, (C) IS-PB-A3 bulat, (D) IS-PB-T1 bulat, (E) IS-PB-T2 bulat, (F) IS-PB-B1 oval, (G) IS-PB-B2 bulat.

Data hasil pengamatan secara mikroskopis menunjukkan bahwa fungi yang tumbuh dalam media adalah jenis khamir karena memiliki inti sel berbentuk bulat atau oval. Tanah mengandung banyak komponen termasuk fungi dan bakteri yang memiliki bentuk hampir sama yaitu bulat. Bakteri yang sering terkandung di dalam tanah yakni aktinomisetes. Aktinomisetes merupakan sel prokariotik tak berinti sel, sedangkan fungi jenis khamir dapat dilihat dari ada tidaknya inti sel (Pepper & Gentry, 2015). Berdasarkan karakteristik tersebut diduga fungi khamir yang berhasil diisolasi dalam penelitian ini termasuk ke dalam spesies *Saccharomyces sp*, namun pemastian jenis spesies khamir dalam setiap kode sampel belum bisa ditentukan. Identifikasi fungi lebih lanjut diperlukan untuk memastikan spesies khamir. Selain itu untuk mempermudah identifikasi fungi perlu dilakukan pemurnian kembali berdasarkan perbedaan morfologi fungi secara makroskopis agar diperoleh biakan fungi murni mengandung satu spesies dalam satu *plate*.

3.3 Skrining awal fungi tanah

Skrining awal atau uji antagonis bakteri dilakukan untuk menyeleksi isolat fungi yang mampu menghasilkan daya hambat terhadap pertumbuhan *P.aeruginosa* dengan data disajikan pada Tabel 3. Proses uji antagonis menggunakan metode difusi agar dengan hasil berupa diameter zona hambat. Zona hambat tersebut berupa zona bening yang nampak di sekeliling fungi. Warna bening tersebut menandakan adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam fungi.

Tabel 3. Diameter zona hambat sampel hasil isolasi, serta berat dan rendemen ekstrak (%b/v) hasil fermentasi dengan kode IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, IS-PB-B2.

Kode sampel	Diameter zona hambat (mm)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%b/v)
IS-PB-A1	12,2	0,259	0,142
IS-PB-A2	11,5	0,147	0,080
IS-PB-A3	12,2	0,139	0,764
IS-PB-T1	9,7	0,274	0,151
IS-PB-T2	13,6	0,009	0,005
IS-PB-B1	11,9	0,092	0,051
IS-PB-B2	11,5	0,066	0,037

Uji antagonis dengan kontak langsung antara bakteri dan fungi tanah untuk mengetahui potensi awal isolat fungi dalam menghambat pertumbuhan bakteri sebelumnya telah dilakukan oleh Wibowo *et al*(2017) dengan mengamati diameter zona hambat yang dihasilkan di sekitar fungi. Senyawa aktif yang disekresi fungi akan menyebar pada media agar yang telah diberi bakteri uji, sehingga bakteri uji pertumbuhannya akan terhambat jika berinteraksi dengan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga menyebabkan terbentuknya zona bening (Mu'azzam *et al.*, 2015). Zona hambat yang diperoleh dari kode sampel IS-PB-B1 diduga bisa karena menunjukkan zona yang tidak bening sempurna atau buram. Hal tersebut dapat disebabkan karena perkembangan fungi dan ketebalan fungi yang dikontakkan terhadap bakteri. Selain itu zona hambat yang berbeda pada masing-masing kode sampel dapat disebabkan oleh kemungkinan perbedaan kandungan fungi dalam setiap hasil isolasi fungi tanah. Setiap fungi memiliki kemampuan berbeda-beda dalam menghasilkan metabolit sekunder yang diduga sebagai bioaktif untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Calvo *et al.*, 2002).

3.4 Fermentasi dan ekstraksi fungi tanah

Fermentasi dilakukan untuk memperbanyak kultur massa fungi tanah sehingga diperoleh produk metabolit primer dan sekunder lebih banyak. Proses pembentukan metabolit sekunder ditandai dengan perubahan warna media PDB seiring bertambahnya waktu fermentasi. Mayoritas senyawa aktif dari fungi tanah merupakan metabolit sekunder yang

diperoleh melalui proses fermentasi, dimana produksinya terjadi pada fase stasioner. Pada fase ini pertumbuhan fungi memasuki fase stagnan sehingga akumulasi produk fermentasi dan menipisnya nutrisi dapat mengubah kondisi dan keseimbangan mikrobiota dalam fermentor untuk waktu yang lebih lama. Jumlah nutrisi medium yang cenderung menipis memungkinkan sel fungi mempunyai komposisi dan menghasilkan bioproduk yang berguna untuk kelangsungan hidup fungi tanah atau metabolit sekunder (Fengxue *et al.*, 2019). Proses fermentasi dilakukan hingga hari ke-14 karena di hari tersebut fungi mencapai pertumbuhan optimum dan berada dalam fase stasioner. Pada fase stationer populasi sel fungi tetap karena jumlah sel fungi yang tumbuh sebanding dengan jumlah sel fungi yang mati disebabkan oleh menipisnya nutrisi yang ada di dalam media (Jain & Pundir, 2011). Hasil fermentasi diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat 1:1. Proses ekstraksi tersebut menunjukkan perolehan rendemen yang disajikan pada Tabel 3.

Data rendemen ekstrak menunjukkan sampel kode FE-PB-A3 memiliki nilai rendemen terbesar (0,764% b/v), sedangkan rendemen terkecil diperoleh dari sampel kode FE-PB-T2 (0,005% b/v). Ekstrak FE-PB-T2 memiliki rendemen terendah dimungkinkan karena kandungan senyawa yang tersari oleh etil asetat dalam ekstrak lebih sedikit dibandingkan dengan sampel lainnya. Perbedaan nilai rendemen yang didapat dipengaruhi oleh kemungkinan perbedaan spesies fungi yang terkandung dalam setiap sampel. Spesies fungi yang berbeda memiliki adaptasi terhadap lingkungan yang berbeda pula. Media PDA air laut yang digunakan diduga mempengaruhi pertumbuhan fungi dalam setiap sampel. Kandungan NaCl yang lebih tinggi di dalam air laut menyebabkan tidak semua fungi dapat tumbuh, hanya fungi yang mampu beradaptasi dengan salinitas tinggi yang dapat terus tumbuh dan menghasilkan metabolit sekunder (Sepcic *et al.*, 2011). Selain itu kemungkinan perbedaan spesies fungi juga menyebabkan perbedaan perkembangan sel dan perbedaan kemampuan untuk biosintesis metabolit sekunder (Calvo *et al.*, 2002).

3.5 Skrining fitokimia

Nagwa *et al.* (2018) melaporkan isolat fungi tanah yang diambil dari tanah rizosfer memiliki aktivitas antibakteri dengan kandungan terpenoid sebesar 38,34%. Terpenoid merupakan senyawa yang mampu bertindak sebagai antibakteri dengan mengganggu membran lipid sehingga menyebabkan kebocoran dari liposom (Mujeeb & Oathak, 2014). Berdasarkan hasil penelitian sampel tanah Wonorejo Surabaya oleh Arisanti *et al.* (2012), didapatkan bahwa fungi khamir yang berhasil diisolasi mengandung senyawa fenolat yang memiliki aktivitas antibakteri. Fenolat merupakan golongan senyawa yang mampu mendenaturasi protein dinding maupun membran sel bakteri. Skrining fitokimia yang

dilakukan pada ekstrak hasil fermentasi fungi tanah muara ini dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dan prinsip penampak noda yang sesuai. Fase gerak yang digunakan yaitu diklorometana : metanol (9:1). Eluen tersebut dipakai untuk mendeteksi kemungkinan golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak hasil fermentasi. Berdasarkan hal tersebut kondisi analisis yang didapat yaitu fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan fase gerak diklorometan : metanol (9:1) dengan penampak noda sesuai dengan golongan senyawa yang diuji.

Hasil penelitian yang diperoleh semua sampel negatif mengandung fenolat, namun positif terhadap uji kandungan terpenoid. Hal tersebut menunjukkan fungi tanah dalam penelitian ini mengandung senyawa golongan terpenoid yang berpotensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Savitri *et al*, 2020). Skrining fitokimia lebih lanjut kemudian diperlukan untuk menentukan senyawa aktif yang berperan besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa yang memiliki peran besar dalam menghambat aktivitas antibakteri dapat diidentifikasi kembali dengan *profiling* menggunakan HPLC (Sundari, 2010).

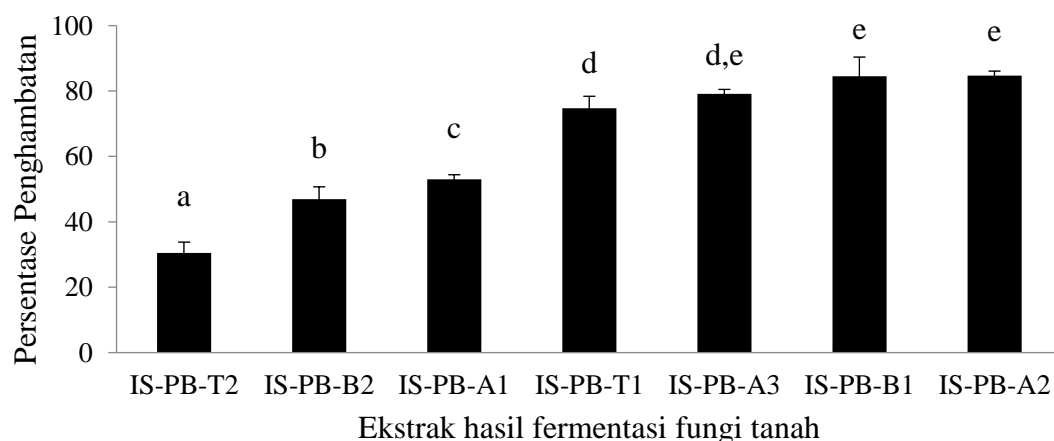
3.6 Uji aktivitas antibakteri

Ekstrak etil asetat fungi tanah muara dari 7 hasil isolasi khamir diuji aktivitas antibakterinya terhadap *P. aeruginosa* menggunakan metode mikrodilusi cair konsentrasi tunggal 100 µg/mL. Perolehan nilai persentase penghambatan disajikan pada Gambar 4.

Data persen penghambatan menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat fungi tanah muara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Kode sampel IS-PB-A2 menunjukkan nilai persen penghambatan tertinggi (84,7 ± 1,4%) sedangkan nilai persen penghambatan terendah dihasilkan oleh sampel dengan kode IS-PB-T2 (30,5 ± 3,3%). Uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini bertujuan untuk menentukan persentase penghambatan bakteri dengan berpedoman pada standar yang ditetapkan oleh CLSI. Media yang direkomendasikan oleh CLSI untuk pengujian mikrodilusi adalah CAMHB. CAMHB merupakan media yang dibuat dengan penambahan ion Mg²⁺ dan Ca²⁺ ke dalam media MHB. Konsentrasi kation divalen seperti Mg²⁺ dan Ca²⁺ merupakan variabel penting yang perlu diperhatikan karena berpengaruh terhadap kestabilan dinding sel bakteri yang berakibat pada berkurangnya pengikatan gentamisin terhadap *P. aeruginosa*. Media MHB yang ditambah dengan kation akan menghasilkan MIC gentamisin ±32 kali lipat lebih tinggi dibandingkan pada media MHB tanpa penambahan kation (Fass & Bernishan, 1979).

Uji aktivitas dalam penelitian ini dilakukan terhadap ekstrak hasil fermentasi fungi tanah yang diduga mengandung terpenoid. Semakin besar kandungan senyawa terpenoid dalam ekstrak dimungkinkan potensi hambatan terhadap bakteri akan lebih besar. Proses ini

dapat terjadi karena senyawa terpenoid menyebabkan kebocoran liposom pada bakteri yang dapat mengganggu pembentukan membran lipid bakteri *P.aeruginosa* sebagai bakteri uji (Mujeeb & Oathak, 2014) Hal tersebut ditunjukkan oleh hasil skrining fitokimia yang diperoleh. Perbedaan nilai persen penghambatan yang diperoleh dari metode mikrodilusi menggunakan ekstrak fungi dengan hasil uji antagonis menggunakan hasil isolasi fungi dapat dipengaruhi oleh laju pembentukan metabolit sekunder yang berbeda pada tiap fungi. Dimungkinkan jenis fungi yang terkandung dalam ekstrak tersebut memiliki spesies yang berbeda-beda. Setiap spesies fungi memiliki kemampuan berbeda-beda dalam membentuk metabolit sekunder. Pembentukan metabolit sekunder dapat dipengaruhi beberapa faktor. Faktor yang berpengaruh seperti diferensiasi atau perkembangan sel, pengaruh sejumlah faktor eksternal (media pertumbuhan) dan internal (transduksi sinyal yang mengatur biosintesis produk alami), reaksi enzimatik sekuensial yang diperlukan untuk mengubah *building blocks* primer menjadi produk alami, regulasi ekspresi gen enzimatik produk alami oleh satu atau lebih aktivator transkripsional, biosintesis produk alami dengan metabolisme primer (Calvo *et al.*, 2002).



Gambar 4. Diagram persentase penghambatan pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* oleh ekstrak fungi tanah muara dari yang terkecil hingga terbesar. Huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($p > 0,05$) antar kelompok uji. Data ditransformasi dengan Ln dan dianalisis menggunakan ANOVA.

Penelitian sebelumnya menunjukkan banyak fungi yang diisolasi dari tanah memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri (Pamungkas *et al*, 2021). Ekstrak kode IS-PB-A2 menjadi isolat yang paling potensial karena memiliki nilai persen penghambatan tertinggi dibandingkan dengan isolat lainnya, yaitu sebesar $84,7 \pm 1,4\%$ dengan konsentrasi uji $100 \mu\text{g/mL}$. Berdasarkan nilai persen penghambatan dan data analisis statistik persen penghambatan kode sampel IS-PB-A2 ($84,7 \pm 1,4\%$) dengan IS-PB-B1 ($84,5 \pm 5,9\%$) dan IS-PB-A3 ($79,1 \pm 1,4\%$) dengan IS-PB-T1 ($74,7 \pm 3,7\%$) didapatkan hasil yang tidak berbeda

signifikan ($p > 0,05$). Hal tersebut dimungkinkan sampel dengan kode IS-PB-A2 dan IS-PB-B1 memiliki jenis fungi atau kandungan senyawa bioaktif yang sama sehingga menunjukkan hasil tidak berbeda signifikan, begitu pula dengan sampel kode IS-PB-A3 dan IS-PB-T1. Pengujian aktivitas antibakteri menunjukkan sampel ekstrak fungi tanah yang diisolasi dari tanah muara Pelabuhan Besuki Situbondo dapat dinyatakan memiliki aktivitas antibakteri, namun belum bisa disimpulkan aktivitasnya karena dibutuhkan penelitian lebih lanjut terkait nilai MIC dari masing-masing sampel.

4. Kesimpulan

Tujuh hasil isolasi fungi berhasil didapatkan termasuk dalam jenis khamir dengan kode sampel IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, dan IS-PB-B2. Semua hasil isolasi fungi tanah tersebut memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P.aeruginosa*. Uji aktivitas antibakteri dengan konsentrasi tunggal ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah terhadap *P.aeruginosa* menghasilkan persen penghambatan IS-PB-A1 $53,0 \pm 1,4\%$, IS-PB-A2 $84,7 \pm 1,4\%$, IS-PB-A3 $79,1 \pm 1,4\%$, IS-PB-T1 $74,7 \pm 3,7\%$, IS-PB-T2 $30,5 \pm 3,3\%$, IS-PB-B1 $84,5 \pm 5,9\%$, IS-PB-B2 $46,9 \pm 3,8\%$.

Ucapan Terimakasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada *Drug Utilisation and Discovery Research Groups* (DUDRG) Fakultas Farmasi Universitas Jember atas dukungan fasilitas penelitian.

Deklarasi Konflik Kepentingan

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini.

Daftar Pustaka

- Anupama, B., C. Sonia, and K. Kamalpreet. (2017). Production of antibacterial agent from fungi isolated from park soil sample by fermentation under optimized condition. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(1): pp.70–77.
- Arisanti, S., Kwintasari, N., and Maya, S. (2012). Antimicrobial Assay of Soil Mold Isolates from Wonorejo Surabaya. *The Journal for Technology and Science*, 23(4): pp. 111-117
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok J. W., dan Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 66(3): pp. 447.
- Campbell, N., Reece, J. B., and Mitchell, L. (2003). *Biologi Jilid 2*. Jakarta: Erlangga.
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (ss2012). *Method for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standart – Ninth Edition*. CLSI Document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). (2017). *Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing, 27 Edition*. Wayne: CLSI supplement M100-S20. USA
- Elliott, M., and Whitfield, A.K. (2011). Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94(4): pp.306–314.
- Entwistle, E. M. (2018). Anthropogenic Nitrogen Deposition and Decomposer Fungi: Altered Composition and Function Fosters Greater Soil Carbon Storage. *Applied and*

- Environmental Microbiologi*, 84(9): pp. 63-123
- Fass, R. J., and Bernishan, J. (1979). Effect of Divalent Cation Concentrations on the Antibiotic Susceptibility of Nonfermenters Other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 16(4):pp.434–438.
- Fengxue, X., Dong, Welliang, Dai, Z. D., Jiang, Y., Yan, W., Lv, Z., Fang, Y., and Jiang, M. (2019). Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. pp. 207–232. USA, Elsevier. DOI:10.1016/B978-0-444-64085-7.00009-5
- Jain, P., and Pundir, R. (2011). Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. *Journal of Agricultural Technology*, 7(2): pp. 247–269.
- Maulana, I.A., Triatmoko B., Nugraha, A.S.N., 2020. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Tanaman Senggugu (*Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research (JPSCR)*, 5(1): pp. 01-11. 10.20961/jpscr.v5i1.32200
- Mu'azzam, K. A. A., Taufiq, M., Azlina, N. I., Noorahzira, S., and Darah, I. (2015). Screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolated from different leaf age of *Curcuma mangga* using different growth media. *International Journal of Research In Medical and Health Sciences*, 4(9): pp. 24-28
- Mujeeb, F. B. P., and Oathak, N. (2014). Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Research International*, 13(52):pp.791-800.
- Mustaqof, A., Wiharto, and Suryani, E. (2015). Sistem Pakar untuk Mendiagnosis Penyakit Infeksi Menggunakan Forward Chaining. *Jurnal ITSMART*, 4(1): pp.43-47.
- Nagwa, E. A., Kassem, H. A., Hamed, M. A., El-Feky, A. M., Elnaggar, M. A. A., Mahmoud, K., and Ali, M. A. (2018). Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *Trichoderma viride*. *Journal of Fungi Biology*, 9(1): pp.70–80.
- Nursidika, P., Opstari, S., and Nurul, R. (2014). Aktivitas Antimikrob Fraksi Ekstrak Etanol Buah Pinang (*Areca catechu* L) pada Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. *Majalah Kedokteran Bandung*, 46(2):pp.94–99.
- Pamungkas, F.B, Triatmoko, B., and Nugraha, A. S. 2021. Penelusuran Dan Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo Serta Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Universitas Jember. *Jurnal Kefarmasian Indonesia*, 19(1): pp. 73-79.
- Pepper, I. L., and Gentry, T. (2015). Earth Environment, 3rd edition. *Environmental microbiology*, pp. 59–88. USA, Elsevier.
- Queve, C. L., Plano, R. W., Pantuso, T., and Bannett, B. C. (2008). Effect of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm, formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 118(3): p.418–428.
- Savitri, G. R., Triatmoko. B., and Nugraha. A. S. 2020. Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research (JPSCR)*. 5(1): pp. 22-32. 10.20961/jpscr.v5i1.32206
- Stuart B. L. (2014). *The antimicrobial paradox: How miracle drugs are destroying the miracle*. New York: Plenum Press.
- Sepcic, K., Zalar, P., and Gunde-Cimerman, N. (2011). Low Water Activity Induces the Production of Bioactive Metabolites in Halophilic and Halotolerant Fungi. *Marine Drugs*, 9(1): pp. 43–58.
- Sharifa, A. A., Jamaludin, J., Kiong, L. S., Chia, L. A., and Osman, K. 2012. Anti-Urolithiatic Terpenoid Compound from Malaysiana, 41(1): pp.33-39

- Sundari, I. (2010). Identifikasi Senyawa dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah *IDENTIFIKASI (Pandanus conoideus Lamk.)*. Skripsi: Universitas Sebelas Maret, Surakarta
- Taslim, E. T. and T. T. Maskoen. 2016. Pola kuman terbanyak sebagai agen penyebab infeksi di intensive unit pada beberapa rumah sakit di Indonesia. *Anesthesia & Critical Care*.34(1): pp.56–62.
- Volk, W., and Wheeker, M. (1971). *Basic Microbiology 6th edition*. Harper & Row Publisher.
- WHO. (2017). Indonesia : Who Statistical Profile. World Health Organization on Behalf of the Special Progre for Research and Training in Tropical Diseases. Available from: <https://apps.who.int/iris/rest/bitstreams/1081066/retrieve> [Accessed 31 January 2020]
- Wibowo, M., Julianti, E., and Muhammad, R. (2017). Isolation and Antibacterial of Soil-derived Fungi from Taman Botani Negara Shah Alam Malaysia. *Acta Pharmaceutica Indonesia*, 42(1): pp. 18-24.
- Zaman, S., Hossain, N., and Yasir Arafat, S. (2017). Management of newborn infection: Knowledge and attitude among health care providers of selected sub-district hospitals in Bangladesh. *IJPPH*, 1(2):pp.127–132.



© 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International (CC BY-SA 4.0) license (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).