



Isolation of Estuary Soil Fungi and Screening Antibacterial Activity Against *Staphylococcus aureus*

Afriani Rosyadi*, Bawon Triatmoko, Ari Satia Nugraha

Drug Utilisation and Discovery Research Group, Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Submitted 27 July 2020; Revised 16 June 2021; Accepted 01 October 2021; Published 25 February 2022

*Corresponding author: afrianrosyadi@gmail.com

Abstract

Infectious disease is one of the causes of death in the world. Antibiotics are often used in the treatment of bacterial infections but are currently experiencing resistance. Based on this, the search for alternative antibiotics from natural sources needs to be done, one of which is from fungi. Fungi are eukaryotic microbes which have been an eminent sources for many currently available antibiotics including penicillin. This study was conducted to determine the potential antibacterial activity of ethyl acetate extract of estuarine fungi isolates against gram-positive, *Staphylococcus aureus* bacteria. Phytochemical screening of the extract using the TLC method while antibacterial testing was carried through a standard microdilution protocol. Antibacterial activity was reported in percent inhibition. The antibacterial test resulted in seven extracts possessed significant activity, with the highest percent inhibition of the IS-IB-T2 isolate code is $66.5 \pm 1.1\%$ and the lowest of the IS-IB-B2 isolate code is $12.2 \pm 0.7\%$ at concentration of $100 \mu\text{g/mL}$. Majority compounds detected in each extract was terpenoids which suggested the contribution of antibacterial mechanisms. Therefore, estuary soil fungi have the potential to be further explored by antibiotic compounds.

Keywords: antibacterial, estuarine fungi, *staphylococcus aureus*.

Isolasi Fungi Tanah Muara dan Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*

Abstrak

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab kematian di dunia. Antibiotika sering digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri namun saat ini mengalami resistensi. Berdasarkan hal tersebut, penelusuran alternatif antibiotika dari bahan alam perlu dilakukan, salah satunya dari fungi. Fungi merupakan mikroba eukariotik sebagai sumber utama antibiotika yang tersedia saat ini termasuk penisilin. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara terhadap bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*. Penapisan fitokimia ekstrak menggunakan metode KLT sedangkan pengujian aktivitas antibakteri penelitian ini menggunakan metode mikrodilusi. Aktivitas antibakteri dilaporkan dalam persen penghambatan. Hasil uji antibakteri ketujuh ekstrak memiliki aktivitas dengan persen penghambatan tertinggi dari kode isolate IS-IB-T2 sebesar $66,5 \pm 1,1 \%$ dan terendah dari kode isolate IS-IB-B2 sebesar $12,2 \pm 0,7 \%$ pada konsentrasi $100 \mu\text{g/mL}$. Adanya terpenoid dalam tiap ekstrak diduga memiliki kontribusi dalam mekanisme antibakteri. Maka dari itu, fungi yang berasal dari tanah muara berpotensi untuk dieksplorasi senyawa antibiotiknya lebih jauh lagi.

Kata Kunci: antibakteri, fungi tanah muara, *staphylococcus aureus*.

1. Pendahuluan

Sehat merupakan kebutuhan terpenting bagi manusia. Kemunculan suatu penyakit dalam tubuh manusia akan berpengaruh terhadap mortalitas dan morbiditas seseorang. Salah satu penyakit yang sering timbul yaitu infeksi. Penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme patogen seperti bakteri, virus, fungi dan parasit ini menjadi salah satu penyebab kematian di dunia. Penyakit infeksi oleh bakteri di Indonesia menduduki peringkat sepuluh besar penyebab kematian¹. Hingga saat ini, antibiotika banyak digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri, namun penggunaannya banyak disalahgunakan sehingga timbul masalah baru yaitu resistensi². Maka dari itu perlu dilakukan pencarian alternatif antibiotik dari bahan alam, salah satunya yakni isolasi mikroorganisme fungi tanah.

Mikroorganisme tanah dari kelompok fungi banyak diteliti dalam pencarian antibiotika dari bahan alam, karena dalam sejarahnya antibiotika banyak bersumber dari fungi³. Fungi merupakan mikroorganisme yang banyak ditemukan di dalam tanah dengan memanfaatkan nutrisi yang dihasilkan akar tanaman untuk adaptasi dan bertahan hidup⁴. Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi melalui proses fermentasi banyak digunakan dalam skrining aktivitas antibakteri⁵. Senyawa antibiotika bersifat metabolit sekunder yang disintesis oleh mikroorganisme tertentu dan tidak diperlukan bagi organisme tersebut untuk hidup dan tumbuh.

Studi tentang kelompok fungi melalui isolasi, identifikasi, dan skrining untuk bioaktivitas potensial diharapkan dapat memberikan pengetahuan lebih banyak tentang keanekaragaman genus dan spesies serta untuk memberikan informasi potensi penemuan antibiotik baru. Tanah muara yang kaya akan nutrisi dari akar tanaman di dalamnya merupakan sumber potensial bahan baku obat yang datang dari alam⁶. Fungi yang ditemukan di sekitar daerah yang mendukung pertumbuhannya telah beradaptasi untuk menggunakan karbon dan nitrogen sebagai nutrisi. Fungi memanfaatkan nutrisi tersebut sebagai pertahanan terhadap mikroorganisme

lainnya⁶.

Teknologi fermentasi dapat digunakan untuk meningkatkan hasil metabolit sekunder dari suatu mikroorganisme dan banyak dieksplorasi oleh industri farmasi⁷. Hingga saat ini, antibiotik telah digunakan sebagai pengobatan melawan infeksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri resisten dan patogen lain. Isolasi mikroorganisme baru dan metabolit sekunder yang baru tetap dicari karena resistensi antibiotik harus ditangani dengan tepat². Berbagai upaya telah dilakukan oleh berbagai peneliti untuk mencapai tujuan tersebut.

Berdasarkan penjelasan di atas maka perlu penelitian lebih lanjut dalam pengembangan antibakteri dari fungi tanah khususnya tanah muara karena diduga berpotensi sebagai antimikroba serta mengingat penelitian ini masih sangat minim. Maka dari itu, tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui potensi tanah muara Desa Kendit, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur dalam menghambat aktivitas bakteri gram positif *Staphylococcus aureus*. Penelitian lebih lanjut tentang mikroorganisme tersebut dapat memberikan informasi terkait potensi antibiotik yang dihasilkan oleh fungi untuk dieksplorasi agar bermanfaat bagi umat manusia.

2. Metode

2.1. Alat

Laminar Air Flow (thermo scientific 1300 series A2), *autoclave* (b-one), *shaker incubator* (b-one), neraca analitik (ohaus), *hot plate* (heidolph), vortex (gene-2), mikropipet (socorex dan eppendorf), *centrifuge*, spektrofotometer UV-Vis (genesys), *microplate flat bottom 96 wells* (iwaki), *microplate reader* (humareader HS), lemari asam, ultraviolet detektor, destilator. Perlengkapan lain berupa: erlenmeyer (schott duran), petri dish (duran), gelas ukur (duran), *beaker glass* (borosil), corong pisah (schott duran), filter dengan pompa vakum, *chamber* KLT (camag), tabung sentrifus (biologix), jangka sorong (tricle brand), *yellow tip*, *blue tip*, tabung reaksi.

2.2. Bahan

Tanah muara yang diambil dari daerah muara Desa Kendit Kabupaten Situbondo, *sterile water for irrigation*, aqua demineralisata (hydrobatt), air laut, larutan NaCl 0,9%, *Potato Dextrose Agar* (himedia), *Potato Dextrose Broth* (himedia), *Mueller Hinton Agar* (merck), *Mueller Hinton Broth* (himedia), bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, DMSO (emsure), CaCl₂ (sigma), MgCl₂ (brataco), BaCl₂, H₂SO₄, etil asetat teknis, gentamisin sulfat, lempeng kromatografi lapis tipis silika gel F₂₅₄, reagen Dragendorff, uap amonia, FeCl₃, vanilin-H₂SO₄, metanol pa (emsure), diklorometana pa (emsure).

2.3. Prosedur Penelitian

2.3.1. Pembuatan Media dan Sterilisasi

Media PDA ditimbang sejumlah 9,75 gram dan dilarutkan dengan aqua demineral sebanyak 250 mL. Media PDB ditimbang sebanyak 4,8 gram lalu dilarutkan dalam erlenmeyer dengan 200 mL aqua demineralisata dan diaduk hingga larut. Media MHA ditimbang sebanyak 9,5 gram, dilarutkan dengan aqua demineralisata 250 mL dalam erlenmeyer. Media MHB ditimbang 4,2 gram dilarutkan dalam aqua demineralisata 200 mL, untuk membuat media CAMHB dengan cara memipet larutan induk MgCl₂ sebesar 225 µL dan larutan induk CaCl₂ sebesar 450 µL lalu ditambahkan ke dalam media MHB steril 200 mL sehingga didapatkan konsentrasi Mg²⁺ sebesar 11,25 mg/L dan Ca²⁺ sebesar 22,5 mg/L. Metode sterilisasi yang digunakan yaitu panas basah dengan autoklaf. Sterilisasi dilakukan selama 15 menit pada suhu 121°C.

2.3.2. Pengambilan Sampel Tanah, Preparasi Tanah, dan Isolasi Fungi

Sampel tanah diambil dari muara sungai daerah Desa Kendit, Kabupaten Situbondo di sekitar rizosfer tanaman bakau dengan kedalaman 0-40 cm menggunakan pipa PVC. Sampel sebanyak 3 gram diambil dari masing-masing bagian tanah yaitu atas, tengah, dan bawah. Sampel disuspensikan dengan air steril sebanyak 10 mL, kemudian

diambil 2 mL untuk dipindah ke microtube lalu disentrifuge dengan kecepatan 5000 rpm 5 menit. Supernatan yang terbentuk diambil 100 µL dan diratakan pada media PDA. Fungi yang tumbuh setelah inkubasi pada suhu 28 ± 2°C selama 7 hari dipindah berdasarkan morfologi kasat mata pada media PDA yang baru kemudian diinkubasi kembali selama 7 hari pada suhu 28°C hingga didapatkan isolat fungi.

2.3.3. Pembuatan Suspensi Bakteri

Ambil 1 ose dari hasil inokulum bakteri uji, disuspensikan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl fisiologis 0,9%, kemudian dihomogenkan, lakukan pengenceran hingga menghasilkan absorban sebesar 0,08-0,13 pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm.

2.3.4. Uji Antagonis

Isolat fungi yang didapat kemudian dilakukan skrining potensi awal antibakterinya melalui uji antagonis dengan bakteri *S. aureus* pada media MHA. Potongan isolat fungi diambil lalu dikontakkan langsung pada bakteri uji, kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C. Ukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dan catat hasilnya.

2.3.5. Fermentasi dan Ekstraksi

Isolat fungi tanah potensial difermentasi pada media PDB dengan memasukkan lima potongan isolat fungi tanah dalam media. Media yang berisi potongan isolat fungi tanah potensial diletakkan dalam inkubator goyang pada suhu 28 ± 2°C dengan kecepatan 125 rotasi per menit selama 14 hari. Proses ekstraksi dilakukan untuk mengambil senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan selama proses fermentasi. Ekstraksi dilakukan dengan menyaring hasil fermentasi terlebih dahulu untuk memisahkan fungi tanah dan media. Media fermentasi hasil saringan ditambahkan dengan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan partisi cair-cair selama lima belas menit sebanyak tiga kali replikasi. Hasil ekstraksi dengan etil asetat dituang ke dalam cawan penguap untuk menguapkan pelarut di dalam lemari asam. Setelah ekstrak bebas dari pelarut, ekstrak dimasukkan ke dalam

vial dan ditimbang bobotnya serta dihitung % rendemen ekstrak kemudian disimpan untuk digunakan dalam pembuatan larutan uji.

2.3.6. Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui adanya kandungan alkaloid, flavonoid, terpenoid, polifenol dan fenolat. Larutan ekstrak hasil preparasi ditotolkan pada plat KLT GF₂₅₄ kemudian dieluasi dengan eluen sesuai hasil optimasi. Pendeteksian adanya golongan senyawa tertentu menggunakan reagen semprot diantaranya reagen Dragendorff untuk deteksi alkaloid ditandai dengan warna jingga, uap amonia untuk mendeteksi flavonoid akan terbentuk warna kuning intensif, FeCl₃ untuk deteksi polifenol akan terbentuk noda warna hitam, reagen vanilin-H₂SO₄ untuk mendeteksi adanya senyawa golongan fenolat dan terpenoid ditandai dengan noda berwarna ungu untuk terpenoid serta warna merah muda untuk fenolat.

2.3.7. Uji Aktivitas Antibakteri

Kontrol positif yang digunakan adalah gentamisin dengan konsentrasi 1 µg/mL yang merupakan hasil pengenceran dari gentamisin sulfat konsentrasi 40 mg/mL dengan media CAMHB. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dalam media CAMHB. Preparasi DMSO 1% dengan memipet 100 µL DMSO dan dilarutkan dalam 10 mL media CAMHB. Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan 1 mg ekstrak dalam DMSO 100% sebanyak 100 µL lalu diencerkan 100 kalinya dengan media CAMHB sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak 100 µg/mL dan DMSO 1%. Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode mikrodilusi. Prosedur ini mengacu pada protokol standar yang dikeluarkan oleh Clinical Laboratory Standard Institute. Setiap sumuran berisi 50 µL suspensi bakteri dalam CAMHB, lalu ditambahkan larutan uji, kontrol positif, atau kontrol negatif sebanyak 50 µL. Konsentrasi akhir bakteri tiap sumuran yaitu 5×10^4 CFU/mL. Kelompok perlakuan terdiri dari campuran 50 µL larutan ekstrak konsentrasi 100 µg/mL dalam DMSO 1% dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB.

Kontrol positif ekstrak merupakan campuran 50 µL larutan ekstrak konsentrasi 100 µg/mL dalam DMSO 1% dan 50 µL media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak merupakan 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 50 µL media CAMHB. Kontrol positif merupakan campuran 50 µL gentamisin konsentrasi 1 µg/mL dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari campuran media CAMHB 50 µL dan bakteri dalam CAMHB 50 µL, sedangkan kontrol media yaitu media CAMHB sebanyak 100 µL. Semua perlakuan dilakukan dalam tiga wellplate. Semua prosedur uji antibakteri dilakukan dengan teknik aseptis.

Setelah pembuatan larutan uji, kontrol, suspensi bakteri dan desain uji pada microplate 96 well semua bahan dimasukkan ke dalam laminar air flow. Larutan tersebut dipipet sesuai dengan desain uji yang telah dibuat. Jumlah campuran larutan pada tiap sumuran sebanyak 100 µL. Pemipetan dilakukan secara hati-hati untuk mencegah kontaminasi silang dari larutan lain pada tiap sumuran. Setelah semua dipreparasi pada microplate, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C dengan disertai penggojokan, hal ini dilakukan untuk mencegah pengendapan dari ekstrak yang sedang diuji. Pengamatan hasil uji antibakteri dilakukan setelah masa inkubasi selama 18-24 jam pada Panjang gelombang 625 nm dengan instrumen microplate reader. Setelah didapatkan absorbansi masing-masing sumuran selanjutnya dilakukan perhitungan %inhibisi dengan menggunakan persamaan seperti pada poin analisis data.

2.3.8. Analisis Data

Hasil percobaan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode mikrodilusi akan didapatkan data absorbansi. Dari hasil pengukuran absorbansi penghambatan pertumbuhan bakteri dapat dihitung berdasarkan rumus berikut :

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



Gambar 1. Skema alat sampling tanah muara

Keterangan :

- Abs : absorbansi
 A : kontrol negatif ekstrak/gentamisin
 B : kontrol DMSO 1% atau media CAMHB
 C : larutan uji ekstrak/gentamisin
 D : kontrol ekstrak/gentamisin

3. Hasil

Tanah muara diambil di daerah Desa Kendit, Kabupaten Situbondo, Jawa Timur. Tanah yang didapatkan merupakan bagian tanah atas, tengah, dan bawah muara sungai yang dihasilkan dari pengambilan dengan pipa PVC sepanjang 40 cm seperti yang ditunjukkan Gambar 1. Pengembangbiakan fungi dilakukan dalam 3 petridish berbeda sesuai dengan bagian tanah dan didapatkan beragam fungi jika dilihat dari segi warna, tekstur, dan bentuk.

Isolat fungi yang didapatkan sebanyak 7 petridish merupakan kelompok khamir dimana diperoleh dari pembiakan fungi tanah muara dalam media PDA selama 7 hari. Isolat IS-IB-A1, IS-IB-A2, IS-IB-A3 merupakan hasil isolasi dari pembiakan

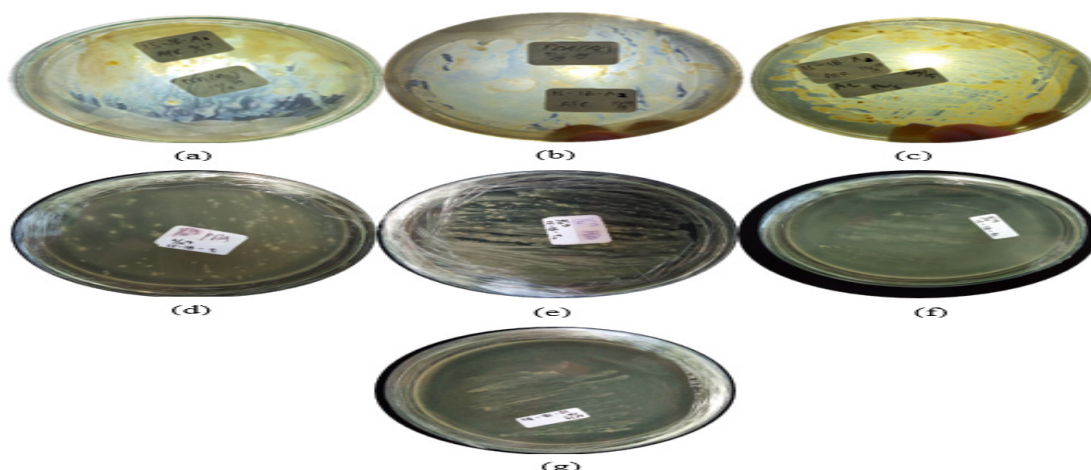
Tabel 1. Skrining Awal Bioaktivitas Antibakteri

Kode Fungi	Hasil Uji	Diameter Zona Hambat
IS-IB-A1	+	13,8 mm
IS-IB-A2	+	13,2 mm
IS-IB-A3	+	10,5 mm
IS-IB-T1	+	14,6 mm
IS-IB-T2	+	18,3 mm
IS-IB-B1	+	11,8 mm
IS-IB-B2	+	11,8 mm

fungi tanah bagian atas; IS-IB-T1, IS-IB-T2 merupakan hasil isolasi dari pembiakan fungi tanah bagian tengah; IS-IB-B1, IS-IB-B2 merupakan hasil isolasi dari pembiakan fungi tanah bagian bawah seperti yang ditunjukkan oleh Gambar 2.

Uji antagonis isolat dengan bakteri uji *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa semua isolat fungi memiliki penghambatan terhadap bakteri tersebut dengan ditunjukkan dengan zona bening di sekitar isolat. Hasil pengukuran diameter zona hambat seperti pada Tabel 1. Proses ini merupakan skrining awal bioaktivitas antibakteri untuk melihat potensi antibakteri isolat fungi, maka dari itu perlu metode spesifik agar bisa mengetahui kuantitas pengahambatannya salah satunya dengan metode mikrodilusi.

Hasil kultivasi cair isolat fungi didapatkan hasil warna media PDB yang semakin keruh dalam 14 hari. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara didapatkan prosentase ekstrak yang berbeda diantaranya IS-IB-A1 0,2072%; IS-IB-A2 0,3446%; IS-IB-A3 0,1865%;



Gambar 2. Isolat fungi tanah muara (a) IS-IB-A1; (b) IS-IB-A2; (c) IS-IB-A3; (d) IS-IB-T1; (e) IS-IB-T2; (f) IS-IB-B1; (g) IS-IB-B2

Tabel 2. Skrining Fitokimia

Kode Fungi	Hasil Uji Golongan Senyawa				
	Alkaloid	Flavonoid	Terpenoid	Polifenol	Fenolat
IS-IB-A1	-	-	+	-	-
IS-IB-A2	-	-	+	-	-
IS-IB-A3	-	-	+	-	-
IS-IB-T1	-	-	+	-	-
IS-IB-T2	-	-	+	-	-
IS-IB-B1	-	-	+	-	+
IS-IB-B2	-	-	+	-	+

IS-IB-T1 0,0232%; IS-IB-T2 0,0850%; IS-IB-B1 0,0515%; dan IS-IB-B2 0,0563%.

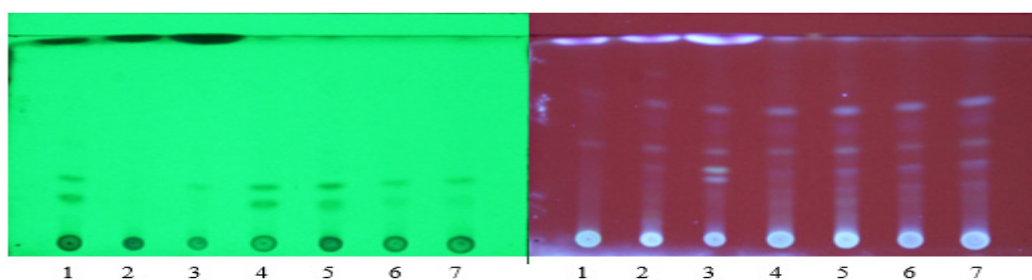
Eluen hasil optimasi diperoleh perbandingan antara diklorometana : metanol (9,5 : 0,5), dikatakan optimal jika noda yang dihasilkan pada lempeng KLT dapat memisah seperti ditunjukkan oleh Gambar 3. Hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pengujian alkaloid, flavonoid, terpenoid, polifenol, dan fenolat terhadap tujuh ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara menunjukkan ketujuh ekstrak mengandung golongan senyawa terpenoid yang ditandai noda berwarna ungu akibat reaksi kimia dengan vanillin-asam sulfat dan dua ekstrak IS-IB-B1 dan IS-IB-B2 juga mengandung golongan senyawa fenolat yang ditandai noda berwarna merah muda yang juga hasil reaksi dengan vanillin-asam sulfat. Hasil penapisan fitokimia ketujuh ekstrak terdapat pada Tabel 2.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri membuktikan bahwa ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolate fungi tanah muara menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Analisis data pengujian aktivitas antibakteri metode mikrodilusi didapatkan data %inhibisi. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat

IS-IB-T2 memiliki inhibisi paling tinggi dan terendah pada isolat IS-IB-B2 seperti pada Tabel 3.

4. Pembahasan

Pada penelitian ini dilakukan isolasi fungi tanah muara dan uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara terhadap *Staphylococcus aureus*. Hal ini bertujuan untuk mengetahui potensi fungi tanah muara dalam menghambat bakteri. Perlakuan pertama penelitian ini diawali dengan pengambilan tanah muara di daerah Desa Kendit Kabupaten Situbondo Jawa Timur dengan menggunakan pipa PVC sepanjang 40 cm, daerah muara khususnya rizosfer bakau dipilih karena berada di lingkungan yang dapat mendukung keberadaan mikroba. Selain itu, tanah muara memiliki gradien salinitas yang berbeda-beda akibat pasang surut air laut sehingga mikroba yang ada di dalamnya dapat memproduksi metabolit sekunder untuk ketahanan hidupnya⁴. Tanah yang didapat dibagi ke dalam 3 bagian yaitu atas yang diambil di permukaan pipa berkisar 0-5 cm, tengah yang diambil 20 cm dari permukaan pipa dan bawah yang diambil di dasar pipa 40 cm dari permukaan. Tujuan dibagi tiga bagian yaitu



Gambar 3. Hasil optimasi eluen untuk KLT (kiri) Deteksi dengan UV 254 nm, (kanan) Deteksi dengan UV 365 nm; kode ekstrak dari kiri ke kanan (1) IS-IB-A1, (2) IS-IB-A2, (3) IS-IB-A3, (4) IS-IB-T1, (5) IS-IB-T2, (6) IS-IB-B1, (7) IS-IB-B2

Tabel 3. Uji Aktivitas Antibakteri

Kontrol dan Kode Fungi	Konsentrasi	Rerata penghambatan pertumbuhan bakteri (%)
Kontrol positif (Gentamisin)	1 µg/mL	93,3
Kontrol negatif (DMSO)	1%	1,0
IS-IB-A1	100 µg/mL	37,5
IS-IB-A2	100 µg/mL	14,4
IS-IB-A3	100 µg/mL	26,4
IS-IB-T1	100 µg/mL	58,1
IS-IB-T2	100 µg/mL	66,5
IS-IB-B1	100 µg/mL	18,6
IS-IB-B2	100 µg/mL	12,2

untuk melihat ragam fungi yang tumbuh yang memungkinkan juga memiliki perbedaan aktivitasnya dalam menghambat bakteri.

Tanah yang didapat dibuat suspensi untuk dikembangkan fungsinya dalam media PDA selama 7 hari dalam suhu kamar. Alasan penggunaan media PDA karena selektif dalam menumbuhkan fungi dan pelarut media PDA menggunakan air laut yang telah difiltrasi, hal ini didasarkan pada hasil optimasi pembiakan fungi dimana pertumbuhan fungi menggunakan media dengan air laut cukup bervariasi serta dengan tujuan agar kondisi pertumbuhan mirip dengan ekosistem asal yaitu muara sungai. Isolasi fungi dilakukan setelah pembiakan 7 hari dengan cara melihat perbedaan morfologi seperti warna, tekstur permukaan, dan bentuk ke dalam media PDA yang baru. Isolat yang telah berkembang biak kemudian diuji antagonis dengan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam media MHA yang selektif dalam menumbuhkan bakteri⁸.

Hasil uji antagonis menunjukkan bahwa seluruh isolat fungi menunjukkan aktivitas antibakteri dilihat dari zona bening yang terbentuk di sekitar potongan isolat. Hasil tersebut tidak menunjukkan nilai yang signifikan antar isolat, karena uji antagonis merupakan cara awal untuk melihat potensi antibakteri dan merupakan metode yang tidak spesifik, maka isolat yang berpotensi memiliki aktivitas antibakteri akan menjalani tahap selanjutnya yaitu fermentasi dan ekstraksi. Berdasarkan penelitian yang sudah ada menyatakan bahwa suatu isolat mikroorganisme akan memberikan aktivitas lebih baik lagi jika dalam bentuk ekstrak⁹.

Fermentasi isolat fungi menggunakan media PDB dalam erlenmeyer dengan memasukkan potongan isolat ke dalamnya. Fermentasi kali ini menggunakan metode batch process selama 14 hari. Digunakan metode tersebut bertujuan untuk mengurangi kontaminan, dinilai mudah dan efisien¹⁰. Pemilihan waktu 14 hari agar fungi memasuki fase stasioner sehingga produksi metabolit sekunder mencapai maksimal¹¹. Dalam proses fermentasi terjadi perubahan warna media akibat penambahan biomassa fungi dan metabolit sekunder yang diproduksi¹². Setelah proses fermentasi dilanjutkan ke tahap ekstraksi, yaitu menarik metabolit sekunder yang diproduksi oleh isolat fungi. Metode ekstraksi yang digunakan yaitu partisi cair-cair dengan pelarut semi polar etil asetat. Prinsip metode tersebut yakni memisahkan komponen metabolit sekunder dalam filtrat hasil fermentasi ke dalam dua pelarut yang tidak saling campur^{13,14}. Pelarut yang tidak saling campur kali ini yaitu air sebagai pelarut media PDB dan etil asetat sebagai pelarut ekstraksi, sehingga etil asetat akan menarik senyawa yang terkandung dalam pelarut media PDB. Perbedaan rendemen ekstrak yang didapatkan dapat terjadi karena tidak semua metabolit akan tertarik ke dalam etil asetat. Selain itu akibat karakteristik fungi yang berbeda yang dapat dipengaruhi oleh beberapa hal diantaranya yaitu jenis tanah, ketinggian atau kedalaman, suhu udara, pH tanah, dan bahan organik yang terkandung¹⁵.

Ekstrak kental yang sudah didapatkan selanjutnya masuk ke tahapan penapisan fitokimia dengan metode Kromatografi Lapis

Tipis. Fase gerak yang digunakan dalam analisis KLT yaitu diklorometana : metanol (9,5 : 0,5) dan fase diam Silica Gel F₂₅₄. Hasil penapisan fitokimia menunjukkan semua ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi mengandung golongan senyawa terpenoid. Hal ini dalam penelitian yang sudah ada, menyatakan bahwa fungi yang termasuk ke dalam kelompok khamir yang termasuk ke dalam filum Ascomykota dan Basidiomycota banyak memproduksi metabolit sekunder golongan senyawa terpenoid khususnya kelas diterpen¹⁶.

Setelah dilakukan skrining fitokimia, ekstrak yang didapat juga dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi. Metode ini dipilih karena membutuhkan jumlah sampel yang sedikit dan hasil yang didapatkan lebih teliti dibandingkan dengan metode difusi¹⁷. Gentamisin digunakan sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif. Kelompok uji pada penelitian ini yaitu ekstrak etil asetat hasil ekstraksi fermentasi fungi tanah muara dengan menggunakan konsentrasi tunggal yaitu 100 µg/mL. Ekstrak ini dilarutkan dalam media CAMHB dengan bantuan kosolven dimetilsulfoksida (DMSO). DMSO merupakan kosolven jenis surfaktan yang mampu memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Maka dari itu, penggunaan DMSO sebagai kosolven tidak boleh melebihi 1% karena dikhawatirkan akan menghambat pertumbuhan bakteri¹⁸. Pengujian antibakteri metode mikrodilusi menggunakan media Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB). Penggunaan CAMHB pada pengujian antibakteri metode dilusi cair bertujuan untuk standardisasi kadar kation seperti Mg²⁺ dan Ca²⁺ dalam media Mueller Hinton Broth karena media tersebut yang beredar memiliki kadar kation yang berbeda-beda. Kadar kation seperti Mg²⁺ dan Ca²⁺ dalam media Mueller Hinton dapat mempengaruhi proses pengujian antibakteri, karena kation tersebut dapat mempengaruhi integritas membran sel bakteri sehingga akan berpengaruh pada aktivitas agen antibakteri¹⁹. Hasil analisis data persen inhibisi yang didapatkan berbeda-beda dari masing-masing

ekstrak, hal ini bisa dipengaruhi dari senyawa antibakteri yang berperan. Berdasarkan hasil skrining dan uji aktivitas antibakteri yang telah dilakukan dapat ditarik dugaan sementara bahwa yang berperan sebagai antibakteri ada pada golongan senyawa terpenoid dari ekstrak. Hal tersebut juga disampaikan pada beberapa penelitian lain bahwa terpenoid dari fungi dapat berperan sebagai antibakteri dengan mekanisme menghambat proses penting pertumbuhan sel yaitu respirasi sel²⁰. Terpenoid dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba yang sifatnya bakteriostatik maupun bakterisidal. Terpenoid yang dilaporkan berpotensi sebagai antibakteri terdiri dari kelas monoterpen, diterpen dan triterpen. Selain mekanisme tersebut, minyak esensial dari golongan terpenoid juga dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dengan mekanisme kerja disfungsi membran sel sehingga membran sel bakteri akan pecah²¹.

5. Simpulan

Tujuh isolat fungi yang didapatkan termasuk ke dalam kelompok khamir yang ditandai dengan morfologinya seperti koloni bakteri. Berdasarkan pemantauan golongan senyawa dengan KLT menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara mengandung golongan senyawa terpenoid untuk seluruh ekstrak sedangkan ekstrak dengan kode IS-IB-B1 dan IS-IB-B2 juga mengandung senyawa golongan fenolat. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara menunjukkan bahwa seluruh ekstrak memiliki aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan persen penghambatan tertinggi oleh kode isolat IS-IB-T2 dan terendah oleh kode isolat IS-IB-B2. Berdasar hal tersebut bahwa metabolit sekunder dari fungi dapat menjadi cikal bakal yang mumpuni untuk pengembangan antibiotika bahan alam.

Daftar Pustaka

1. CDC. Centers for disease control and prevention center for global health [Internet]. CDC. 2016 [cited 5 November

- 2019]. Available form: www.cdc.gov/global
2. Utami, E. R. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. *El-Hayah Jurnal Biologi*. 2012; 1(4):191–198.
3. Keller, N. P. Fungal secondary metabolism: regulation, function and drug discovery. *Nature Reviews Microbiology*. 2019; 17(3):167–180.
4. Jordan, S. J. *Estuaries : classification, ecology and human impacts*. New York: Nova Science Publishers Inc; 2012. 93–114.
5. Pandey A, Chandra N, Srivastava A, Kumar D, Kumar S. Antimicrobial metabolites producing soil microorganisms: an update. *Indian Journal of Applied Microbiology*. 2018; 21(1):46–57.
6. Qiao Y, Xu D, Yuan H, Wu B, Chen B, Tan Y, Lin J, Guo D. Investigation on the association of soil microbial populations with ecological and environmental factors in the pearl river estuary. *Journal of Geoscience and Environment Protection*. 2018; 06(03):8–14.
7. Jain R, Pundir R K. Effect of fermentation medium, pH and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. *Journal of Agricultural Technology*. 2011; 7(2):247–269.
8. Ed-har A A, Widyastuti R, Djajakirana G. Isolasi dan identifikasi mikroba tanah pendegradasi selulosa dan pektin dari rhizosfer *Aquilaria malaccensis*. *Buletin Tanah dan Lahan*. 2017; 1(1):58–64.
9. Sara Ramírez, R., J. D. Arias M., J. C. Bedoya, E. A. Rueda L., C. Y. Sánchez, dan S. D. Granada G. Metabolitos producidos por microorganismos antagonistas son capaces de inhibir in vitro los principales patógenos del aguacate. *Agronomía colombiana*. 2015; 33(1):58–63.
10. Pandey A, Larroche C, Soccol C R. Current developments in biotechnology and bioengineering: Current advances in solid-state fermentation. *Elsevier*; 2018. 52–61, 157.
11. Ukhty, N. Kapang endofit laut dari tumbuhan pesisir terong pungg (Solanum sp.) dan potensinya sebagai antibakteri. *Jurnal Perikanan Tropis*. 2015; 2(1):91–102.
12. Bertrand S, Bohni N, Schnee S, Schumpp O, Gindro K, Wolfender J L. Metabolite induction via microorganism co-culture: a potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology Advances*. 2014; 32(6):1180–1204.
13. Saifudin, A. *Senyawa alam metabolit sekunder : teori, konsep dan teknik pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish; 2014. 41–45.
14. Mandal S C, Mandal V, Das A K. *Essentials of botanical extraction: principles and applications*. Elsevier Inc; 2015. 67.
15. Sukmawati I K, Yuniarto A, Alighita W, Jamaludin A Z. Aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi jamur shitake (*Lentinula edodes*) terhadap bakteri penyebab jerawat. *IJPST*. 2019; 6(1):36–45.
16. Hajnos M W, Sherma J. *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*. New York: CRC Press; 2011. 609.
17. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda S K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2016; 6(2):71–79.
18. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Nineteenth Informational Supplement. Approved Standard M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA; 2015. 190.
19. Ramirez-Ronda C H, Holmes R K, Sanford J P. Effects of divalent cations on binding of aminoglycoside antibiotics to human serum proteins and to bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1975; 7(3):239–245.
20. Mahizan N A, Yang S K, Moo L C, et al. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (amr) pathogens. *Molecules*. 2019; 24(14):2631.
21. Guimarães A C, Meireles L M, Lemos M F, et al. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. 2019; 24(13):2471.