

Isolasi Fungi Tanah Muara Desa Katialada Gorontalo dan Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*

Isolation of Soil Fungi in the Estuary of Katialada Gorontalo and Screening of Antibacterial Activity Against Staphylococcus aureus

Nafa Rosyida Zanuba¹, Muhammad Zainul Arifin², Saeful Akhmad Tauladani^{2,3}, Gani Asri Muharam⁴, Asia Asia⁵, Bawon Triatmoko¹, Lestyo Wulandari¹ dan Ari Satia Nugraha^{1*}

¹Drug Utilisation Discovery Research Group, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember, Jawa Timur

²Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung, Bitung, Sulawesi Utara

³Australian National Centre for Ocean Resources and Security (ANCORS), University of Wollongong, Wollongong, New South Wales, Australia

⁴Balai Pendidikan dan Pelatihan Perikanan Aertembaga, Bitung, Sulawesi Utara

⁵Politeknik Kelautan dan Perikanan Bone, Bone, Sulawesi Selatan

*Corresponding author: arisatia@unej.ac.id

Diterima: 31 Juli 2024; **Disetujui:** 28 Juni 2025; **Dipublikasi:** 14 Juli 2025

Abstrak

Penyalahgunaan antibiotik sebagai agen terapi pada infeksi dapat memberikan ancaman resistensi antibiotik yang mengakibatkan efektivitas pengobatan menjadi kurang optimal. Untuk mengatasi persoalan tersebut, banyak penelitian dilakukan untuk mencari agen antibakteri baru dari bahan alam seperti fungi tanah sebagai pengujian antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri dari metabolit sekunder fungi tanah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan melalui nilai persen penghambatan. Penelitian ini menggunakan metode mikrodilusi untuk mengetahui besaran aktivitas antibakteri pada sampel fungi tanah. Fungi tanah didapatkan dari sampel tanah yang diambil dari desa Katialada, Gorontalo dengan kode lokasi BTG-6 dan dikultur pada media PDA dan diisolasi pada media PDA baru hingga didapatkan 11 isolat tunggal. Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode uji antagonis pada 11 isolat dengan hasil enam isolat diantaranya memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Keenam isolat tersebut akan dilakukan fermentasi dan ekstraksi menggunakan etil asetat untuk mendapatkan ekstrak yang akan digunakan pada pengujian antibakteri menggunakan metode mikrodilusi. Hasil pengujian menunjukkan keenam isolat memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji dan direpresentasikan melalui persen penghambatan pada masing-masing isolat sebesar IS2-BTG6-1-1 sebesar $34,6 \pm 2,4\%$; IS3-BTG6-1-3-2 sebesar $42,8 \pm 3,1\%$; IS2-BTG6-3-3 sebesar $41,1 \pm 4,4\%$; IS3-BTG6-1-2-1 sebesar $41,8 \pm 2,9\%$; IS3-BTG6-1-2-2 sebesar $47,8 \pm 2,6\%$; IS2-BTG6-3-3 sebesar $59,2 \pm 4,8\%$.

Kata kunci: Antibakteri; Fungi tanah muara; *Staphylococcus aureus*

Abstract

Misuse of antibiotics as therapeutic agents in infectious diseases can threaten antibiotic resistance, reducing the effectiveness of treatment. To overcome this problem, many studies

have been carried out to find new antibacterial agents from natural materials such as soil fungi. This study aims to determine the antibacterial potential of secondary metabolites of soil fungi against *Staphylococcus aureus*, as represented by the percentage of inhibition. This research was initiated by culturing soil fungus samples taken from Katialada village, Gorontalo, location three, on PDA media and isolating them on new PDA media until 11 single isolates were obtained. Initial screening of antibacterial activity was carried out using the antagonist test method, with the results showing that six isolates had antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. The six isolates will be fermented and extracted using ethyl acetate to obtain an extract that will be used in the antibacterial microdilution method. The test results showed that the isolates had antibacterial activity and were represented by the percent inhibition on each isolate of IS2-BTG6-1-1 of $34.6 \pm 2.4\%$; IS3-BTG6-1-3-2 of $42.8 \pm 3.1\%$; IS2-BTG6-3-3 was $41.1 \pm 4.4\%$; IS3-BTG6-1-2-1 of $41.8 \pm 2.9\%$; IS3-BTG6-1-2-2 was $47.8 \pm 2.6\%$; IS2-BTG6-3-3 was $59.2 \pm 4.8\%$.

Keywords: Antibacterial; Estuarine soil fungi; *Staphylococcus aureus*

1. PENDAHULUAN

Prevalensi penyakit infeksi pada tahun 2019 mencapai angka kematian 76,3 dari 100.000 populasi dan merupakan sepuluh besar penyebab kematian terbanyak yang terjadi di Indonesia (WHO, 2020). Terapi antibiotik dapat digunakan untuk mengendalikan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri (Kapoor *et al.*, 2017). Tantangan terbesar dalam penggunaan antibiotik ialah adanya penyalahgunaan terapi yang dapat memberikan ancaman resistensi antibiotik. Menurut data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2014 angka kematian akibat resistensi antibiotik di seluruh dunia sebesar 700.000 jiwa per tahun dan akan diperkirakan meningkat hingga 10 juta jiwa pada tahun 2050 apabila tidak dikendalikan (WHO., 2018).

Salah satu contoh patogen resisten adalah *Staphylococcus aureus* yang disebut *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) dan telah banyak diketahui resisten terhadap antibiotik golongan β -laktam seperti penisilin, karbapenem, dan sefalosporin (Rasigade & Vandenesch, 2014). Berdasarkan data CDC, MRSA dapat menyebabkan penyakit infeksi pada komunitas seperti infeksi kulit, pneumonia, hingga menyebabkan sepsis dan infeksi pada fasilitas pelayanan kesehatan seperti *bloodstream infection* dan *surgical site infections* (CDC, 2015). Pengembangan antibiotik baru perlu dilakukan untuk mengatasi permasalahan resistensi sebagai upaya untuk mencegah semakin banyaknya jenis bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten. Sumber bahan aktif alami yang berasal dari fungi telah menjadi dasar penemuan awal berbagai antibiotik seperti penisilin, asam fusidat, enniatin C, sefalosporin, asam helvolat, fumagilin, aspergilin, dan pleuromutilin, sehingga dapat dijadikan referensi dalam pengembangan antibiotik baru (Keller, 2019).

Fungi tanah telah banyak dikembangkan dan terbukti mampu menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan beberapa bakteri seperti, *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus subtilis*, dan *Escherichia coli* (Dhanapal *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.*, 2018). Salah satu ekosistem tanah yang berpotensi dalam penemuan senyawa baru dengan keberadaan mikroorganisme khususnya fungi adalah tanah muara, di mana tanah muara memiliki banyak ekosistem hutan bakau yang menjadi pusat keanekaragaman fungi tanah (Loganathachetti *et al.*, 2017). Fungi tanah muara

diketahui kaya akan sumber metabolit aktif fungi yang dapat tumbuh di habitat ekstrem karena adanya perbedaan salinitas, sehingga komunitas fungi pada tanah muara mampu menghasilkan metabolit aktif yang unik untuk mempertahankan hidupnya (Thatoi *et al.*, 2013).

Berdasarkan uraian diatas, menjadi potensi besar pada fungi tanah terutama dari ekosistem ekstrem seperti tanah muara yang kaya akan metabolit sekunder unik dalam penemuan antimikroba baru. Namun, eksplorasi terhadap fungi tanah muara di Indonesia, masih terbatas dan belum banyak didukung oleh data eksperimental yang kuat. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisi kesenjangan tersebut dengan menguji aktivitas antibakteri fungi tanah muara menggunakan metode mikrodilusi fungi tanah sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai agen antibiotik baru dalam mengatasi permasalahan resistensi antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi fungi tanah muara yang berlokasi di Desa Katialada Gorontalo dengan kode lokasi BTG-6 dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri dengan *single concentration* 50 µg/mL pada metode mikrodilusi yang dibuktikan melalui parameter persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Alat dan bahan

Alat yang digunakan untuk melakukan penelitian ini adalah *Laminar Air Flow* (THERMO SCIENTIFIC 1300 SERIES A2, China), *shaker incubator* (B-ONE, China), *autoclave* (B-ONE, China), spektrofotometer UV-Vis (GENESYS, USA), *centrifuge*, destilator, *ultrasonic cleaner*, neraca analitik (OHAUSS, USA), *hot plate* (HEIDOLPH, Germany), mikropipet (Socorex, Switzerland dan Eppendorf, Germany), mikroskop, *microplate reader*, lemari asam, *ultraviolet detector*, *vortex* (GENE-2, USA), *microplate flate bottom 96 wells* (IWAKI, Indonesia). Peralatan lain yang digunakan berupa: tabung reaksi, erlenmeyer (SCHOTT DURAN, Germany), *petri dish* (DURAN, Germany), gelas ukur (DURAN, Germany), 19 *beaker glass* (DURAN, Germany), corong pisah (SCHOTT DURAN, Germany), penyaring dengan pompa vakum, penyemprot reagen, *chamber* KLT, pembakar spiritus, jarum ose, tabung sentrifus (BIOLOGIX, USA), jangka sorong (TRICLE BRAND, China), rak tabung reaksi, vial, mangkok ekstrak, spatula logam, batang pengaduk, kaca preparat, pipet tetes, *disposable syringe*, *syringe filter* 0,45 µm, pinset, dan *spreader*, *yellow tip*, dan *blue tip*.

Bahan-bahan yang digunakan adalah tanah muara Desa Katialada, Kecamatan Kwandang, Kabupaten Gorontalo Utara, Provinsi Gorontalo (Koordinat Google Maps 0°51'10.7"N 122°54'45.0"E); Bakteri *S. aureus* (ATCC 6538), Air laut, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA, India), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA, India), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck, USA), *Potato Dextrose Agar with Chloramphenicol* (PDA W/ Chloramphenicol) (HIMEDIA, India), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (HIMEDIA, India), aqua demineralisata, *sterile water for injection* (WIDATRA, Indonesia), gentamisin sulfat (INDOFARMA, Indonesia) sebagai kontrol positif, etil asetat, larutan NaCl 0,9%, DMSO (EMSURE), CaCl₂ (SIGMA, Germany), MgCl₂ (BRATACO), BaCl₂, H₂SO₄, etanol 70%,

lempeng kromatografi lapis tipis silika gel F₂₅₄, amonia, FeCl₃, vanillin-H₂SO₄ (MERCK, USA), reagen dragendorff, ninhidrin, methanol pa (EMSURE, Germany), diklorometana pa (EMSURE, Germany), asetonitril (EMSURE, Germany), spiritus, *plastic wrap*, kertas saring, dan *aluminium foil*.

2.2. Preparasi media

Media yang digunakan untuk mengkultur jamur adalah media PDA, PDAC, dan PDB. Peremajaan bakteri uji *Staphylococcus aureus* menggunakan media MHA, dan media CAMHB digunakan sebagai basis suspensi bakteri uji dalam pengujian mikrodilusi. Media PDA dibuat dengan menimbang 9,75 g serbuk media dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata. Media PDAC dibuat dengan menimbang 9,75 g serbuk media dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata. Media PDB dibuat dengan menimbang 4,8 g serbuk media dan dilarutkan dalam 200 mL aqua demineralisata. Media MHA dibuat dengan menimbang 8,5 g serbuk media dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata. Media CAMHB dibuat dengan menimbang 1,05 g serbuk media dan dilarutkan dalam 50 mL aqua demineralisata, kemudian ditambahkan kation Mg²⁺ dan Ca²⁺ dari CaCl₂ sebanyak 225 µL MgCl₂ dan 450 µL CaCl₂ ke dalam MHB. Seluruh media yang telah dibuat perlu disterilkan dengan panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.3. Preparasi sampel tanah

Sampel tanah dari desa katialada Gorontalo merupakan tanah muara dengan kondisi lingkungan *ekstreme* seperti perbedaan salinitas yang tinggi dapat menghasilkan mikrobiota tanah yang mampu beradaptasi terhadap kondisi tersebut. Tanah diambil 10 g pada kedalaman 10 cm dari atas permukaan tanah. Sebanyak 1 g tanah dilarutkan menggunakan air steril sebanyak 10 mL dan dihomogenkan menggunakan *vortex shaker* selama 2 menit. Suspensi tanah disentrifugasi dengan kecepatan 1.000 rpm selama 10 menit dan secara aseptis diambil supernatan sebanyak 100 µL. Supernatan yang didapatkan disebar pada media PDA menggunakan *spreader* lalu diinkubasi pada suhu ruangan 28 ± 2°C selama 7 hari.

2.4. Isolasi fungi tanah muara

Proses isolasi fungi dari tanah muara dilakukan untuk memperoleh satu jenis fungi murni (isolat tunggal). Langkah ini dimulai dengan memilih koloni fungi yang memiliki ciri morfologi berbeda dari media tumbuh sebelumnya. Koloni yang berbeda-beda kemudian dipindahkan ke beberapa media PDA (Potato Dextrose Agar) baru menggunakan jarum ose. Setelah diinkubasi selama 7 hari, isolat yang tumbuh dipindahkan lagi ke media PDA yang mengandung antibiotik kloramfenikol untuk memastikan bahwa isolat yang diperoleh benar-benar merupakan fungi dan tidak terkontaminasi oleh bakteri.

2.5. Uji antagonis

Uji antagonis dilakukan dengan menggunakan metode *agar plug diffusion* untuk melihat potensi antibakteri yang dihasilkan dari masing-masing isolat fungi tanah. Tahap persiapan pengujian diperlukan suspensi bakteri yang dibuat dengan mengambil sejumlah koloni bakteri

dan disuspensikan menggunakan pelarut NaCl fisiologis 0,9%. Proses pengujian dimulai dari pengambilan *plug* atau cakram media yang berisi isolat fungi menggunakan sumuran dan dikontakkan di atas media MHA yang telah ditumbuhkan suspensi bakteri *S. aureus*.

2.6. Fermentasi dan ekstraksi metabolit sekunder fungi

Fermentasi dilakukan menggunakan metode batch dengan memasukkan lima *plug* atau cakram isolat fungi kedalam 200 mL media PDB yang selanjutnya diinkubasi dalam *shaker incubator* pada suhu 28 °C selama 14 hari. Proses ekstraksi dilakukan dengan cara partisi cair-cair, dimana pelarut etil asetat ditambahkan dengan perbandingan 1:1 kedalam media hasil fermentasi yang telah disaring sehingga terbentuk dua fase yang tidak saling campur. Ekstraksi dilakukan sebanyak tiga kali replikasi dengan memisahkan campuran dari fase air dan fase etil asetat yang mengandung ekstrak fungi tanah. Fase etil asetat ditampung kemudian diuapkan pelarutnya pada ruang terbuka sehingga terbentuk ekstrak organik dari fungi tanah dan dihitung rendemennya.

2.7. Skrining kandungan senyawa kimia

Proses skrining kandungan senyawa kimia pada ekstrak yang didapat dilakukan dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Golongan senyawa yang dideteksi dalam penelitian ini adalah alkaloid dan terpenoid. Ekstrak isolat fungi ditotolkan Sebanyak 4 µL pada lempeng silika gel F₂₅₄ dan dielusi menggunakan fase gerak diklorometana : metanol (9,5 : 0,5). Pendeteksian golongan senyawa dilakukan dengan penyemprotan reagen Dragendorff untuk mendeteksi alkaloid dan reagen vanilin-sulfat untuk mendeteksi senyawa golongan steroid atau terpenoid.

2.8. Uji mikrodilusi

Pengujian mikrodilusi pada penelitian ini mengacu pada CLSI M07-A09 (CLSI, 2012) didesain menggunakan *microplate* dan menggunakan standar konsentrasi ekstrak isolat 50 µg/mL. Dalam proses pengujian dibutuhkan suspensi bakteri dalam media CAMHB, kelompok perlakuan, kontrol ekstrak, kontrol negatif ekstrak, kontrol positif, kontrol gentamisin, kontrol negatif gentamisin, kontrol DMSO dan kontrol media dalam microplate 96-well. Konsentrasi suspensi bakteri *S. aureus* yang dignakan adalah 1x10⁶ CFU dalam media CAMHB. Setiap sumuran diisi dengan 50 µL suspensi bakteri dalam CAMHB, yang kemudian ditambahkan larutan ekstrak uji, kontrol positif, atau kontrol negatif sebanyak 50 µL. Kelompok perlakuan berisi 50 µL ekstrak etil asetat fungi tanah dalam DMSO 1% + 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak berisi 50 µL ekstrak etil asetat fungi tanah dalam DMSO 1% + 50 µL media CAMHB tanpa bakteri. Kontrol negatif ekstrak berisi 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB + 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol positif berisi 50 µL gentamisin + 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin berisi 50 µL gentamisin + 50 µL media CAMHB tanpa bakteri. Kontrol negatif gentamisin berisi 50 µL media CAMHB tanpa bakteri + 50 µL bakteri dalam CAMHB. Kontrol DMSO berisi 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB + 50 µL media CAMHB tanpa bakteri. Kontrol media yang digunakan adalah media CAMHB sebanyak 100 µL.

2.9. Analisis data

Data yang didapat dalam pengujian ini adalah nilai absorbansi hasil pengujian antibakteri menggunakan mikrodilusi. Data absorbansi akan dimasukkan dalam rumus persentase penghambatan menggunakan Persamaan 1.

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

Persamaan 1. Perhitungan nilai persentase penghambatan uji antibakteri pada fungi tanah muara Desa Katialada. *Keterangan* = Absorbansi (Abs), Kontrol negatif ekstrak/gentamisin (A), Kontrol DMSO 1% atau media CAMHB (B), Larutan uji ekstrak/gentamisin (C), Kontrol ekstrak/gentamisin (D).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Isolasi dan identifikasi sampel fungi tanah

Isolasi fungi tanah muara dilakukan menggunakan media PDA dan PDAC. Media PDA mengandung sari pati kentang dan dextrose yang cocok untuk pertumbuhan fungi dan mampu mendorong perkembangbiakan fungi (Nevalainen *et al.*, 2014). PDAC merupakan media PDA yang mengandung *Chloramphenicol* sebagai antibakteri, dengan tujuan untuk mencegah adanya kontaminasi pertumbuhan bakteri pada hasil kultur (Black, 2020). Penggunaan PDAC bertujuan agar isolat fungi yang didapatkan murni dan tidak disertai pertumbuhan bakteri didalamnya. Isolasi dalam penelitian ini merupakan proses untuk mendapatkan isolat dengan pemisahan hasil kultur fungi berdasarkan jenis koloni yang terbentuk pada media selama masa inkubasi. Isolat fungi yang didapatkan dari proses isolasi merupakan hasil penumbuhan kembali pada media PDAC serta dapat teridentifikasi secara makroskopis dan mikroskopik. Dari hasil kultur fungi awal didapatkan tiga jenis koloni berbeda selama masa inkubasi yang selanjutnya diisolasi sehingga hanya terdapat satu jenis koloni yang tumbuh pada satu *petri dish*. Gambar 1 menunjukkan 3 jenis koloni pada kultur awal yang akan diisolasi untuk mendapatkan isolat fungi.

Terdapat hasil isolasi 11 isolat fungi tanah muara Desa Katialada pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan masing-masing kode penamaan (Gambar 2). Isolat diidentifikasi secara makroskopis dan mikroskopis untuk menentukan jenis fungi khamir dan kapang.

Identifikasi makroskopis dilakukan berdasarkan penginderaan mata yang dideskripsikan pada Tabel 1 dengan parameter warna dan tekstur dari isolat fungi yang tumbuh. Identifikasi secara mikroskopis digunakan untuk mengetahui jenis sel fungi dibawah mikroskop (Gambar 3). Hasil identifikasi menunjukkan terdapat dua fungi kapang yang ditandai dengan adanya hifa sejati yang merupakan ciri khas dari fungi, dan 9 fungi khamir yang memiliki bentuk sel yang oval atau membulat dan tidak memiliki sel miselium (Reddy *et al.*, 2014).

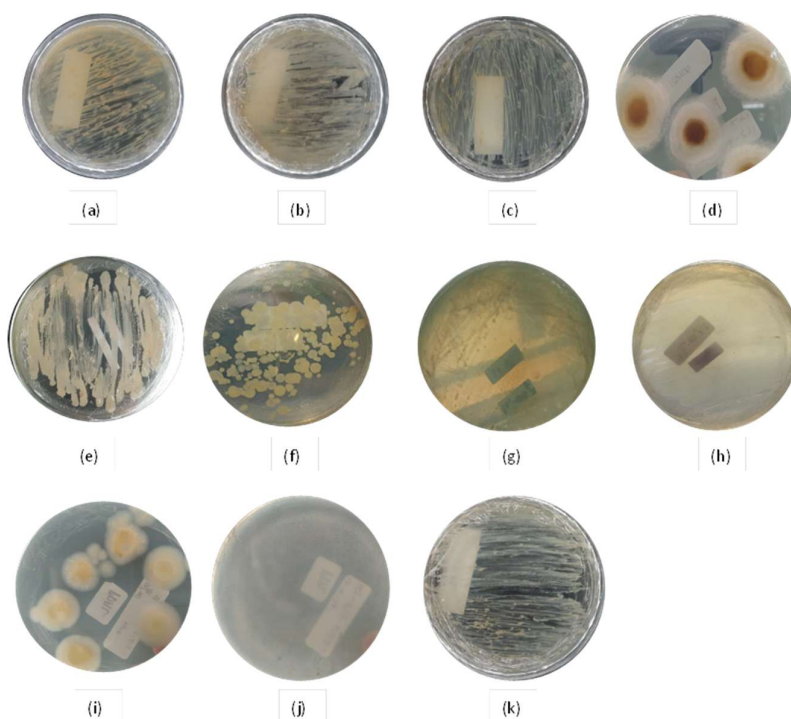
3.2. Skrining aktivitas antibakteri dengan uji antagonis

Uji antagonis dilakukan sebagai skrining awal adanya aktivitas antibakteri pada 11 isolat fungi. Hasil uji antagonis merupakan acuan sampel pada pengujian antibakteri selanjutnya menggunakan mikrodilusi. Parameter pada uji antagonis adalah diameter zona hambat yang ditandai dengan ada atau tidaknya zona bening disekitar isolat. Adanya zona bening

mengindikasikan bahwa isolat fungi tanah mengekskresikan metabolit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, sedangkan tidak adanya zona bening di sekitar isolat fungi diindikasikan bahwa jumlah metabolit sekunder yang dihasilkan belum mencukupi atau tidak terdapat metabolit sekunder yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Balouiri *et al.*, 2016). Hasil yang menunjukkan dari 11 isolat fungi terdapat 6 isolat fungi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* (Tabel 2).



Gambar 1. Kultur awal fungi tanah muara Desa Katialada pada media Potato Dextrese Agar (PDA).



Gambar 2. Hasil isolasi fungi tanah muara Desa Katialada pada media Potato Dextrese Agar (PDA). Keterangan = (a) IS2-BTG6-1-1, (b) IS3-BTG6-1-2-1, (c) IS3-BTG6-1-2-2, (d) IS3-BTG6-1-3-1, (e) IS3-BTG6-1-3-2, (f) IS3-BTG6-1-4, (g) RE IS1-BTG6-2, (h) IS2-BTG6-3-1, (i) IS3-BTG6-3-2-1, (j) IS3-BTG6-3-2-2, (k) IS2-BTG6-3-3.

Tabel 1. Karakteristik makroskopis isolat fungi tanah muara Desa Katialada.

Kode isolat fungi	Ciri-Ciri Makroskopis
IS2-BTG6-1-1	Warna kuning sedikit kecoklatan, bertekstur halus.
IS3-BTG6-1-2-1	Warna putih kekuningan, bertekstur kasar, terdapat serabut di bagian tepi.
IS3-BTG6-1-2-2	Warna putih kekuningan, bertekstur halus.
IS3-BTG6-1-3-1	Seluruh permukaan koloni tertutup oleh hifa berwarna putih.
IS3-BTG6-1-3-2	Berwarna putih kekuningan, bertekstur kasar, koloni tumbuh membentuk bulatan kecil.
IS3-BTG6-1-4-1	Warna putih kekuningan, membentuk lapisan serabut pada bagian atas jamur, tumbuh terpisah pisah.
RE IS1-BTG 6-2	Berwarna putih kekuningan, sedikit keruh dan bertekstur halus.
IS2-BTG6-3-1	Berwarna putih kekuningan, keruh, dan bertekstur halus
IS3-BTG6-3-2-1	Spora berwarna kuning dan dikelilingi hifa berwarna putih.
IS3-BTG6-3-2-2	Berwarna putih keruh, bertekstur halus
IS2-BTG6-3-3	Berwarna putih kekuningan, bertekstur kasar terdapat bentuk menyerupai serbuk.

3.3. Fermentasi dan ekstraksi metabolit sekunder

Fermentasi merupakan proses memperbanyak biomassa dan produksi metabolit fungi tanah yang dapat dipengaruhi oleh lama waktu fermentasi, pH, dan suhu (Ramar *et al.*, 2019). Waktu fermentasi dipilih pada saat akhir fase logaritmik dan awal pertumbuhan stasioner pada fungi yakni antara 7-14 hari, dan dipilih hari ke-14 karena fungi dapat menghasilkan metabolit secara maksimal pada hari ke-14 (Bhattacharyya & Jha, 2011). Pada hari ke-14 fungi memasuki fase stasioner atau fase stagnan dimana terdapat akumulasi pertumbuhan fungi dan menipisnya nutrisi yang memungkinkan sel fungi menghasilkan bioproduk yang berguna untuk mempertahankan hidupnya, perubahan bentuk fungi dan warna media yang terjadi saat proses fermentasi juga menunjukkan bahwa fungi telah menghasilkan metabolit sekunder (Swapna & Lalh, 2017). Proses fermentasi isolat fungi tanah selama 14 hari mampu menghasilkan metabolit-metabolit sekunder yang kemudian akan diekstraksi dengan pelarut organik etil asetat untuk didapatkan ekstrak. Proses ekstraksi dilakukan untuk memisahkan komponen senyawa analit dari sampel menggunakan pelarut yang sesuai. Perolehan rendemen isolat hasil ekstraksi fungi tanah muara Desa Katialada disajikan pada Tabel 3.

3.4. Skrining kandungan kimia

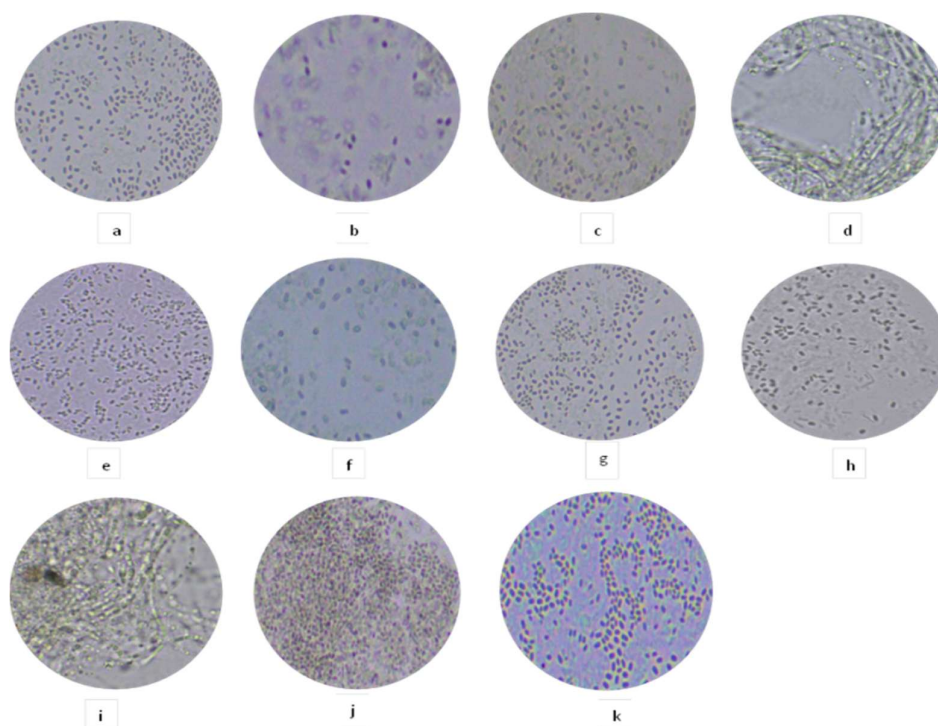
3.4.1. Deteksi golongan alkaloid

Reagen Dragendorff digunakan sebagai penampak noda pada lempeng KLT yang telah dielusi untuk menunjukkan ada atau tidaknya senyawa alkaloid. Hasil pewarnaan dengan Dragendorff pada lempeng KLT dapat dilihat pada Gambar 4. Senyawa alkaloid akan ditunjukkan munculnya noda jingga pada KLT (Shaikh & Patil, 2020). Noda berwarna jingga yang tidak muncul dalam penelitian ini menunjukkan, tidak ada isolat yang memiliki senyawa alkaloid. Hal ini dapat disebabkan tidak ada alkaloid yang tertarik pada saat ekstraksi atau sedikitnya jumlah alkaloid yang dihasilkan pada saat proses fermentasi berlangsung. Penelitian yang dilakukan oleh (Widyawati *et al.*, 2014) menunjukkan bahwa golongan senyawa alkaloid

banyak ditarik oleh pelarut polar seperti air, metanol, dan etanol. Pelarut semi polar seperti etil asetat dan pelarut non polar seperti n-heksana hanya sedikit menarik senyawa golongan alkaloid. Hal tersebut dikarenakan alkaloid memiliki banyak jenis dengan sifat polaritas yang berbeda-beda, sehingga diperlukan pengujian lebih lanjut untuk ekstraksi menggunakan pelarut dengan sifat polaritas yang berbeda untuk mencoba menarik senyawa golongan alkaloid.

Tabel 2. Hasil uji antagonis isolat fungi tanah muara desa Katialada. Keterangan = Terdapat zona bening (+), Tidak terdapat zona bening (-).

Kode isolat fungi	Hasil Uji	Diameter Zona Hambat (mm)
IS2-BTG6-1-1	+	14,53
IS3-BTG6-1-2-1	+	10,55
IS3-BTG6-1-2-2	+	14,45
IS3-BTG6-1-3-1	-	-
IS3-BTG6-1-3-2	+	15,10
IS3-BTG6-1-4-1	-	-
IS3-BTG6-1-4-2	-	-
RE IS1-BTG 6-2	-	-
IS2-BTG6-3-1	-	-
IS3-BTG6-3-2-1	+	8,82
IS3-BTG6-3-2-2	-	-
IS2-BTG6-3-3	+	15,27



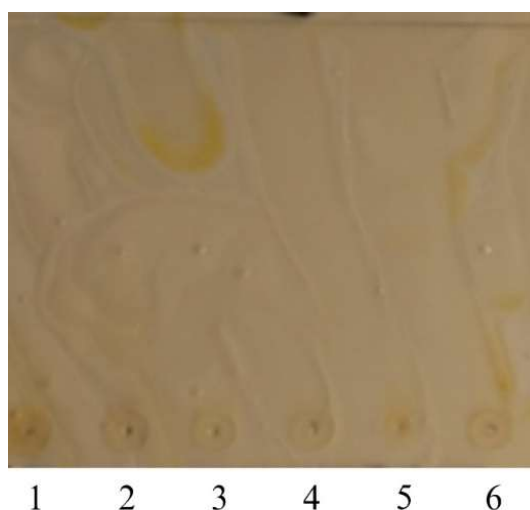
Gambar 3. Hasil mikroskopis isolat fungi tanah muara Desa Katialada pada media Potato Dextrose Agar (PDA). Keterangan = (a) IS2-BTG6-1-1, (b) IS3-BTG6-1-2-1, (c) IS3-BTG6-1-2-2, (d) IS3-BTG6-1-3-1, (e) IS3-BTG6-1-3-2, (f) IS3-BTG6-1-4, (g) RE IS1-BTG6-2, (h) IS2-BTG6-3-1, (i) IS3-BTG6-3-2-1, (j) IS3-BTG6-3-2-2, (k) IS2-BTG6-3-3.

Tabel 3. Hasil rendemen ekstrak fungi tanah muara Desa Katialada.

Kode Isolat Fungi	Volume Media	Bobot ekstrak (g)	% Rendemen
IS2-BTG6-1-1	180	0,0079	0,0044
IS3-BTG6-1-2-1	178	0,2039	0,1145
IS3-BTG6-1-2-2	182	0,0150	0,0082
IS3-BTG6-1-3-2	169	0,0190	0,0112
IS3-BTG6-3-2-1	179	0,0074	0,0041
IS2-BTG6-3-3	185	0,0300	0,0162

3.4.2. Deteksi golongan terpenoid

Reagen Vanilin-Sulfat dapat digunakan untuk mendeteksi beberapa senyawa diantaranya senyawa steroid atau terpenoid dan fenolat. Gambar 5, menunjukkan hasil pewarnaan menggunakan reagen Vanilin-Sulfat. Hasil tersebut menunjukkan adanya noda berwarna ungu, dimana munculnya noda ungu menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid atau steroid dalam isolat tersebut, dan tidak terdapat senyawa golongan fenolat karena tidak menunjukkan adanya noda berwarna merah muda (Parwanto & Wibowo, 2015). Dari semua isolat yang telah diuji, semua isolat menunjukkan adanya senyawa terpenoid.

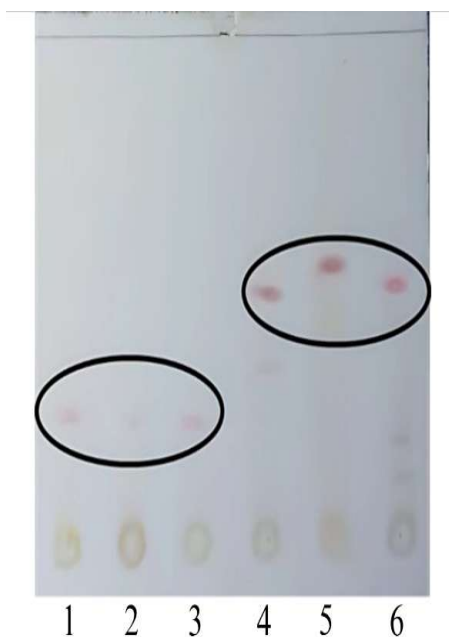


Gambar 4. Hasil deteksi golongan senyawa alkaloid pada ekstrak fungi tanah muara Desa Katialada. *Keterangan* = (1) IS2-BTG6-1-1, (2) IS3-BTG6-1-2-1, (3) IS3-BTG6-1-2-2, (4) IS3-BTG6-1-3-2, (5) IS3-BTG6-3-2-1, (6) IS2-BTG6-3-3.

3.5. Uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi

Uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi dilakukan untuk mengetahui persentase penghambatan ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara Desa Katialada terhadap bakteri uji *S. aureus*. Media yang direkomendasikan oleh CLSI dalam pengujian adalah media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB). Penggunaan CAMHB bertujuan untuk standarisasi kadar kation seperti Mg^{2+} dan Ca^{2+} , karena dengan adanya penambahan kation pada media MHB dapat meningkatkan integritas dinding sel bakteri sehingga bakteri tidak mudah mengalami resistensi dan dapat dihambat pertumbuhannya dengan lebih efektif (Hackel *et al.*, 2019).

Penggunaan kontrol positif dan negatif bertujuan sebagai acuan untuk menilai validitas hasil pengujian. Dalam studi ini, gentamisin dipilih sebagai kontrol positif karena merupakan antibiotik yang telah terbukti efektif, sedangkan DMSO digunakan sebagai kontrol negatif karena tidak memiliki aktivitas antimikroba. Mengacu pada pedoman dari Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), kontrol positif yang digunakan harus mampu menghasilkan tingkat penghambatan minimal sebesar 80% dalam metode uji mikrodilusi, sehingga dapat memastikan bahwa metode uji yang diterapkan berjalan dengan baik dan hasilnya dapat dipercayai (CLSI, 2012). Hasil persentase penghambatan dari uji aktivitas antibakteri metode mikrodilusi ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara Desa Katialada terhadap bakteri uji *S. aureus* (Tabel 4), pada pengujian ini Gentamisin dengan konsentrasi 1 µg/m digunakan sebagai kontrol positif yang memiliki nilai persentase penghambatan sebesar 99,3 %. Konsentrasi 1% DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dalam pengujian mikrodilusi. Dari hasil uji mikrodilusi kali ini DMSO sebagai kontrol negatif diketahui memiliki persen penghambatan sebesar 8,5 % hal tersebut sesuai dengan teori yang menyatakan bahwa DMSO merupakan kosolven jenis surfaktan yang mampu memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri (Kirkwood *et al.*, 2018). Nilai persentase penghambatan DMSO tidak mempengaruhi besarnya persentase penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah, karena pada rumus perhitungan persen penghambatan DMSO telah menjadi pengurang, sehingga besarnya persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara sudah bersih dari persen penghambatan DMSO terhadap bakteri uji. Larutan uji yang digunakan adalah larutan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah dengan konsentrasi 50 µg/mL yang dilarutkan pada media CAMHB dengan bantuan kosolven DMSO 1%.



Gambar 5. Hasil deteksi golongan senyawa Terpenoid pada ekstrak fungi: (1) IS2-BTG6-1-1, (2) IS3-BTG6-1-2-1, (3) IS3-BTG6-1-2-2, (4) IS3-BTG6-1-3-2, (5) IS3-BTG6-3-2-1, (6) IS2-BTG6-3-3.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas penghambatan oleh keenam ekstrak etil asetat fungi tanah dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus*. Nilai persen penghambatan secara berurutan dari terbesar hingga terkecil adalah IS2-BTG6-3-3 ($59,2 \pm 4,8\%$), IS3-BTG6-1-2-2 ($47,8 \pm 2,6\%$), IS3-BTG6-1-3-2 ($42,8 \pm 3,1\%$), IS3-BTG6-1-2-1 ($41,8 \pm 2,9\%$), IS2-BTG6-3-2-1 ($41,1 \pm 4,4\%$), dan IS2-BTG6-1-1 ($34,6 \pm 2,4\%$). Adanya perbedaan hasil persen penghambatan pada masing-masing ekstrak dapat terjadi karena adanya perbedaan kandungan golongan senyawa yang berperan dalam antibakteri serta jumlah senyawa yang terkandung didalam masing-masing ekstrak. Hasil persentase penghambatan pada ekstrak dengan kode IS2-BTG6-3-3 memiliki nilai terbesar yang berbanding lurus dengan besarnya zona hambat pada saat dilakukan uji antagonis. IS2-BTG6-3-3 memiliki persen penghambatan lebih dari 50%, yang artinya diduga *inhibitory concentration* (IC50) berada kurang dari 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CLSI, 2012), sehingga hal ini dapat diteliti lebih lanjut untuk penentuan IC50 dari isolat tersebut. Ekstrak dengan kode IS2-BTG6-1-1 memiliki persentase penghambatan terkecil (Tabel 3) yang berbanding lurus terhadap jumlah rendemen ekstrak yang paling kecil diantara semua ekstrak, hal tersebut diduga bahwa jumlah senyawa metabolit sekunder pada ekstrak yang dihasilkan sedikit dan tidak terlalu poten dalam aktivitas menghambat bakteri uji.

Hasil skrining kandungan senyawa ekstrak yang didapatkan, semua ekstrak menunjukkan adanya senyawa golongan terpenoid. Beberapa metabolit sekunder fungi salah satunya terpenoid dikenal umum memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa bisabolane yang merupakan sesquiterpenoid menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri salah satunya adalah *S. aureus* (Jiang *et al.*, 2020). Terpenoid dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba dengan menghambat proses biosintesis bakteri dan mengganggu membran lipid sehingga menyebabkan kebocoran dari liposom bakteri (Mujeeb *et al.*, 2014). Senyawa terpenoid pada enam ekstrak etil asetat fungi tanah muara diduga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Namun, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk benar-benar memastikan golongan senyawa apa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Tabel 4. Perentase penghambatan kontrol positif, kontrol negatif, dan ekstrak etil asetat fungi tanah muara Desa Katialada.

Kontrol dan Kode Fungi	Konsentrasi	Rerata penghambatan pertumbuhan bakteri (%)	SD (%)	CV (%)
Kontrol Positif (Gentamisin)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	99,3 %	0,6	06
Kontrol negatif (DMSO)	1 %	8,5 %	1,1	13,4
IS2-BTG6-1-1	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	34,6	2,4	7,0
IS3-BTG6-1-2-1	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	42,8	3,1	7,2
IS3-BTG6-1-2-2	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41,1	4,4	10,7
IS3-BTG6-1-3-2	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	41,8	2,9	6,9
IS3-BTG6-3-2-1	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	47,8	2,6	5,4
IS2-BTG6-3-3	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	59,2	4,8	8,2

4. KESIMPULAN

Sebanyak 11 isolat fungi tanah muara mangrove berhasil dikultur dan menunjukkan karakteristik 9 fungi khamir dan dua fungi kapang. Dari 11 isolat terdapat enam isolat yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dibuktikan dengan hasil uji antagonis dan mikrodilusi. Dari hasil uji mikrodilusi, aktivitas antibakteri terbesar dimiliki oleh IS2-BTG6-1-1 dan dilanjutkan secara berurutan IS3-BTG6-1-3-2, IS2-BTG6-3-3, IS3-BTG6-1-2-1, IS3-BTG6-1-2-2, IS2-BTG6-3-3. Pada keenam ekstrak. Isolat IS2-BTG6-1-1 memiliki % penghambatan di atas 50%, artinya nilai IC_{50} kedua ekstrak tersebut ada di bawah 100 $\mu\text{g/mL}$. Untuk mendapatkan senyawa antibakteri baru, diperlukan adanya penilitan lanjutan terkait determinasi keenam spesies fungi serta isolasi senyawa yang bereperan sebagai antibakteri.

UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terima kasih ditujukan kepada Drug Utilisation Discovery Research Group, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, dan Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung atas dukungan fasilitas penelitian antibakteri.

DEKLARASI KONFLIK KEPENTINGAN

Semua penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan terhadap naskah ini

DAFTAR PUSTAKA

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bhattacharyya, P., & Jha, D. K. (2011). Optimization of cultural conditions affecting growth and improved bioactive metabolite production by a subsurface *Aspergillus* strain. *Int. j. Appl. Biol. Pharm*, 2(4), 133–143.
- Black, W. D. (2020). A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia. *Plos One*, 15(12), e0238901.
- CDC. (2015). *Staphylococcus aureus in Healthcare Settings*. Centers for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/staphylococcusaureus/about/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/hai/organisms/staph.html [Accessed 15th June 2022].
- CLSI. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32, Issue 2).
- Dhanapal, T., Ram Kumar, A., Ramar, R., Balakumar, B., & Kumaresan, S. (2018). IN VITRO ANTI-BACTERIAL ACTIVITY OF THE SOIL FUNGAL METABOLITES. *International Research Journal Of Pharmacy*, 9(11), 175–181. DOI:[10.7897/2230-8407.0911279](https://doi.org/10.7897/2230-8407.0911279).
- Hackel, M. A., Tsuji, M., Yamano, Y., Echols, R., Karlowsky, J. A., & Sahm, D. F. (2019). Reproducibility of broth microdilution MICs for the novel siderophore cephalosporin, cefiderocol, determined using iron-depleted cation-adjusted Mueller-Hinton broth. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 94(4), 321–325.
- Jiang, M., Wu, Z., Guo, H., Liu, L., & Chen, S. (2020). A Review of Terpenes from Marine-Derived Fungi: 2015–2019. *Marine Drugs*, 18(6). <https://doi.org/10.3390/md18060321>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*,

- 33(3), 300.
- Keller, N. P. (2019). Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 167–180.
- Kirkwood, Z. I., Millar, B. C., Downey, D. G., & Moore, J. E. (2018). Antimicrobial effect of dimethyl sulfoxide and N, N-Dimethylformamide on *Mycobacterium abscessus*: Implications for antimicrobial susceptibility testing. *International Journal of Mycobacteriology*, 7(2), 134–136. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_35_18
- Loganathachetti, D. S., Poosakkannu, A., & Muthuraman, S. (2017). Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9.
- Mujeeb, F., Bajpai, P., & Pathak, N. (2014). Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. *BioMed Research International*, 2014, 1–11.
- Nevalainen, H., Kautto, L., & Te'o, J. (2014). Methods for isolation and cultivation of filamentous fungi. *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*, 3–16.
- Parwanto, D., & Wibowo, M. A. (2015). Uji Aktivitas Antioksidan Dan Sitotoksitas Fraksi Daun Kentutan (*Paederia foetida* L.). *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 4(1), 1–6.
- Pinheiro, E. A. A., Pina, J. R. S., Paixão, L. K. O., Siqueira, J. E. S., Feitosa, A. O., Carvalho, J. M., Marinho, P. S. B., Marinho, A. M. R., & others. (2018). Chemical constituents and antimicrobial activity of soil fungus *Aspergillus* sp. FRIZ12. *Revista Virtual de Química*, 10(5), 1438–1445.
- Ramar, R., Dhanapal, T., Ram Kumar, A., Balakumar, B., & Kumaresan, S. (2019). Bio-Activity of Secondary Metabolites Extracted From Soil Fungi. *International Journal of Scientific Research and Reviews*, 8(2), 887–901.
- Rasigade, J.-P., & Vandenesch, F. (2014). *Staphylococcus aureus*: A pathogen with still unresolved issues. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 510–514. DOI: [10.1016/j.meegid.2013.08.018](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.08.018)
- Reddy, C. A., Beveridge, T. J., Breznak, J. A., Marzluf, G. A., Schmidt, T. M., & Snyder, L. R. (2014). Introduction to Mycology. In *Methods for General and Molecular Microbiology* (pp. 925–928). ASM Press.
- Shaikh, J., & Patil, M. (2020). Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. *Internatinal Journal of Chemical Studies*, 8(2), 603–608. <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i2i.8834>
- Swapna, P. K., & Lalach, P. D. (2017). Fungal Biodiversity of a Library and Cellulolytic Activity of Some Fungi. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 78(6), 849–854.
- Thatoi, H., Behera, B. C., & Mishra, R. R. (2013). Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology*, 4(1), 54–71. <https://doi.org/10.1080/21501203.2013.785448>
- WHO. (2018). *Antimicrobial Resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance> [Accessed 15th June 2022].
- WHO. (2020). *The Top 10 Cause Death: Indonesia*. World Health Organization. [who.int/mortality-and-global-health-estimates/leading-cause-of-death](https://www.who.int/mortality-and-global-health-estimates/leading-cause-of-death) [Accessed 15th June 2022].
- Widyawati, P. S., Budianta, T. D. W., Kusuma, F. A., & Wijaya, E. L. (2014). Difference of solvent polarity to phytochemical content and antioxidant activity of *Pluchea indica* less leaves extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 850–855.