



**ISOLASI FUNGI TANAH DESA KEMA SATU MINAHASA
UTARA DAN SKRINING ANTIBAKTERI TERHADAP**
Pseudomonas aeruginosa

SKRIPSI

Oleh :

Wulan Rosa Panggalih

NIM 172210101087

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2021



**ISOLASI FUNGI TANAH DESA KEMA SATU MINAHASA
UTARA DAN SKRINING ANTIBAKTERI TERHADAP**
Pseudomonas aeruginosa

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

Wulan Rosa Panggalih

NIM 172210101087

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2021

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Bapak Suparno dan Ibu Rubiantini selaku orang tua, Elok Cahyaning Tyas selaku adik serta segenap anggota keluarga yang telah memberikan doa dan dukungan selama proses penyusunan naskah ini;
2. Guru-guru saya dari TK Dharma Wanita Brenggolo 1, SDN Brenggolo 1, SMPN 1 Gurah, dan SMAN 1 Kediri serta segenap dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberikan ilmu dan membimbing saya selama ini;
3. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

MOTO

"Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan."

(QS. Al-Insyirah 94: Ayat 6)

“Keberhasilan di masa lalu belum tentu menjadi gambaran kamu akan berhasil di masa depan karena hidup itu banyak kejutan.”

~Bella S.~



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Wulan Rosa Panggalih

NIM : 172210101087

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Isolasi Fungi Tanah Desa Kema Satu Minahasa Utara dan Skrining Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 15 Juli 2021

Yang menyatakan

Wulan Rosa Panggalih

NIM 172210101087

SKRIPSI

**ISOLASI FUNGI TANAH MUARA DESA KEMA SATU
MINAHASA UTARA DAN SKRINING ANTIBAKTERI
TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

Oleh:

Wulan Rosa Panggalih

NIM 172210101087

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : apt. Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : apt. Ari S. Nugraha, S.F., GdipSc., M.Sc-Res., Ph.D.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Isolasi Fungi Tanah Desa Kema Satu Minahasa Utara dan Skrining Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” karya Wulan Rosa Panggalih telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 27 Juli 2021

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,



apt. Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc.

NIP 198201292009121003

Dosen Pembimbing Anggota,



apt. Ari S. N., S.F., GdipSc., M.Sc-Res., Ph.D.

NIP 19787212003121001

Tim Penguji

Dosen Penguji I,



apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm.

NIP 197604142002122001

Dosen Penguji II,



apt. Indah Purnama Sary S.Si., M.Farm.

NIP 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember



Dr. apt. Nuri, S.Si., M.Si.

NIP 196904122001121007

RINGKASAN

Isolasi Fungi Tanah Desa Kema Satu Minahasa Utara dan Skrining Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*: Wulan Rosa Panggalih: 172210101087; 2021; 81 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Resistensi antibiotik merupakan permasalahan kritis yang tengah dihadapi oleh masyarakat secara global. Terdapat lebih dari 35.000 kasus kematian akibat resistensi antibiotik di Amerika Serikat dengan perkiraan biaya pengeluaran sebesar 55 miliar dolar per tahun. Di Indonesia, kasus resistensi antibiotik termasuk ke dalam sepuluh besar kasus penyebab kematian terbanyak. Hal ini disebabkan oleh peningkatan kejadian nosokomial yang mendukung transmisi bakteri resisten dari satu pasien ke pasien lain. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen prioritas kritis yang semakin kebal terhadap berbagai antibiotik. Bakteri ini menemukan cara baru untuk mengembangkan resistensi dan dapat berbagi kemampuan ini dengan bakteri lain sehingga meningkatkan penyebaran resistensi.

Fungi merupakan produk alam yang telah banyak diteliti dan dikembangkan terkait aktivitas antibakteri yang dimiliki. Ini terbukti dari penemuan penisilin, antibiotik pertama yang disintesis dari fungi *Penicillium notatum*, yang digunakan dalam pengobatan akibat infeksi bakteri gram-positif. Fungi dapat diisolasi dari berbagai lingkungan, salah satunya dari tanah muara di sekitar perakaran mangrove. Mangrove memiliki ekosistem yang unik dengan membentuk lingkungan garam yang khas. Hal ini menjadi faktor penentu adaptasi genetik dari fungi sehingga mendorong produksi senyawa bioaktif yang beragam secara kimiawi, khususnya yang berpotensi sebagai antibakteri.

Desa Kema Satu, Kabupaten Minahasa Utara, Sulawesi Utara menjadi salah satu lokasi yang menarik untuk penemuan senyawa antibakteri bersumber fungi. Desa Kema Satu memiliki ekosistem mangrove yang tergolong baik dan jauh dari aktivitas penduduk. Proses penelitian diawali dengan mengisolasi fungi tanah muara. Sampel tanah muara dikultur pada media PDA sehingga diperoleh

empat biakan fungi yang ketika diisolasi secara makroskopis memberikan delapan isolat tunggal. Uji antagonis dilakukan terhadap delapan isolat fungi untuk mengetahui adanya potensi aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Uji antagonis menghasilkan enam isolat aktif, yaitu IS2-BTG8-1-1, IS2-BTG8-1-2, IS2-BTG8-1-3, IS1-BTG8-2, IS1-BTG8-3, dan IS3-BTG8-4-1-1 yang ditandai oleh pembentukan zona hambat. Isolat aktif kemudian difermentasi dan diekstraksi menggunakan etil asetat untuk mendapatkan metabolit sekunder yang diinginkan sehingga dapat dilanjutkan ke tahap skrining kandungan kimia. Berdasarkan hasil skrining, diketahui adanya kandungan terpenoid dan fenolat dari ekstrak fungi tanah muara yang diuji. Uji mikrodilusi dilakukan untuk menentukan nilai persen penghambatan enam isolat fungi terhadap *P. aeruginosa*. Berdasarkan hasil uji mikrodilusi, didapatkan nilai persen penghambatan ekstrak fungi tanah muara dari yang terbesar ke yang terkecil, yaitu IS1-BTG8-2 (72,7% ± 4,1), IS1-BTG8-3 (70,8% ± 0,8), IS2-BTG8-1-2 (69,2% ± 7,7), IS3-BTG8-4-1-1 (61,8% ± 1,0), IS2-BTG8-1-1 (57,2% ± 5,2), dan IS2-BTG8-1-3 (20,9% ± 2,6).

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan ridho-Nya sehingga penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Isolasi Fungi Tanah Desa Kema Satu Minahasa Utara dan Skrining Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” dapat diselesaikan dengan baik. Skripsi ini disusun sebagai persyaratan untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari beberapa hambatan dan rintangan, oleh sebab itu penulis hendak berterima kasih kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya sehingga penyusunan skripsi dapat berjalan dengan lancar;
2. Nabi Agung Muhammad SAW yang selalu jadi panutan dalam hidup penulis;
3. Ibu apt. Fransiska Maria Christianty, S.Farm., M.Sc. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan arahan dan semangat selama penulis menempuh S1 di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Bapak apt. Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc. dan Bapak apt. Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc., M.Sc-Res., Ph.D. selaku dosen pembimbing utama dan anggota yang telah memberikan bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat tersusun dengan baik;
5. Ibu apt. Lestyo Wulandari, S.Si., M.Farm. dan Ibu apt. Indah Purnama Sary S.Si., M.Farm. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun serta semangat agar penulis menyelesaikan naskah dengan baik;
6. Seluruh dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, pengalaman, dan motivasi kepada penulis;
7. Bapak Suparno, Ibu Rubiantini, dan Adik Elok Cahyaning Tyas serta segenap anggota keluarga yang telah tiada henti memberikan dukungan berupa doa demi kelancaran studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;

8. Teman seperjuangan “DUDRG”, khususnya rekan SOIL FUNGI 2017: Nafa, Wilda, Dini, Aida, Ajeng, Amira, Arthur, dan Habib yang selalu ada dan kompak dalam membantu menyelesaikan masalah dan menghibur di masa-masa sulit;
9. Sahabat “Kotoran” tercinta, yaitu Yearrika Rahayu Putri, Merinda Aldiana, Ayssa Wicaksono, dan Rosalina Ambar Kusuma yang selalu menjadi ladang penyemangat, tempat berbagi suka-duka dan rekan seperjuangan selama penulis menghabiskan waktu di masa-masa perkuliahan;
10. Sahabat sekaligus keluarga “Geng Receh” tercinta, Bella Septina Ika H. dan Ajeng Mareta A., yang senantiasa memberikan solusi dan saran-saran bijaknya, menemani dan menyemangati penulis di kala susah dan senang, serta menjadi rekan seperjuangan sejak masa SMA hingga sekarang;
11. Teman – teman “BENEDICT’17” yang memberikan banyak kenangan, dukungan, dan semangatnya dalam penyusunan skripsi ini;
12. Semua pihak yang telah berperan membantu menyelesaikan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih terdapat kekurangan dan kelemahan dalam penulisan naskah ini. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat diperlukan agar di kesempatan yang akan datang, naskah skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembacanya.

Jember, 15 Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PENGESAHAN	vii
HALAMAN RINGKASAN	viii
HALAMAN PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR GRAFIK	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Sejarah Penemuan Antibiotik	5
2.2 Klasifikasi Antibiotik	6
2.3 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.2.1 Karakteristik <i>P. aeruginosa</i>	7
2.2.2 Resistensi <i>P. aeruginosa</i>	9
2.4 Fungi Tanah.....	11
2.5 Ekosistem Mangrove	15
2.6 Isolasi Fungi	16
2.7 Uji Antagonis	17

2.8	Fermentasi	17
2.9	Ekstraksi	19
2.10	Uji Antibakteri.....	19
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....		22
3.1	Jenis Penelitian	22
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.3	Variabel Penelitian	22
3.3.1	Variabel Terikat	22
3.3.2	Variabel Bebas.....	22
3.3.3	Variabel Terkontrol.....	22
3.4	Definisi Operasional.....	23
3.5	Prosedur Penelitian.....	24
3.6	Alat dan Bahan	25
3.6.1	Alat.....	25
3.6.2	Bahan	25
3.7	Prosedur Kerja.....	26
3.7.1	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	26
3.7.2	Pembuatan Media PDA	26
3.7.3	Pembuatan Media PDA <i>Chloramphenicol</i>	26
3.7.4	Pembuatan Media PDB.....	27
3.7.5	Pembuatan Media MHA	27
3.7.6	Penyiapan Sampel Tanah.....	27
3.7.7	Isolasi Fungi Tanah.....	28
3.7.8	Penyiapan Bakteri Uji.....	28
3.7.9	Uji Antagonis Isolat Fungi dengan Bakteri Uji	29
3.7.10	Fermentasi.....	29
3.7.11	Ekstraksi.....	29
3.7.12	Skrining Kandungan Kimia	30
3.7.13	Uji Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara	30
3.7.14	Analisis Data.....	34
BAB 4. Hasil dan pembahasan.....		36

4.1	Pengambilan Sampel Tanah Muara.....	36
4.2	Isolasi dan Identifikasi Isolat Fungi Tanah Muara.....	37
4.3	Uji Antagonis Isolat Fungi Tanah Muara.....	43
4.4	Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Tanah.....	44
4.4.1	Fermentasi.....	44
4.4.2	Ekstraksi.....	45
4.5	Skrining Kandungan Kimia.....	48
4.6	Uji Aktivitas Antibakteri Menggunakan Metode Mikrodilusi.....	51
BAB 5. PENUTUP.....		55
5.1	Kesimpulan.....	55
5.2	Saran.....	55
LAMPIRAN.....		68

DAFTAR TABEL

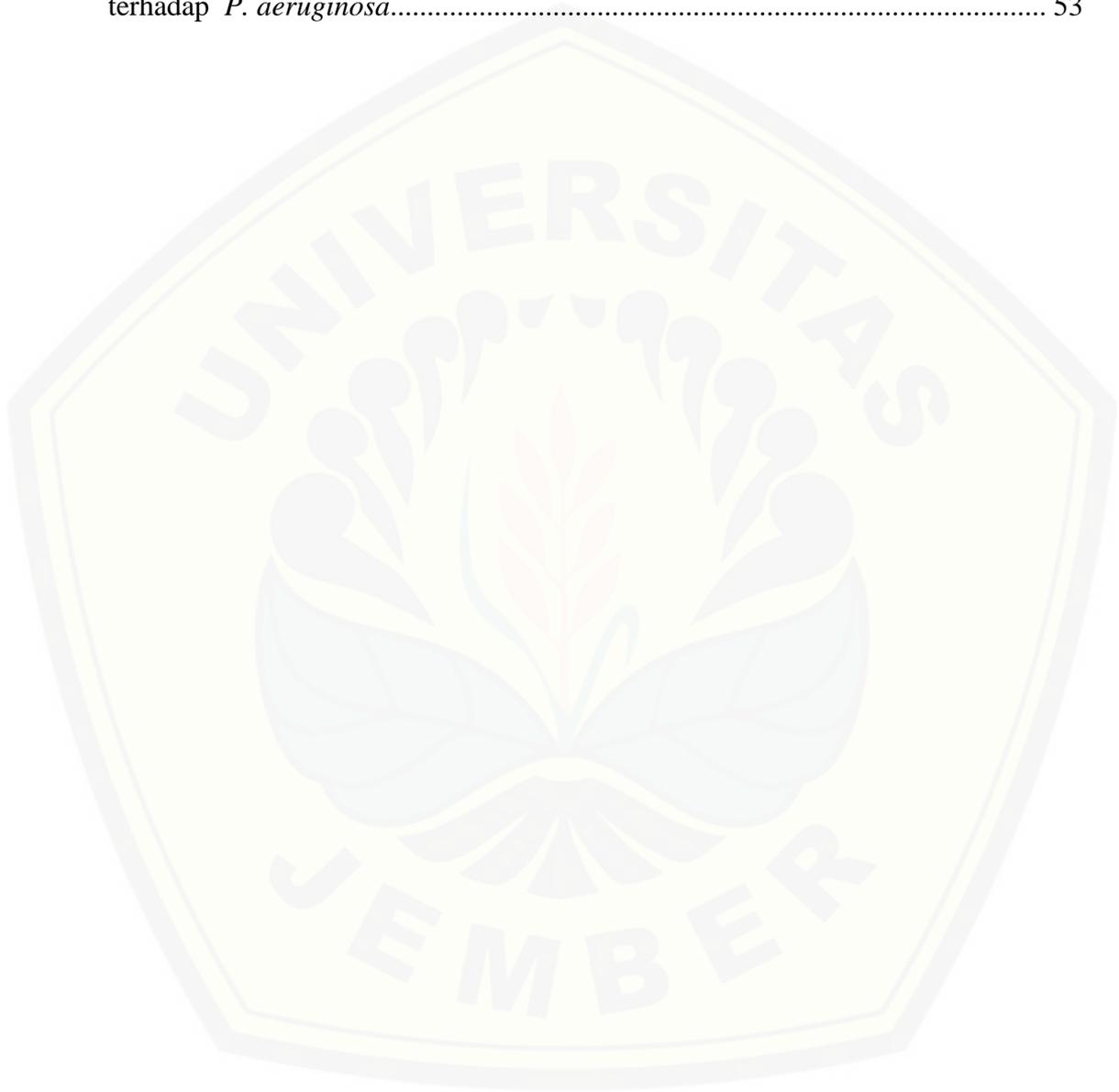
Tabel 2.1 Golongan Antibiotik Berdasarkan Struktur	7
Tabel 2.2 Metabolit Fungi yang Dikembangkan Menjadi Produk Antibiotik	15
Tabel 4.1 Ciri-Ciri Makroskopis Delapan Isolat Fungi Tanah Muara	40
Tabel 4.2 Ciri-Ciri Mikroskopis Isolat Aktif Fungi Tanah Muara	42
Tabel 4.3 Diameter Zona Hambat Isolat Fungi Tanah Muara	43
Tabel 4.4 Rendemen Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi	47
Tabel 4.5 Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara	49
Tabel 4.6 Data Hasil Rerata Persen Penghambatan Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara, Gentamisin, dan DMSO terhadap <i>P. aeruginosa</i>	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Target Utama Aksi Antibakteri	6
Gambar 2.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada Mikroskop Elektron.....	9
Gambar 2.3 Perkiraan Kontribusi Kelompok Mikroba.....	12
Gambar 2.4 Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis <i>Saccharomyces cereviciae</i> ..	13
Gambar 2.5 Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Kapang <i>Rhizopus Oryzae</i> ...	14
Gambar 3.1 Skema Penelitian	24
Gambar 3. 2 Desain <i>Microplate</i> Uji Antibakteri Metode Mikrodilusi.....	33
Gambar 4. 1 Pengambilan Sampel Tanah Muara.....	36
Gambar 4. 2 Hasil Isolasi Pertama Fungi Tanah Muara	38
Gambar 4.3 Skema Isolasi Fungi Tanah Muara dari Sampel Tanah BTG8.....	38
Gambar 4.4 Isolat Tunggal Fungi Tanah Muara pada Media PDA	40
Gambar 4.5 Hasil Pengamatan Mikroskopis Enam Isolat Aktif	41
Gambar 4.6 Hasil Fermentasi Isolat Aktif Fungi Tanah Muara	45
Gambar 4.7 Proses Ekstraksi Cair-Cair.	46
Gambar 4.8 Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara.....	47
Gambar 4.9 Profil Kromatogram Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara	48
Gambar 4.10 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia.....	49

DAFTAR GRAFIK

Grafik 4.1 Persen Penghambatan Ekstrak Fungi Tanah Muara dan Gentamisin terhadap <i>P. aeruginosa</i>	53
---	----



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antibiotik merupakan fenomena dan permasalahan kritis yang tengah dihadapi oleh masyarakat global. Terdapat sekitar 700 ribu kasus kematian akibat resistensi antibiotik dan diprediksikan akan meningkat menjadi 10 juta kasus di tahun 2050 (O'Neill, 2014). Center for Disease and Prevention (CDC) menyebutkan bahwa terdapat lebih dari 2,8 juta kasus resistensi antibiotik di Amerika Serikat setiap tahunnya dan lebih dari 35.000 orang meninggal akibat hal tersebut (CDC, 2019). Tidak hanya berdampak pada tingkat mortalitas, resistensi antibiotik juga dapat meningkatkan morbiditas dan biaya kesehatan. CDC memperkirakan biaya yang dikeluarkan akibat resistensi antibiotik sebesar 55 miliar dolar per tahun yang secara keseluruhan terdiri atas 20 miliar dolar untuk biaya perawatan kesehatan langsung dan 35 miliar dolar untuk biaya sosial akibat produktivitas yang hilang (CDC, 2013).

Di Indonesia, resistensi antibiotik termasuk dalam sepuluh besar kasus penyebab kematian terbanyak (Kementrian Kesehatan RI, 2011). Peningkatan kejadian nosokomial akibat transmisi bakteri resisten dari satu pasien ke pasien lain mendorong penyebaran lebih lanjut dari bakteri yang sulit diobati (Prestinaci dkk., 2016). World Health Organization (WHO) baru-baru ini memperkenalkan daftar patogen prioritas dan mencatat, salah satunya, *Pseudomonas aeruginosa* ke dalam daftar prioritas kritis yang bertanggung jawab atas masalah kesehatan global (WHO, 2017). *P. aeruginosa* merupakan bakteri gram-negatif yang semakin kebal terhadap berbagai antibiotik. Mereka sering menemukan cara baru untuk mengembangkan resistensi dan terkadang dapat berbagi kemampuan ini dengan bakteri lain sehingga meningkatkan penyebaran resistensi (Tacconelli dkk., 2017).

Salah satu strategi untuk mencegah resistensi antibiotik dari spesies patogen adalah dengan menggunakan senyawa baru yang tidak didasarkan pada agen antimikroba sintetis yang ada (Cheesman dkk., 2017). Alam telah menjadi

sumber produk obat selama ribuan tahun dengan banyak zat aktif berguna yang dikembangkan dari tumbuhan, bakteri, fungi, dan hewan laut (Katz dan Baltz, 2016). Di antara keempat sumber produk alam tersebut, fungi menjadi salah satu yang paling banyak dikembangkan selama enam puluh tahun terakhir. Fungi dapat menghasilkan beragam metabolit sekunder yang berspektrum luas dan bermanfaat untuk melawan virulensi serta biosidal terhadap bakteri patogen pada manusia (Jakubczyk dan Dussart, 2020).

Peran penting fungi terkait pengembangan antibiotik dapat dilihat dari penemuan penisilin pertama kali oleh Sir Alexander Fleming pada tahun 1928. Penemuan ini kemudian menjadi terobosan dan revolusi dalam penemuan obat bersumber mikroba (Wohlleben dkk., 2016). Penisilin merupakan antibiotik yang disintesis dari fungi *Penicillium notatum* dan digunakan dalam penyembuhan penyakit akibat bakteri gram-positif. Penemuan ini juga mengawali “Golden Era” (1940-1970) penemuan obat-obatan antibiotik, seperti eritromisin, streptomisin, tetrasiklin, vankomisin, dan obat kemoterapi seperti doksorubisin. Pada era tersebut, diperkirakan hampir 90% produk antibiotik yang dikenal saat ini diskriminasi dari mikroba yang berasal dari tanah (Katz dan Baltz, 2016).

Uraian di atas memberikan kesimpulan bahwa fungi tanah sangat potensial dalam pencarian senyawa dengan aktivitas antibiotik. Di antara berbagai jenis tanah, tanah muara menjadi salah satu sumber yang cukup menarik. Tanah muara biasanya terletak di sekitar perakaran mangrove. Mangrove merupakan ekosistem yang penting dan istimewa, yang dapat membentuk lingkungan ekologi untuk pengujian berkapasitas gen mikroba dan berpotensi memproduksi senyawa aktif yang melimpah (Liao dkk., 2020). Ekosistem mangrove memiliki keunikan karena tanah aluvialnya yang berlumpur kaya akan bahan organik, kandungan nitrogen, dan sulfur sehingga menyediakan banyak nutrisi yang mendukung pertumbuhan beragam kelompok mikroorganisme. Habitat ini berada di bawah pengaruh ekosistem darat dan laut serta membentuk lingkungan garam yang khas. Ini dapat menjadi faktor penentu adaptasi genetik dan metabolik, yang mendorong produksi senyawa bioaktif yang beragam secara kimiawi (Malek dkk., 2015).

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu penelitian lebih lanjut terkait pengembangan antibakteri dari fungi tanah, khususnya tanah muara. Salah satu lokasi yang berpotensi untuk diteliti adalah tanah muara di Desa Kema Satu, Kabupaten Minahasa Utara. Tanah muara tersebut terletak di daerah yang bersih dan memiliki ekosistem mangrove yang baik. Oleh sebab itu, tujuan penelitian ini dilakukan adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fungi tanah muara terhadap *P. aeruginosa*. Penelitian diawali dengan proses penumbuhan fungi pada media yang sesuai kemudian dilanjutkan dengan proses isolasi. Setelah isolat fungi didapatkan, maka dilakukan uji antagonis untuk mendapatkan isolat fungi potensial. Isolat tersebut lalu difermentasi dan diekstraksi menggunakan pelarut etil asetat. Ekstrak yang didapatkan diskriming kandungan kimianya dan diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode mikrodilusi berkonsentrasi tunggal yang dinyatakan dengan nilai persen penghambatan.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, masalah yang dapat dirumuskan pada penelitian ini antara lain:

1. Berapakah jumlah isolat aktif yang diperoleh dari hasil uji antagonis isolat fungi tanah muara terhadap bakteri *P. aeruginosa*?
2. Apakah terdapat kandungan alkaloid, terpenoid, dan fenolat dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara?
3. Berapakah nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan metode mikrodilusi?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian ini antara lain:

1. Untuk mengetahui jumlah isolat aktif yang diperoleh dari hasil uji antagonis isolat fungi tanah muara terhadap bakteri *P. aeruginosa*.

2. Untuk mengetahui kandungan alkaloid, terpenoid, dan fenolat yang terdapat dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara.
3. Untuk mengetahui persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *P. aeruginosa* dengan menggunakan metode mikrodilusi.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin didapatkan dari penelitian ini antara lain:

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *P. aeruginosa* dan dapat memberikan sumbangan pengetahuan bagi kemajuan di bidang kesehatan serta ilmu pengetahuan alam.
2. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar dalam penelitian selanjutnya untuk pencarian antibakteri baru dari produk alam.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sejarah Penemuan Antibiotik

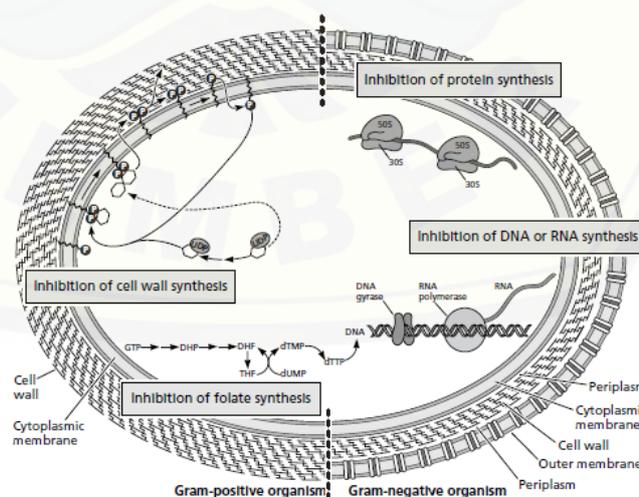
Antibiotik telah berevolusi sejak penemuan pertamanya oleh Paul Ehrlich pada tahun 1910. Ehrlich berfokus mengembangkan Salvarsan, antibiotik sintetik dari turunan senyawa organoarsenik, sebagai obat untuk melawan mikroba penyebab penyakit sifilis (Gelpi dkk., 2016). Sejak saat itu, penelitian mulai banyak dikembangkan dari senyawa-senyawa sintetik sehingga mengarah pada penemuan obat sulfonamida (Protonsil) yang disintesis oleh ahli kimia Bayer Josef Klarer dan Fritz Mietzsch serta diuji oleh Gerhard Domagk untuk aktivitas antibakteri terhadap sejumlah penyakit (Aminov dkk., 2010; Hutchings dkk., 2019). Namun, tidak lama kemudian muncul penemuan baru yang memelopori banyaknya penelitian bersumber mikroorganisme atau produk alam, yaitu penisilin. Penisilin ditemukan secara tidak sengaja oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 dari fungi *Penicillium notatum* yang ternyata mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro* (Lobanovska dan Pilla, 2017).

Setelah penisilin ditemukan, Selman Waksman menginisiasi era keemasan atau “Golden Era”, yaitu antara tahun 1940 – 1960 (Hutchings dkk., 2019). Sekitar 80% antibiotik yang ditemukan pada era ini masih digunakan hingga sekarang. Mereka diisolasi dari Actinobacteria yang hidup di tanah, khususnya dari genus *Streptomyces* (Barka dkk., 2016a; Newman dan Cragg, 2016). Streptomiset, yang merupakan metabolit sekunder dari *Streptomyces*, diketahui aktif melawan bakteri, jamur, virus, nematoda dan serangga bahkan telah dikembangkan sebagai obat anti kanker dan imunosupresan. Salah satu kesuksesan yang dihasilkan pada era ini ialah ditemukannya agen pertama yang aktif melawan patogen penyebab tuberkulosis, antara lain streptomisin dan neomisin (Waksman dkk., 2010).

2.2 Klasifikasi Antibiotik

Antibiotik pada awalnya didefinisikan sebagai zat yang diproduksi oleh satu mikroorganisme yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain (Davies dan Davies, 2010). Namun, pengertian antibiotik yang sekarang lebih mengacu pada zat yang diproduksi oleh mikroorganisme, atau pada zat serupa (diproduksi seluruhnya atau sebagian oleh sintesis kimia), yang dalam konsentrasi rendah menghambat pertumbuhan mikroorganisme lain (Hodges, 2004). Seiring berkembangnya zaman, istilah antibiotik lebih merujuk pada suatu agen untuk mengobati atau mencegah infeksi bakteri (antibakteri). Meskipun, tidak jarang ditemui agen antibiotik yang digunakan untuk infeksi fungi atau biasa disebut sebagai antifungi.

Terdapat dua mekanisme kerja obat antibiotik, yaitu bakteriostatik dan bakterisida. Bakteriostatik bekerja dengan memperlambat pertumbuhan bakteri, sementara bakterisida bekerja dengan cara membunuh bakteri. Berdasarkan struktur dan cara kerjanya, terdapat empat target utama antibiotik, yaitu biosintesis dinding sel, biosintesis protein, replikasi dan perbaikan DNA, dan biosintesis koenzim folat seperti yang dijelaskan pada Gambar 2.1 (Walsh, 2003). Golongan antibiotik berdasarkan struktur dan targetnya dapat dilihat pada Tabel 2.1.



Gambar 2.1 Target Utama Aksi Antibakteri (Sumber: Walsh, 2003)

Tabel 2.1 Golongan Antibiotik Berdasarkan Struktur, Target, dan Mekanisme Resistensi

Antibiotik	Target	Mekanisme Resistensi
Dinding sel		
	Transpeptidase/transglukosilase	
• β -laktam	(PBS / <i>Penicillin Binding Protein</i>)	β -laktamase, mutasi PBP
• Vankomisin, Teikoplanin	Biosintesis peptidoglikan	Program ulang biosintesis peptidoglikan
Sintesis Protein		
• Eritromisin	Peptidiltransferase/ribosom	Metilasi rRNA/efluks
• Tetrasiklin	Peptidiltransferase	Efluks obat
• Aminoglikosida	Peptidiltransferase	Modifikasi obat
• Oksazolidinon	Peptidiltransferase	Tidak diketahui
Replikasi DNA		
• Fluorokuinolon	DNA girase	Mutasi girase

(Sumber: Walsh, 2003)

2.3 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 Karakteristik *P. aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan bakteri gram-negatif yang mudah dijumpai, termasuk ke dalam famili Pseudomonadaceae yang dapat bertahan hidup di lingkungan yang beragam (Sibly dkk., 2011). Ukuran genom *P. aeruginosa* relatif lebih besar dibandingkan bakteri lainnya, yaitu antara 5,5-7 Mbp dan berfungsi untuk mengodekan sebagian besar enzim yang mengatur proses metabolisme, transportasi, dan pembuangan / efluks senyawa organik. Kemampuan pengodean yang dapat ditingkatkan dari genom *P. aeruginosa* ini memungkinkan dihasilkannya metabolit yang multifungsi dan kemampuan beradaptasi yang tinggi terhadap berbagai perubahan lingkungan (Pang dkk., 2018). Morfologi *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 2.2.

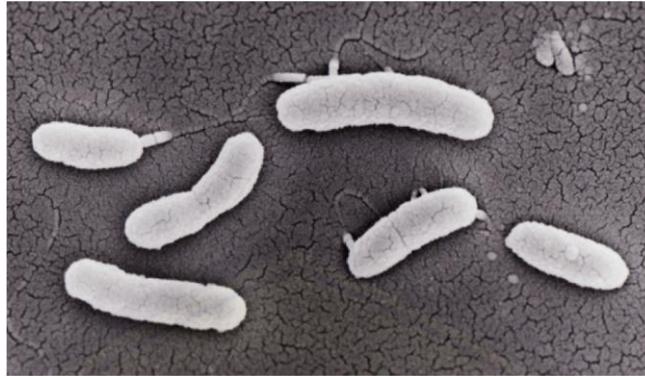
P. aeruginosa merupakan bakteri gram-negatif yang umumnya diisolasi dari tanaman, buah-buahan, tanah, dan lingkungan air, seperti sungai dan danau. Dalam kondisi tertentu, *P. aeruginosa* dapat menjadi faktor patogen yang menyebabkan infeksi parah dan oportunistik pada manusia. *P. aeruginosa* terutama menginfeksi saluran pernapasan dan saluran kemih, serta menjadi penyebab paling umum dari infeksi nosokomial, seperti *ventilator-associated pneumonia* (VAC), *meningoencephalitis*, dan sepsis (Barbier dkk., 2013; Bassetti dkk., 2018).

Infeksi *P. aeruginosa* jarang mempengaruhi individu yang sehat, namun menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada pasien fibrosis kistik dan individu dengan gangguan kekebalan tubuh (Sadikot dkk., 2005). Infeksi *P. aeruginosa* juga lebih sulit diobati dibandingkan dengan bakteri gram-positif karena bakteri ini secara alami kebal terhadap berbagai antibiotik, termasuk aminoglikosida, sefalosporin, fluoroquinolon, dan karbapenem (Arzanlou dkk., 2017; Moradali dkk., 2017).

Berdasarkan *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS), taksonomi *P. aeruginosa* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Bacteria
Subkingdom : Negibacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Pseudomonadales
Famili : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

(ITIS, 2012)



Gambar 2.2 *P. aeruginosa* pada Mikroskop Elektron dengan Perbesaran 10.000x (Sumber: Senba dan Watanabe, 2015)

2.2.2 Resistensi *P. aeruginosa*

Sebagai perlindungan, bakteri memiliki suatu mekanisme pertahanan diri yang disebut *self-defense* atau *self-resistance*. Tidak hanya untuk mempertahankan diri dari lingkungannya, tetapi juga untuk mempertahankan diri dari kerja antibiotik yang bersifat menghambat atau merusak pertumbuhannya (Peterson dan Kaur, 2018). Infeksi *P. aeruginosa* dapat mengancam nyawa dan muncul sebagai ancaman kesehatan publik sebab memiliki mekanisme untuk adaptasi, kelangsungan hidup dan resisten terhadap berbagai kelas antibiotik. Setidaknya terdapat tiga mekanisme resistensi yang mendasari kasus *multi-drug resistant P. aeruginosa*, yaitu mekanisme intrinsik, adaptif, dan *acquired* (“yang didapatkan”) (Arzanlou dkk., 2017; Moradali dkk., 2017).

Resistensi intrinsik adalah kemampuan bawaan dari suatu bakteri untuk menghalangi masuknya agen antimikroba (Arzanlou dkk., 2017). Berbeda dari gram-positif, bakteri gram-negatif memiliki membran luar yang berfungsi sebagai pembatas permeabilitas dan pencegah antibiotik untuk mencapai targetnya (Zgurskaya dkk., 2015). Pada *P. aeruginosa*, permeabilitas dari membran luarnya akan sulit ditembus. Hal ini dikarenakan adanya mekanisme bawaan yang mampu mengurangi jumlah porin non-spesifik dan menggantinya dengan porin spesifik sehingga agen antibiotik tidak dapat berdifusi (Tamber dan Hancock, 2003). *P.*

aeruginosa juga mengekspresikan berbagai pompa efluks *multi-drug* yang dikendalikan oleh gen tertentu dan berkontribusi dalam resistensi antibiotik. Gen yang terlibat biasanya berada dalam genom atau plasmid. Pompa efluks *multi-drug* adalah kompleks multi-protein yang mencakup amplop bakteri gram-negatif. Mereka bertanggung jawab untuk mengusir berbagai zat beracun dan antimikroba yang masuk ke dalam sel (Blair dkk., 2015; Venter dkk., 2015).

Resistensi adaptif adalah resistensi yang muncul akibat tekanan eksternal / lingkungan yang mempengaruhi perubahan perilaku bakteri (Arzanlou dkk., 2017). Tekanan eksternal tersebut di antaranya paparan antibiotik dan biosida, anaerobiosis, konsentrasi ion, ketersediaan sumber karbon, poliamina dan pH (Fernández dkk., 2011; Acker dan Coenye, 2016). Pada *P. aeruginosa*, mekanisme ini diperantarai oleh pembentukan sel persisten dan biofilm. Sel persisten merupakan subpopulasi sel yang memasuki keadaan diam dan berhenti tumbuh secara aktif (dorman) (Lewis, 2010). Sedangkan, biofilm merupakan seluruh komunitas mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan dan dibungkus oleh matriks polimer. Pembentukan biofilm sebagian besar didorong oleh ekskresi molekul pensinyalan kecil yang memungkinkan mikroorganisme untuk saling berkomunikasi, yang disebut *quorum sensing* (Brackman dan Coenye, 2015). Biofilm berfungsi sebagai habitat pelindung bagi sel persisten sehingga memungkinkan mereka menghindari respon imun dan mengurangi kemampuan antibiotik untuk menghambat protein seluler yang diperlukan dalam pertumbuhan bakteri (Lewis, 2010). Pembentukan biofilm ini dapat membuat bakteri 1.000 kali lebih resisten terhadap berbagai antibiotik dibandingkan dengan organisme planktonik (Taylor dkk., 2014; Acker dan Coenye, 2016).

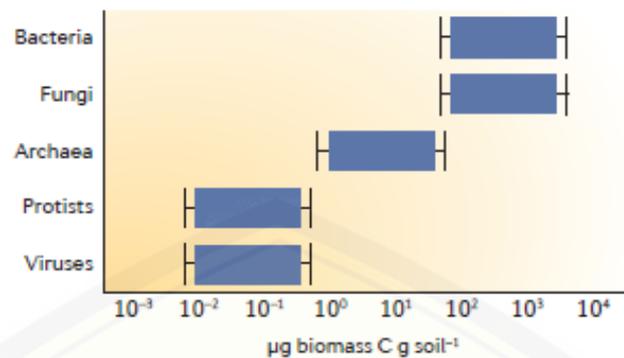
Resistensi *acquired*, atau “yang didapatkan”, melibatkan penurunan gen-gen yang bersifat mutan pada saat bakteri bereproduksi (Arzanlou dkk., 2017). Gen ini diperoleh melalui transfer plasmid secara horizontal dari bakteri lain (Davies dan Davies, 2010). Resistensi *acquired* dikaitkan dengan pemilihan antibiotik dan terjadi dengan adanya senyawa antibiotik yang menyebabkan populasi resisten secara ireversibel (Lee dkk., 2016). Resistensi *acquired* menjadi mekanisme kuat yang memberikan resistensi terhadap antibiotik berspektrum luas

dan menyebabkan peningkatan prevalensi di antara *strain P. aeruginosa* klinis dan komunitas (Moradali dkk., 2017).

2.4 Fungi Tanah

Tanah mengandung > 1.000 kg karbon biomassa mikroba per hektarnya. Mikroba tersebut memiliki peran penting dalam memerantari siklus hara, memelihara kesuburan tanah dan membantu penyerapan karbon tanah. Pentingnya mikrobioma tanah telah diakui selama lebih dari satu abad. Ini terbukti dengan adanya penemuan antibiotik dan jalur metabolisme mikroba yang unik (misalnya, fiksasi gas nitrogen dan oksidasi amonia) yang sebagian besar melibatkan simbiosis antar mikroorganisme tanah (Fierer, 2017).

Tanah merupakan ekosistem kompleks yang terdiri atas beberapa lapisan dengan kedalaman yang bervariasi. Variasi ini menyebabkan terjadinya pergeseran keragaman komunitas mikroba (termasuk laju aktivitas dan komposisi) dan karakteristik abiotik (seperti, pH, konsentrasi karbon organik, salinitas, dan konsentrasi nitrogen). Jumlah total biomassa mikroba yang ada di dalam tanah sewaktu-waktu pun dapat berubah. Perubahan tergantung pada beberapa faktor utama, yaitu rentang pH yang luas (pH 4 hingga pH > 8), ketersediaan nitrogen, kandungan karbon organik tanah, suhu, dan status redoks (Fierer, 2017). Sejauh ini, bakteri dan fungi menjadi mikroorganisme yang paling mendominasi serta memiliki biomassa 10^2 - 10^4 kali lebih banyak daripada komponen utama mikrobioma tanah lainnya, yaitu protista, arkea, dan virus (Serna-chavez dkk., 2013).



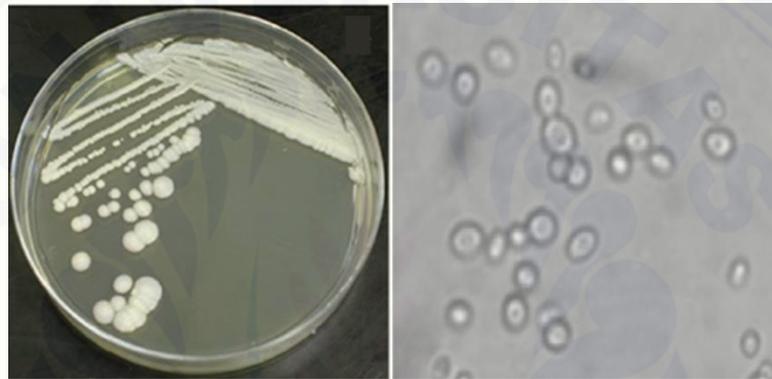
Gambar 2.3 Perkiraan Kontribusi Kelompok Mikroba Utama terhadap Biomassa Mikroba Tanah (Sumber: Fierer, 2017)

Fungi adalah mikroorganisme eukariotik yang memainkan peran fundamental secara ekologis sebagai pengurai, mutualis, atau patogen pada tumbuhan dan hewan, pendorong siklus karbon, dan penyedia nutrisi mineral tanaman. Fungi terdiri dari 100.000 spesies teridentifikasi, tetapi tingkat keanekaragamannya secara global diperkirakan mencapai 0,8 juta hingga 5,1 juta spesies (Tedersoo dkk., 2014). Fungi dibagi menjadi lima filum utama, yaitu: Chytridiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota, dan Basidiomycota (Newbound dkk., 2010; Paul, 2015). Hingga saat ini, Ascomycota dan Basidiomycota masih menjadi dua filum yang paling banyak dijumpai (Fierer, 2017).

Fungi dapat tumbuh dalam tiga bentuk, yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mold*), atau kombinasi keduanya. Secara morfologis, khamir tersusun atas sel-sel soliter dan berkembang biak dengan cara bertunas (*budding*). Sebuah sel baru merupakan hasil perkembangan dari sel induk yang kemudian membesar dan memisahkan diri. Ketika tunas-tunas baru bergabung dan tampak membentuk filamen maka hal ini disebut pseudohifa. Sebaliknya, kapang tumbuh dengan berkoloni, ditandai dengan pertumbuhan hifa yang memanjang melalui perpanjangan apikal. Sejumlah fungi secara fenotip juga dapat membentuk dua morfologi yang berbeda, yang disebut fungi dimorfik. Istilah ini kemudian dipersempit lagi untuk menggambarkan fungi yang tumbuh secara *in vivo* sebagai

khamir atau sferul dan fungi yang tumbuh secara *in vitro* sebagai kapang (McGinnis dan Tying, 1996; Madigan dkk., 2011).

Secara makroskopis, khamir berwarna putih, berbentuk bulat atau oval, uniseluler dengan ukuran 5-10 mikron. Sedangkan, secara mikroskopis, khamir membentuk spora seksual (askospora) yang bulat, lonjong, silindris, oval atau bulat telur yang panjangnya tergantung dari regangan spora (Madigan dkk., 2011; Utama dan Hanim, 2017). Contoh dari khamir adalah *Saccharomyces cerevisiae* sebagaimana Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis Khamir pada *Saccharomyces cerevisiae* (Perbesaran 400x) (Sumber: Reis dkk., 2013; Lourencetti dkk., 2017)

Secara makroskopis, kapang memiliki sporangiofor berwarna keputihan hingga coklat keabu-abuan dan sporangia berwarna coklat kehitaman. Permukaannya merambat karena membentuk rizoid dan teksturnya berambut, di sisi lain koloninya berwarna putih. Bagian tepi dari koloni tersebut tidak dapat diamati sebab kapang umumnya tumbuh dengan sangat cepat. Kapang tidak mempunyai lingkaran konsentris dan tidak memproduksi eksudat. Secara mikroskopis, pada kapang terdapat rizoid, sporangia yang berbentuk bulat atau agak bulat, kolumela yang berbentuk bulat, dan sporangiosfor ireguler (Utama dan Hanim, 2017). Contoh dari kapang adalah *Rhizopus oryzae* sebagaimana Gambar 2.5.



Gambar 2.5 Bentuk Makroskopis dan Mikroskopis pada Kapang *Rhizopus Oryzae* (Skala 50 μm) (Sumber: Dolatabadi dkk., 2014)

Fungi termasuk salah satu filum yang produktif menghasilkan metabolit sekunder dan berkontribusi di bidang kesehatan (Peláez, 2005). Dari kira-kira 33.500 metabolit bioaktif mikroba yang telah dijelaskan, sekitar 47% (15.600) berasal dari fungi (Bills dan Gloer, 2016). Contoh pemanfaatan metabolit fungi yang paling terkenal adalah antibiotik β -laktam, yang meliputi penisilin dan sefalosporin. Keduanya sama-sama efektif melawan infeksi bakteri. Selain itu, keberhasilan penisilin memicu perkembangan kemajuan teknologi baik di bidang mikrobiologi, kimia, biokimia, dan teknik, serta berperan penting dalam pembentukan industri farmasi modern. Banyak obat-obatan penting telah ditemukan melalui studi kimia dari fungi termasuk antibiotik, seperti ditunjukkan pada Tabel 2.2, sehingga produk alami terus menjadi salah satu agen terapeutik dan senyawa penuntun (*lead compounds*) dalam pengembangan terapi kanker, malaria, infeksi bakteri dan jamur, penyakit saraf dan kardiovaskular, serta gangguan autoimun (Newman dan Cragg, 2016).

Tabel 2.2 Metabolit Fungi yang Telah Dikembangkan Menjadi Produk Antibiotik

Antibiotika	Mikroorganisme yang Memproduksi	Indikasi
Penisilin G	<i>Penicillium rubens</i>	Infeksi bakteri gram-positif dan beberapa bakteri gram-negatif
Penisilin V	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Infeksi bakteri gram-positif dan beberapa bakteri gram-negatif
Sefalosporin C	<i>Acremonium chrysogenum</i>	Antibiotik topikal untuk infeksi bakteri gram-positif termasuk <i>Staphylococcus aureus</i> yang resisten terhadap metisilin; dalam pengembangan untuk infeksi sendi prostetik

(Sumber: Bills dan Gloer, 2016)

2.5 Ekosistem Mangrove

Mangrove adalah kelompok spesies tanaman toleran garam, mayoritas dari vegetasi *sclerophyllous*, yang hidup di daerah muara intertidal tropis dan subtropis. Meskipun hanya menempati 1% dari total luas hutan tropis, mangrove menyediakan lingkungan yang unik, menghubungkan antara daratan dan lautan, serta menjadi habitat bagi sebagian mamalia, burung, ikan dan serangga. Ekosistem mangrove umumnya kaya akan flora terkait, yang meliputi bakteri, jamur, alga, rumput laut, lumut, dan vegetasi lainnya. Keragaman flora akan semakin tinggi di daerah lembab dan basah dan buruk di daerah kering. Mangrove berfungsi sebagai penghalang badai dan gelombang air laut yang sifatnya menghancurkan sehingga penting dalam perlindungan pantai (Alappatt, 2018; Jia dkk., 2020).

Mikroorganisme yang menghuni ekosistem mangrove menghasilkan enzim baru dengan susunan entitas kimia yang berbeda. Hal ini disebabkan oleh lingkungan tempat mangrove tumbuh tidak bersahabat. Mangrove hidup dalam kondisi lingkungan dengan salinitas dan suhu tinggi (sekitar 30 °C sepanjang tahun), hipoksia (kekurangan oksigen), lapisan tanah yang tergenang air, tekanan pasang surut, angin kencang, dan gelombang laut (Alappatt, 2018). Mangrove

juga menjadi habitat yang unik bagi kolonisasi mikroorganisme seperti fungi dan bakteri sebab ekosistemnya kaya akan nutrisi (karbon, nitrogen, dan sumber penting lainnya) dan air.

Ekosistem mangrove menjadi lokasi yang tepat untuk mempelajari dan menemukan metabolit sekunder bioaktif baru. Selama 2 dekade terakhir, lebih dari 1.000 metabolit baru telah diisolasi dari mikroba mangrove, ~850 berasal dari fungi endofit dan ~120 dari bakteri. Metabolit sekunder ini memiliki aktivitas tinggi dan memiliki nilai ekonomi yang besar di berbagai industri, salah satunya obat-obatan. Banyak metabolit baru yang diisolasi dari mikroorganisme yang berasal dari mangrove berpotensi untuk pengembangan obat baru dengan aktivitas antibakteri, antijamur, atau antitumor (Jia dkk., 2020; Liao dkk., 2020).

2.6 Isolasi Fungi

Isolasi merupakan proses pemindahan dan pemisahan fungi berdasarkan perbedaan morfologinya yang dapat dilihat secara makroskopis dari bentuk, warna, dan tekstur. Selama proses kultur, fungi yang tumbuh dalam media biasanya lebih dari satu koloni. Oleh karena itu, perlu pemisahan dari masing-masing koloni ke media pertumbuhan yang baru sehingga diperoleh isolat tunggal dalam satu *petri dish*. Media kultur umumnya mengandung karbohidrat dan nitrogen dalam konsentrasi tinggi (pH 5-6) sehingga memfasilitasi pertumbuhan fungi (Basu dkk., 2015). Beberapa media kultur yang dapat digunakan untuk pertumbuhan fungi antara lain *sabouraud dextrose agar* (SDA), *potato dextrose agar* (PDA), *czapek's dox agar* (CDA), *malt extract agar* (MEA), dan *corn meal agar* (CMA) (Ali dkk., 2016). PDA termasuk media yang paling umum digunakan dan telah lama dikenal sebagai media utama untuk isolasi dan kultivasi fungi. PDA mampu menunjang ketersediaan nutrisi bagi fungi dikarenakan mengandung dekstrosa dan infus kentang. Fungi dapat memecah pati yang terkandung dalam kentang menjadi gula yang mudah larut, yang kemudian menyuplai sumber karbon dan energi. Kentang juga menyediakan nitrogen, enzim, vitamin, dan mineral untuk pertumbuhan fungi yang efisien (Wongjiratthiti dan Yottakot,

2017). Selain PDA pada umumnya, ada juga media PDA dengan tambahan antibiotik yang biasa direkomendasikan untuk isolasi fungi. Antibiotik tersebut berfungsi untuk menghambat berbagai bakteri gram-positif dan gram-negatif sehingga menyediakan media yang selektif untuk pertumbuhan fungi (HiMedia Technical Data, 2019).

2.7 Uji Antagonis

Uji antagonis adalah prosedur yang dilakukan untuk mengetahui potensi antibakteri dari isolat fungi tanah muara terhadap bakteri yang diujikan. Ada dua macam metode dalam uji antibakteri, yaitu difusi dan dilusi. Metode difusi terdiri dari *agar disk-diffusion method* dan *antimicrobial gradient method* (Etest). Untuk uji antagonis, metode *agar disk-diffusion* biasanya lebih umum digunakan karena prosesnya yang sederhana dan tidak membutuhkan banyak biaya. Selain *agar disk-diffusion*, terdapat metode lain dengan prinsip yang kurang lebih sama dan digunakan di beberapa penelitian, yaitu metode *agar plug diffusion* (Silambarasan dkk., 2012; Sabdaningsih dkk., 2016). Metode ini dilakukan dengan cara mengontakkan potongan agar dari isolat fungi ke permukaan agar yang telah dikultur oleh bakteri uji. Senyawa yang diduga memiliki aktivitas antibakteri akan disekresikan oleh isolat kemudian berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan adanya pembentukan zona bening (Balouiri dkk., 2016).

2.8 Fermentasi

Fermentasi adalah konversi biologis dari substrat yang kompleks menjadi senyawa yang lebih sederhana melalui aktivitas berbagai macam mikroorganisme, seperti bakteri dan fungi. Dalam proses pemecahan metabolik ini, dikeluarkan senyawa-senyawa tambahan baru selain produk fermentasi, seperti karbondioksida dan alkohol, yang disebut sebagai metabolit sekunder. Metabolit sekunder terdiri dari beberapa senyawa antibiotik hingga peptida, enzim, dan

faktor pertumbuhan. Metabolit sekunder juga biasa disebut dengan istilah “senyawa bioaktif” sebab memiliki beragam aktivitas biologis (Subramaniyam dan Vimala, 2012).

Fermentasi telah banyak digunakan untuk menghasilkan produk antibiotik, salah satunya penisilin (Najafpour, 2007). Ada dua macam metode fermentasi berdasarkan ada-tidaknya penambahan air, yaitu *submerged fermentation* (SmF) dan *solid-state fermentation* (SSF) (Behera dkk., 2019). SmF adalah fermentasi mikroorganisme dalam suatu media cair. Proses ini digunakan untuk memproduksi enzim atau metabolit lainnya dengan menumbuhkan mikroorganisme terpilih (bakteri dan fungi) dalam wadah tertutup yang berisi kaldu nutrisi (media fermentasi). Mikroorganisme mencerna nutrisi dan melepaskan enzim yang diinginkan ke dalam media (Barragán dkk., 2016). Sementara pada SSF, media fermentasi yang digunakan sifatnya padat dan dapat dengan mudah di daur ulang atau digunakan kembali untuk fermentasi selanjutnya dalam waktu yang lama. Oleh karena itu, metode ini perlu pelepasan nutrisi yang terkontrol. Media kultur tersebut berupa dedak, ampas tebu (*bagasse*), bubur kertas (*paper pulp*) dan lain-lain (Behera dkk., 2019).

Pemilihan metode fermentasi sangat tergantung pada produk akhir dan aplikasi akhirnya. Jika produk diperlukan dalam bentuk yang sangat murni yang dapat diterapkan di industri farmasi (misalnya antibiotik), maka SmF dapat menjadi pilihan yang tepat. Ada empat cara untuk menumbuhkan mikroorganisme dengan metode SmF, yaitu *batch culture*, *fed-batch culture*, dan *continuous culture*. Pada *batch culture*, mikroorganisme diinokulasi dalam volume media yang tetap sehingga nutrisi yang diberikan terbatas. Sebaliknya, pada *fed-batch culture* terjadi penambahan nutrisi yang terkonsentrasi secara bertahap sehingga jumlah media akan terus meningkat dan nutrisi menjadi lebih melimpah. Berbeda dari kedua metode tersebut, yang sifatnya tertutup, fermentasi terbuka atau yang biasa dikenal dengan *continuous culture* melibatkan proses penggantian media. Media yang baru akan ditambahkan ke dalam sistem *batch* (seiring dengan penarikan produk yang dihasilkan) pada saat mikroorganisme memasuki fase pertumbuhan atau eksponensial. *Continuous batch culture* memberikan

pertumbuhan mikroorganisme yang hampir seimbang, dengan sedikit fluktuasi nutrisi, metabolit, jumlah sel, atau biomassa (Singhania dkk., 2015). Saat ini, metode *batch culture* lebih banyak digunakan untuk menarik senyawa metabolit sekunder dari mikroorganisme dikarenakan prosesnya yang lebih sederhana, efisien, dan minim kontaminasi (Yang dan Sha, 2019).

2.9 Ekstraksi

Untuk mendapatkan senyawa kimia (metabolit sekunder) yang diinginkan, maka perlu dilakukan proses ekstraksi. Ekstraksi termasuk langkah yang penting dalam analisis fitokimia. Umumnya, jumlah senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh produk alam sangat rendah sehingga perlu untuk mengekstraknya tanpa merusak komposisi senyawa tersebut (Mosić dkk., 2021). Metode ekstraksi yang dipilih pada penelitian ini adalah ekstraksi cair-cair (*liquid-liquid extraction*). Ekstraksi cair-cair, atau disebut juga dengan partisi, adalah metode pemisahan yang didasarkan pada perpindahan zat terlarut dari satu pelarut ke pelarut yang lain, dengan dua pelarut yang tidak saling campur atau sebagian bercampur satu sama lain (Berk, 2013). Pelarut dipilih berdasarkan beberapa pertimbangan, seperti selektivitas, solubilitas, keamanan, dan biaya (Zhang dkk., 2018). Ekstraksi ini memanfaatkan prinsip *like dissolve like* sehingga senyawa yang polaritasnya mendekati pelarut akan mudah terpisahkan. Ada dua proses penting dalam ekstraksi cair-cair, yaitu *mixing* dan *separation*. *Mixing* adalah proses mengontakkan campuran dengan pelarut yang digunakan. Selama *mixing* berlangsung, solut (metabolit sekunder) dari campuran tersebut akan ditransfer menuju pelarut sehingga terbentuklah dua fase yang menandakan pemisahan (*separation*), yaitu fase organik dan fase air (Law dan Todd, 2008; Berk, 2018).

2.10 Uji Antibakteri

Berbeda dari metode uji antagonis, yang lebih digunakan untuk skrining awal aktivitas antibakteri, uji antibakteri dilakukan menggunakan metode dilusi.

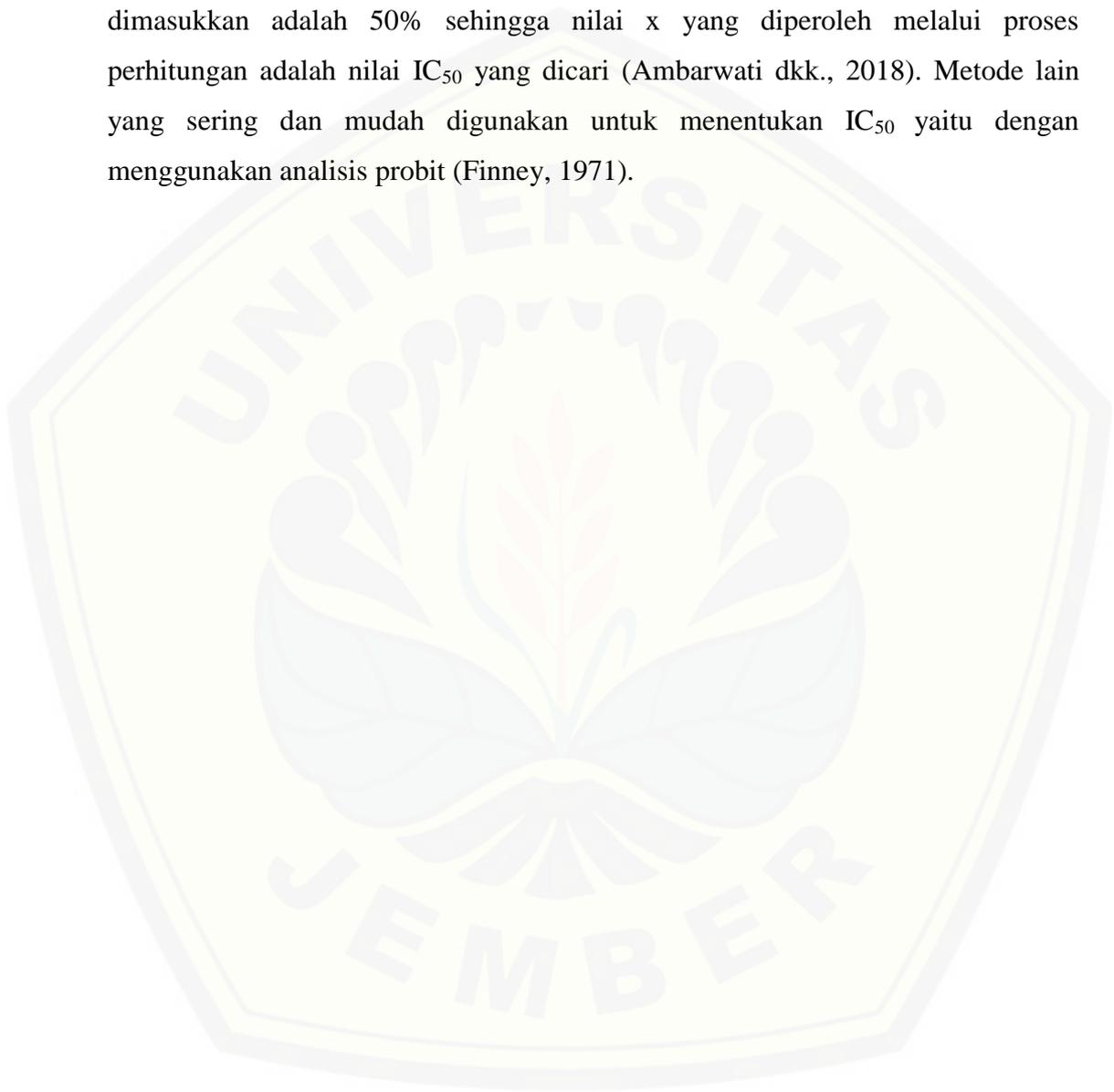
Metode dilusi mampu menentukan nilai konsentrasi hambat minimum (*minimum inhibitory concentration* / MIC) yang tidak dapat ditentukan pada metode difusi. Oleh sebab itu, metode dilusi lebih bersifat kuantitatif. MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan biasa dinyatakan dalam $\mu\text{g/mL}$ atau mg/L . Pedoman standard untuk pengujian antibakteri secara dilusi dapat dilihat di *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) atau *European Committee on Antimicrobial Suceptibility Testing* (EUCAST) (Balouiri dkk., 2016).

Metode dilusi yang sering diterapkan dalam pengujian antibakteri adalah *broth dilution method*. Metode ini terbagi menjadi dua berdasarkan jumlah sampel yang digunakan, yaitu makrodilusi dan mikrodilusi. Pada makrodilusi, sampel uji atau ekstrak biasanya diencerkan dalam tabung berkapasitas minimum 2 mL. Sementara pada mikrodilusi, ekstrak uji diencerkan dalam volume yang lebih kecil menggunakan *microplate 96-well*. Pengenceran ekstrak dilakukan dengan kelipatan dua / *two-fold* (misalnya 1, 2, 4, 8, 16, 32 $\mu\text{g/mL}$, dst) dalam media *cation-adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB). Mikroba disiapkan dalam bentuk suspensi pada media yang sama dan distandardisasi konsentrasinya berdasarkan skala McFarland kemudian diinokulasi ke masing-masing tabung atau *microplate*. Setelah mikroba dan ekstrak tercampur dengan baik, tabung atau *microplate* diinkubasi di bawah kondisi yang sudah ditentukan (35 ± 2 °C, 16-20 jam) untuk selanjutnya dicatat nilai absorbansi dan dihitung persen penghambatannya (Balouiri dkk., 2016; CLSI, 2017).

Dibandingkan dengan makrodilusi, metode mikrodilusi dapat memberikan nilai MIC yang lebih akurat dengan reproduibilitas tinggi dan efisien, baik dalam hal waktu maupun biaya sebab peralatan yang digunakan lebih sedikit dan waktu pengerjaan cenderung lebih singkat. Oleh Karena itu, pemilihan metode mikrodilusi untuk pengujian antibakteri berbasis laboratorium lebih dipertimbangkan (Balouiri dkk., 2016).

Selain untuk menentukan MIC, uji mikrodilusi juga dapat digunakan untuk menentukan nilai *Half Maximum Inhibitory Concentration* (IC_{50}). IC_{50} didefinisikan sebagai konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat

pertumbuhan dari 50% bakteri. IC_{50} dapat dihitung ketika persen penghambatan dari beberapa seri konsentrasi diperoleh. IC_{50} dihitung menggunakan persamaan garis $y = a+bx$ dengan x sebagai konsentrasi uji dari larutan ekstrak dan y sebagai nilai persen penghambatan. Untuk menentukan IC_{50} maka nilai y yang dimasukkan adalah 50% sehingga nilai x yang diperoleh melalui proses perhitungan adalah nilai IC_{50} yang dicari (Ambarwati dkk., 2018). Metode lain yang sering dan mudah digunakan untuk menentukan IC_{50} yaitu dengan menggunakan analisis probit (Finney, 1971).



BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium DUDRG, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Kimia Medisinal, dan Laboratorium Analisis Instrumen. Waktu pengerjaan dimulai dari Bulan Agustus 2020 hingga Juni 2021.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Terikat

Yang menjadi variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase penghambatan ekstrak fungi tanah muara terhadap bakteri yang diuji.

3.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas yang ditentukan dari penelitian ini yaitu konsentrasi etil asetat hasil dari fermentasi fungi tanah muara.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol dari penelitian ini terdiri dari media yang digunakan, yaitu media pertumbuhan fungi, media isolasi dan media peremajaan bakteri; dan beberapa metode, seperti metode fermentasi dan ekstraksi, metode penentuan aktivitas antibakteri; serta prosedur penelitian. Selain itu, juga termasuk suhu inkubasi, untuk fungi 28 °C selama 7 hari dan untuk bakteri 37 °C selama 24 jam.

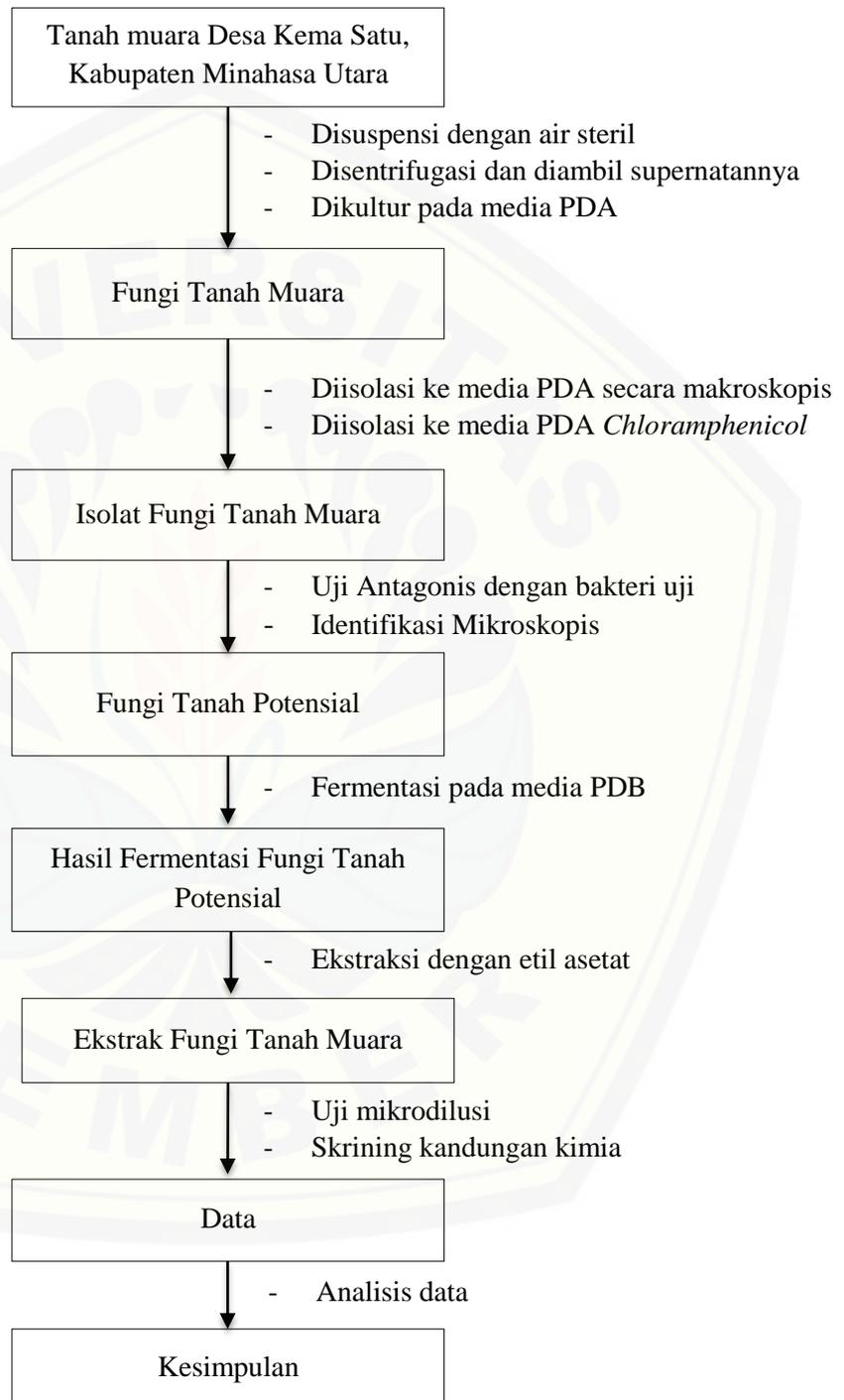
3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tanah muara secara spesifik merupakan tanah yang terletak di perbatasan antara air tawar dan air laut sehingga seringkali dijumpai berada dekat dengan perakaran mangrove.
2. Fungi tanah merupakan fungi yang diperoleh dan diisolasi setelah ditumbuhkan dari tanah muara.
3. Isolat fungi merupakan fungi tanah yang telah diisolasi dan dibedakan secara makroskopis (berdasarkan bentuk, tekstur, dan warnanya) maupun secara mikroskopis dan bukan merupakan isolat murni.
4. Uji antagonis merupakan uji yang dilakukan dengan cara mengontakkan isolat fungi tanah terhadap bakteri uji sehingga memunculkan zona hambat.
5. Zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran dan menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji.
6. Fermentasi merupakan proses yang dilakukan untuk memperbanyak metabolit sekunder yang diproduksi oleh isolat fungi dengan memanfaatkan media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Proses ini dilakukan dalam *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm selama 14 hari.
7. Ekstrak etil asetat merupakan ekstrak yang diperoleh dari hasil ekstraksi menggunakan pelarut semipolar etil asetat untuk menarik metabolit sekunder dari isolat fungi yang sudah difermentasi.
8. Pengujian antibakteri yaitu pengujian yang dilakukan melalui metode mikrodilusi menggunakan *microplate 96-well* dan dengan masing-masing sumuran (*well*) berisi 100 μ L suspensi bakteri uji. Tingkat kekeruhan diukur menggunakan *microplate reader* dan persen penghambatannya dihitung.

3.5 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian dilakukan sebagaimana skema yang ditampilkan berikut ini:



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1 Alat

Laminar Air Flow (THERMO CIENTIFIC 1300 SERIES A2), autoklaf (B-ONE), *shaker incubator* (B-ONE), neraca analitik (OHAUS), *hot plate* (HEIDOLPH), vorteks (GENE-2), mikropipet (Socorex dan Eppendorf), *centrifuge*, spektrofotometer UV-Vis (GENESYS), mikroskop, *microplate flat bottom 96-wells* (IWAKI), *microplate reader* (CORONA SH-1000), lemari asam, ultraviolet detektor, *ultrasonic cleaner*, dan destilator. Peralatan lain berupa: erlenmeyer (SCHOTT DURAN), cawan petri (DURAN), gelas ukur (DURAN), *beaker glass* (BOROSIL), corong pisah (SCHOTT DURAN), penyaring dengan pompa vakum, penyemprot reagen, *chamber KLT* (CAMAG), pembakar spiritus, jarum ose, tabung sentrifus (BIOLOGIX), jangka sorong (TRICLE BRAND), pinset, *spreader, yellow tip, blue tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vial, mangkok ekstrak, spatula logam, kaca preparat, pipet tetes, *disposable syringe*, dan *syringe filter* 0,45 μm .

3.6.2 Bahan

Sampel tanah muara didapat dari Bapak Saeful A. Tauladani (peneliti di Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung) yang diambil dari Desa Kema Satu (Lokasi 2), Kecamatan Kema, Kabupaten Minahasa Utara, Provinsi Sulawesi Utara, *sterile water for injection*, aqua demineralisata (HYDROBATT), air laut, larutan NaCl 0,9%, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), PDB (HIMEDIA), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (HIMEDIA), bakteri *P. aeruginosa* (ATCC 27853), DMSO (Emsure), CaCl₂ (Sigma), MgCl₂ (Brataco), BaCl₂, H₂SO₄, etil asetat teknis, etanol 70%, gentamisin sulfat sebagai kontrol positif, lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ (Merck), reagen dragendorff, vanilin-H₂SO₄, spiritus, *plastic wrap*, kertas saring, dan aluminium foil.

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 0,1 MPa. Terdapat perbedaan durasi waktu sterilisasi antara alat dengan bahan. Untuk sterilisasi alat, waktu yang digunakan adalah 15 menit sedangkan untuk sterilisasi bahan digunakan waktu 17 menit.

3.7.2 Pembuatan Media PDA

Media PDA merupakan jenis media yang umum digunakan untuk pertumbuhan fungi. Media disiapkan dengan menimbang sejumlah 9,75 gram PDA kemudian dilarutkan dalam 250 mL pelarut. Jumlah yang harus ditimbang didapatkan berdasarkan instruksi yang tertera pada label media, yaitu 39 gram media per 1.000 mL pelarut. Pelarut yang dipilih adalah air laut. Setelah selesai dibuat, media kemudian dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk hingga mendidih atau terlarut. Langkah berikutnya yaitu dilakukan sterilisasi sesuai metode 3.7.1 selama 17 menit. Media yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri, ditunggu hingga memadat dan direkatkan dengan *plastic wrap*. Prosedur ini dilakukan secara aseptik di dalam LAF.

3.7.3 Pembuatan Media PDA *Chloramphenicol*

Media PDA *Chloramphenicol* (PDAC) digunakan untuk menumbuhkan isolat fungi dari media PDA dan memastikan bahwa pertumbuhan isolat tersebut bebas dari bakteri. Media disiapkan dengan menimbang sebanyak 9,75 gram PDAC kemudian dilarutkan dalam 250 mL pelarut. Ini dihitung berdasarkan instruksi dari label kemasan, yaitu 39 gram media per 1.000 mL pelarut. Setelah selesai dibuat, media dilarutkan di atas *hot plate* sampai homogen atau jernih dan terakhir disterilisasi sesuai media 3.7.1 selama 17 menit. Media yang sudah steril lalu dituang ke cawan petri secara aseptik di dalam LAF, ditunggu hingga memadat, dan ditutup serta direkatkan menggunakan *plastic wrap*.

3.7.4 Pembuatan Media PDB

Media PDB merupakan media yang umum untuk pertumbuhan fungi, namun perbedaannya dari PDA adalah secara fisik bentuknya berupa air kaldu atau cair. Media disiapkan dengan menimbang sejumlah 4,8 gram PDB kemudian dilarutkan dalam 200 mL pelarut untuk proses fermentasi. Jumlah yang harus ditimbang didapatkan berdasarkan instruksi yang tertera pada label media, yaitu 24 gram media per 1.000 mL pelarut. Pelarut yang digunakan dalam prosedur ini adalah aqua demineralisata. Setelah media selesai dibuat, dilakukan sterilisasi sesuai metode 3.7.1 selama 17 menit. Media yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri, ditunggu hingga memadat, dan direkatkan dengan *plastic wrap* secara aseptik di dalam LAF.

3.7.5 Pembuatan Media MHA

Media MHA merupakan media yang tepat untuk pertumbuhan bakteri. Media ini disiapkan dengan menimbang sejumlah 8,5 gram MHA kemudian dilarutkan ke dalam 250 mL aqua demineralisata. Jumlah yang ditimbang diperoleh berdasarkan instruksi yang tertera pada label media, yaitu 34 gram media per 1.000 mL pelarut. Selesai dibuat, media kemudian dipanaskan di atas *hot plate* sambil diaduk hingga mendidih atau terlarut. Media tersebut lalu disterilisasi sesuai metode 3.7.1 selama 17 menit. Media yang sudah steril, dituang ke cawan petri, ditunggu hingga memadat, dan direkatkan dengan *plastic wrap* secara aseptik di dalam LAF.

3.7.6 Penyiapan Sampel Tanah

Sampel tanah yang tersedia dimasukkan ke dalam tabung sentrifus dan dilarutkan dengan 10 mL air steril. Sampel dihomogenisasi dengan cara divorteks selama 3 menit. Kemudian, sampel disentrifugasi pada kecepatan 1.000 rpm selama 10 menit. Di dalam LAF, supernatan diambil sebanyak 100 μ L dengan menggunakan mikropipet lalu dikultur dan diratakan menggunakan *spreader* di atas cawan media PDA yang sebelumnya sudah disiapkan. Cawan hasil kultur

tersebut ditutup dan dirapatkan dengan *plastic wrap* lalu diinkubasi pada suhu ruangan 28 °C selama 7 hari.

3.7.7 Isolasi Fungi Tanah

Isolasi fungi tanah merupakan proses memindahkan fungi yang tumbuh ke media PDA baru berdasarkan perbedaan morfologinya guna mendapatkan isolat. Terkadang, terdapat lebih dari satu koloni yang muncul pada sampel tanah yang sudah dikultur. Oleh sebab itu, isolasi penting dilakukan agar fungi yang didapat adalah isolat tunggal. Isolasi dilakukan dengan cara mengambil masing-masing koloni fungi yang dapat dibedakan secara makroskopis menggunakan jarum ose lalu digoreskan ke media PDA baru secara aseptik. Kemudian, hasil isolasi dirapatkan menggunakan *plastic wrap* dan diinkubasi pada suhu ruangan 28 °C selama 7 hari. Isolat fungi ini akan diamati lagi secara mikroskopis sebelum akhirnya digunakan untuk skrining awal aktivitas antibakteri.

3.7.8 Penyiapan Bakteri Uji

Sebelum skrining awal antibakteri, perlu disiapkan bakteri uji dengan cara melakukan peremajaan. Proses ini diawali dengan menginokulasi bakteri indukan ke media MHA baru secara aseptik, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah diremajakan, bakteri uji diambil dengan jarum ose lalu disuspensikan ke dalam 10 mL NaCl fisiologis 0,9% dan dihomogenkan menggunakan vorteks. Kekeruhan suspensi yang diperoleh disetarakan dengan standard McFarland 0,5, yaitu dengan membandingkan nilai absorbansi yang terukur pada panjang gelombang 625 nm menggunakan spektrofotometri UV-Vis. Rentang absorbansi antara 0,08 – 0,13 mengindikasikan bahwa jumlah bakteri yang terkandung setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Suspensi yang memenuhi kriteria kemudian dipipet sebanyak 100 µL dan ditanam pada media MHA serta diratakan menggunakan *spreader*.

3.7.9 Uji Antagonis Isolat Fungi dengan Bakteri Uji

Uji antagonis atau yang disebut sebagai skrining awal adalah suatu proses untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri pada sampel yang diuji. Uji antagonis dilakukan dengan cara mengontakkan langsung isolat fungi ke media bakteri melalui metode difusi sumuran (*agar plug method*). Isolat fungi diambil dengan alat pembuat sumuran (*cork borer*) lalu dipindahkan ke media MHA menggunakan jarum ose. Prosedur ini dilakukan secara aseptik di dalam LAF. Setelah itu, dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hasil uji antagonis yang perlu diamati adalah kemunculan zona bening yang menandakan adanya aktivitas penghambatan isolat fungi terhadap bakteri sehingga dapat dinyatakan sebagai isolat aktif yang berpotensi sebagai agen antibakteri. Zona bening diukur menggunakan jangka sorong dengan cara mencari rata-rata diameter zona bening dari tiga sisi yang berbeda.

3.7.10 Fermentasi

Fermentasi adalah proses perbanyakan isolat fungi yang potensial. Fermentasi dilakukan dengan cara memasukkan kurang lebih lima potong isolat fungi ke media PDB 200 mL secara aseptik. Media tersebut kemudian diletakkan di dalam *shaker incubator* pada suhu 28 °C dengan kecepatan 125 rpm selama 14 hari hingga fungi mencapai fase kesetimbangan dan menghasilkan metabolit sekunder yang diinginkan.

3.7.11 Ekstraksi

Ekstraksi bertujuan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder dari hasil fermentasi isolat fungi. Pertama-tama, hasil fermentasi disaring untuk memisahkan isolat fungi dengan media PDB. Media hasil penyaringan ditambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan partisi cair-cair selama 15 menit dengan replikasi maksimal tiga kali. Hasil ekstraksi dituang ke dalam mangkok ekstrak dan diuapkan di suhu ruang. Ekstrak yang

bebas pelarut diambil lalu dimasukkan ke dalam vial untuk ditimbang dan disimpan sebagai bahan pembuatan larutan uji.

3.7.12 Skrining Kandungan Kimia

Skrining kandungan kimia dilakukan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT). KLT merupakan metode yang sederhana, cepat, dan efisien untuk mengetahui ada berapa banyak senyawa yang terkandung dalam suatu ekstrak. Melalui KLT, identitas senyawa dapat diketahui dengan tiga cara, yaitu: 1) membandingkan nilai R_f senyawa uji dengan kontrol; 2) menggunakan reagen fitokimia, yang mana perubahan warna pada lempeng KLT menunjukkan adanya senyawa kimia tertentu yang terkandung dalam ekstrak; dan 3) mengamati secara visual lempeng KLT di bawah sinar UV (Sashidaran dkk., 2011).

Skrining kandungan kimia dilakukan untuk mendeteksi adanya kandungan senyawa alkaloid, terpenoid, dan fenolat pada ekstrak. Larutan uji ditotolkan pada lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ dan dieluasi menggunakan eluen yang sesuai berdasarkan hasil optimasi. Eluen dikatakan baik apabila noda yang dihasilkan di lempeng KLT dapat memisah secara jelas. Reagen yang digunakan untuk skrining kandungan kimia, antara lain: dragendorff untuk mendeteksi alkaloid dan ditandai dengan noda warna jingga dan vanilin-H₂SO₄ untuk mendeteksi terpenoid yang ditandai dengan noda warna ungu serta untuk mendeteksi fenolat yang ditandai dengan noda warna merah muda (Wagner dan Bladt, 2001; Harborne, 2006).

3.7.13 Uji Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara

a. Pembuatan Media *Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) untuk Uji Aktivitas secara Mikrodilusi

Media MHB ditimbang sejumlah 1,05 gram dan dilarutkan ke dalam 50 mL aqua demineralisata dalam erlenmeyer. Selanjutnya, dilakukan sterilisasi media dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121 °C. Setelah steril, ditambahkan MgCl₂ dan CaCl₂ (Mg²⁺ = 10-12,5 mg/L dan Ca²⁺ = 20-25 mg/L) ke

dalam media. Larutan induk MgCl_2 dibuat dengan melarutkan 0,8354 gram $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 10 mL aqua demineralisata hingga didapatkan konsentrasi 10 mg/mL. Sementara, larutan induk CaCl_2 dibuat dengan melarutkan 0,3668 gram $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 10 mL aqua demineralisata hingga didapatkan konsentrasi 10 mg/mL. Larutan induk MgCl_2 dan CaCl_2 dipipet masing-masing 225 μL dan 450 μL lalu ditambahkan ke dalam media MHB steril 200 ml sehingga diperoleh konsentrasi Mg^{2+} sebanyak 11,25 mg/L dan Ca^{2+} sebanyak 22,5 mg/L (CLSI, 2012).

b. Peremajaan Biakan Bakteri

Stok bakteri *P. aeruginosa* diinokulasi menggunakan jarum ose pada media MHA steril yang baru. Proses ini dilakukan secara aseptik di dalam LAF dan setelah selesai dapat langsung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

c. Pembuatan Standar McFarland 0,5

Standar McFarland digunakan untuk memperkirakan tingkat kekeruhan suatu suspensi bakteri. Kekeruhan dikatakan memenuhi kriteria apabila berada pada rentang absorbansi $\pm 0,09$ setelah diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm. Standar McFarland dibuat dengan memipet 0,05 mL BaCl_2 1% dan 9,95 mL H_2SO_4 ke dalam tabung reaksi. Campuran tersebut dihomogenkan menggunakan vorteks sebelum diukur absorbansinya (CLSI, 2012).

d. Pembuatan Biakan Aktif

Satu ose koloni bakteri *P. aeruginosa* hasil peremajaan disuspensikan ke dalam 10 mL CAMHB steril ke dalam tabung reaksi. Kekeruhan suspensi bakteri dibandingkan dengan standar McFarland 0,5 dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 625 nm menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kekeruhan

harus berada pada rentang absorbansi 0,08-0,13 yang menandakan konsentrasi sel bakteri sudah setara dengan 1×10^8 CFU/mL (CLSI, 2012).

e. Pembuatan Larutan Kontrol

1) Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan yaitu gentamisin sulfat. Gentamisin sulfat sebanyak 40 mg/mL diencerkan dengan media CAMHB lalu diambil sebanyak 1 μ g/mL sebagai kontrol positif.

2) Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan yaitu DMSO 1%. DMSO sebanyak 1 mL dipipet dan dilarutkan dalam 100 mL CAMHB.

f. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan melarutkan 1 mg ekstrak ke dalam 100 μ L DMSO 100% kemudian diencerkan 100 kalinya dengan media CAMHB sehingga diperoleh konsentrasi akhir ekstrak 100 μ g/mL dan DMSO 1%.

g. Uji Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Suspensi bakteri yang sudah dibuat sesuai konsentrasi 1×10^8 CFU/mL dalam CAMHB diencerkan lagi 100 kalinya menggunakan media yang sama sampai didapatkan konsentrasi baru 1×10^6 CFU/mL. Sumuran pada lempeng mikrodilusi diisi sebanyak 50 μ L suspensi bakteri tersebut kemudian ditambahkan larutan uji, kontrol positif, atau kontrol negatif sebanyak 50 μ L sehingga didapatkan konsentrasi akhir bakteri 5×10^4 CFU/mL dalam sumuran. Desain *microplate* pengujian antibakteri dapat dilihat pada Gambar 3.1. Tahap ini terbagi menjadi beberapa kelompok perlakuan, di antaranya:

- 1) Kelompok perlakuan: 50 μL larutan ekstrak (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam DMSO 1%) dicampur dengan 50 μL suspensi bakteri (5×10^6 CFU/mL) dalam media CAMHB.
- 2) Kontrol ekstrak: 50 μL larutan ekstrak (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam DMSO 1%) dicampur dengan 50 μL media CAMHB.
- 3) Kontrol negatif ekstrak: 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB dicampur dengan 50 μL suspensi bakteri (5×10^6 CFU/mL) dalam media CAMHB.
- 4) Kontrol DMSO 1%: 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB dicampur dengan 50 μL media CAMHB.
- 5) Kontrol positif: 50 μL gentamisin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dicampur dengan 50 μL suspensi bakteri (5×10^6 CFU/mL) dalam media CAMHB.
- 6) Kontrol gentamisin: 50 μL gentamisin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dicampur dengan 50 μL media CAMHB.
- 7) Kontrol negatif gentamisin: 50 μL media CAMHB dicampur dengan 50 μL suspensi bakteri (5×10^6 CFU/mL) dalam media CAMHB.
- 8) Kontrol media: 100 μL media CAMHB.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Gambar 3. 2 Desain *Microplate* Uji Antibakteri Metode Mikrodilusi

Keterangan:

-  Ekstrak dalam DMSO 1% 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kelompok perlakuan)
-  Ekstrak dalam DMSO 1% 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol ekstrak)
-  Gentamisin 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol positif)
-  Gentamisin 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol gentamisin)
-  DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif ekstrak)
-  DMSO 1% dalam media CAMHB 50 μ L + media CAMHB 50 μ L (kontrol DMSO)
-  Media CAMHB 50 μ L + bakteri dalam CAMHB 50 μ L (kontrol negatif gentamisin)
-  Media CAMHB 100 μ L (kontrol media)

3.7.14 Analisis Data

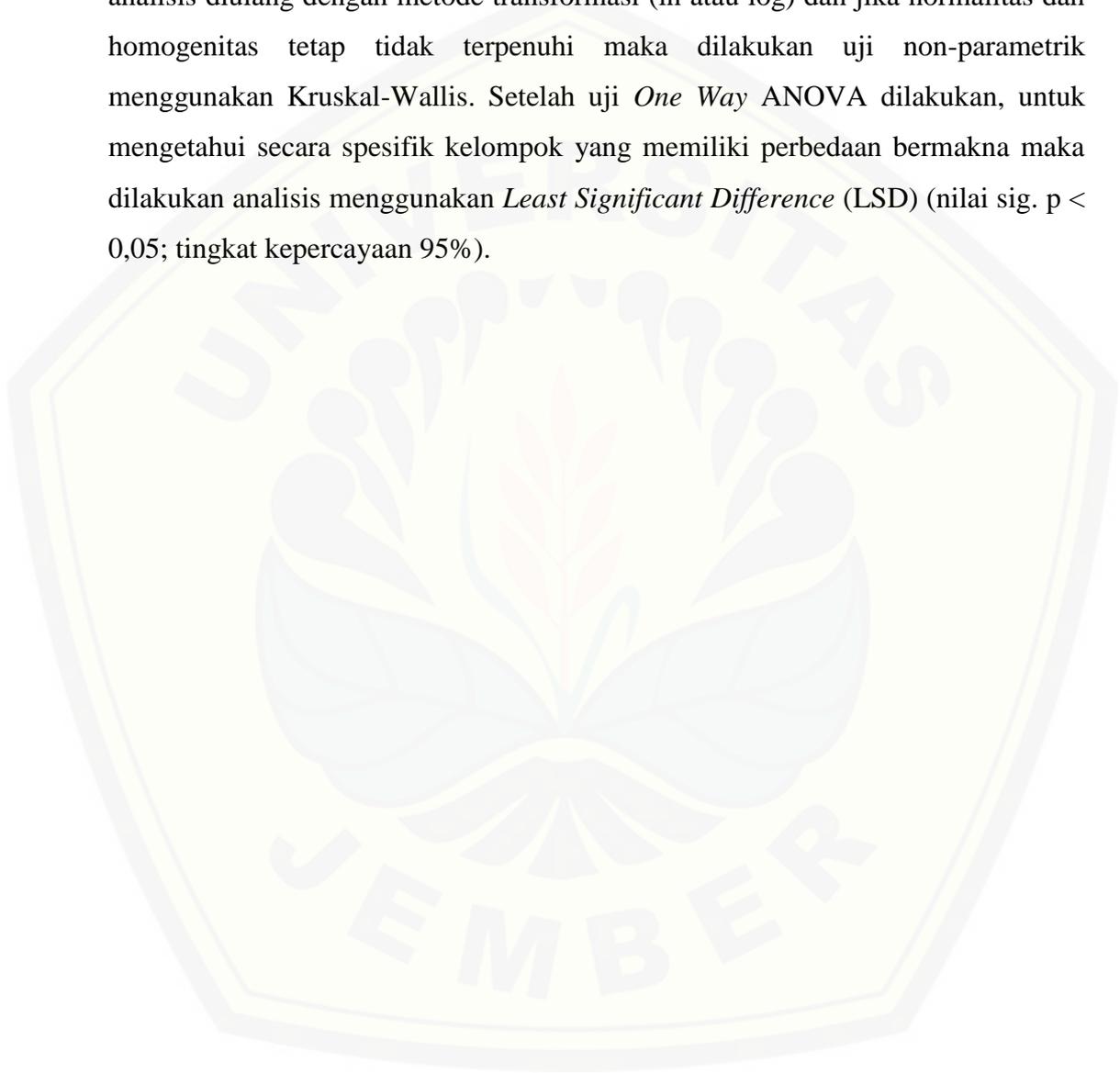
Analisis data yang didapatkan terdiri atas hasil skrining kandungan kimia dan hasil uji mikrodilusi. Pada uji mikrodilusi besar nilai persen penghambatan pertumbuhan bakteri dihitung berdasarkan pengukuran absorbansi dengan rumus sebagai berikut (Savitri dkk., 2020).

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

Keterangan:

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

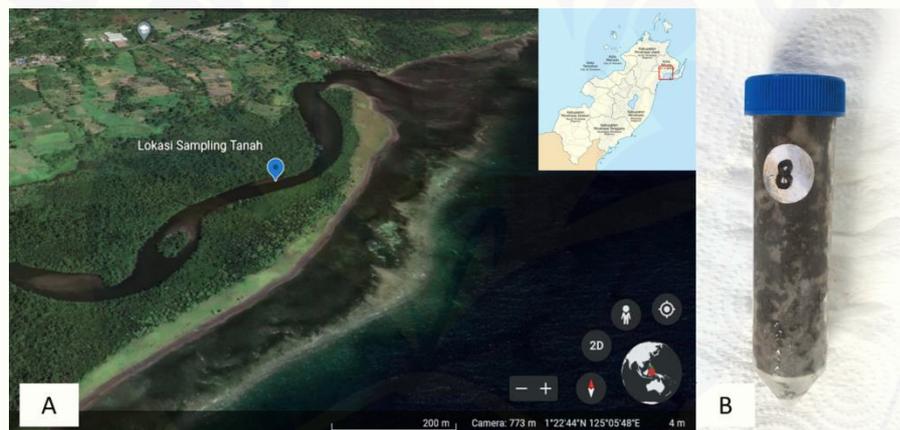
Hasil perhitungan di atas dianalisis secara statistik menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbedaan bermakna antara persen penghambatan kelompok uji (nilai sig. $p < 0,05$). Uji *One Way ANOVA* dilakukan dengan syarat data sudah normal dan homogen. Apabila data tidak normal dan tidak homogen, analisis diulang dengan metode transformasi (ln atau log) dan jika normalitas dan homogenitas tetap tidak terpenuhi maka dilakukan uji non-parametrik menggunakan Kruskal-Wallis. Setelah uji *One Way ANOVA* dilakukan, untuk mengetahui secara spesifik kelompok yang memiliki perbedaan bermakna maka dilakukan analisis menggunakan *Least Significant Difference (LSD)* (nilai sig. $p < 0,05$; tingkat kepercayaan 95%).



BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pengambilan Sampel Tanah Muara

Sampel tanah muara dalam penelitian ini didapatkan dari Desa Kema Satu, Kecamatan Kema, Kabupaten Minahasa Utara, Provinsi Sulawesi Utara ($1^{\circ}23'03''\text{N}$ $125^{\circ}05'55''\text{E}$). Titik lokasi pengambilan sampel tanah muara dapat dilihat pada Gambar 4.1 (A). Sampel tanah diambil secara acak di sekitar hutan mangrove pada kedalaman 10-20 cm menggunakan spatula sebanyak ± 15 gram dalam keadaan air laut sedang surut. Setelah diambil, sampel tanah dimasukkan ke tabung *conical* dalam keadaan steril dan disimpan dalam *freezer* untuk menghambat pertumbuhan bakteri atau kontaminan lain di dalamnya.



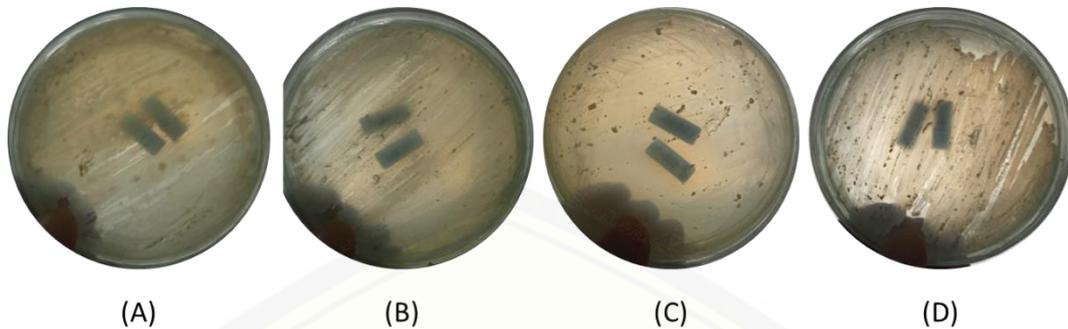
Gambar 4. 1 Pengambilan Sampel Tanah Muara: (A) Titik lokasi pengambilan tanah di Desa Kema Satu dan (B) Sampel tanah yang disimpan di dalam tabung *conical* dalam keadaan steril

Tanah muara dan mangrove termasuk bagian dari ekosistem laut dengan kondisi lingkungan yang unik, terutama memiliki gradien salinitas yang bervariasi. Salinitas ini dipengaruhi oleh adanya pencampuran antara air laut dan air tawar. Salinitas telah dikaitkan sebagai faktor utama yang mengatur komposisi kimia bakteri dan keragamannya terhadap berbagai habitat yang berbeda dan oleh karena itu gradien salinitas juga cenderung mempengaruhi keragaman jenis fungi (Mohamed dan Martiny, 2011). Ekosistem mangrove yang

ekstrim dan adanya kompetisi antar mikroorganisme di dalamnya menjadikan fungi harus beradaptasi dengan menghasilkan metabolit sekunder. Senyawa metabolit inilah yang kemudian diketahui memiliki beragam bioaktivitas yang menarik untuk diteliti (Thatoi dkk., 2013).

4.2 Isolasi dan Identifikasi Isolat Fungi Tanah Muara

Isolasi diawali dengan proses pembiakan atau kultur fungi tanah muara pada media PDA secara aseptik. Tanah muara dengan kode sampel BTG8 sebelumnya disentrifugasi dan diambil supernatannya sebanyak 100 μ L kemudian dikultur dan diratakan di atas cawan media PDA yang sudah disiapkan. Setelah diinkubasi selama kurang lebih 7 hari pada suhu 28 °C, pertumbuhan koloni fungi pada media diamati secara makroskopis melalui bentuk, warna, dan teksturnya. Pada isolasi pertama, diperoleh empat morfologi fungi yang berbeda dalam satu *petri dish* biakan sampel tanah BTG8 dan kemudian dipisahkan menjadi empat isolat seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.2. Selama dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan keempat isolat tersebut, muncul morfologi baru pada isolat IS1-BTG8-1 dan IS1-BTG8-4 sehingga dilakukan proses isolasi kedua yang menghasilkan enam isolat, yaitu IS2-BTG8-1-1, IS2-BTG8-1-2, IS2-BTG8-1-3, IS2-BTG8-4-1, dan IS2-BTG8-4-2. Ketika diamati kembali pertumbuhan dari kelima isolat, muncul morfologi baru dari isolat IS2-BTG8-4-1 sehingga dilakukan proses isolasi ketiga yang menghasilkan dua isolat, yaitu IS3-BTG8-4-1-1 dan IS3-BTG8-4-1-2. Untuk lebih jelasnya, skema proses isolasi dapat dilihat pada Gambar 4.3. Dengan demikian, total isolat yang dihasilkan ada delapan isolat tunggal seperti yang ditunjukkan Gambar 4.4 dan ciri-ciri makroskopis kedelapan isolat dapat dilihat pada Tabel 4.1. Kedelapan isolat dipindahkan ke media PDA dengan kloramfenikol (PDAC) untuk memastikan apakah terdapat pertumbuhan kontaminan, misalnya bakteri, atau tidak. Jika tidak ada kontaminan, maka isolat dapat direkultur pada media PDA kembali agar pada saat uji antagonis, kloramfenikol dari media PDAC tidak memberikan zona penghambatan sehingga memberikan hasil positif palsu.



Gambar 4. 2 Hasil Isolasi Pertama Fungi Tanah Muara pada Media PDA Setelah 7 hari:
(A) IS1-BTG8- 1, (B) IS1-BTG8-2, (C) IS1-BTG8-3, dan (D) IS1-BTG8-4

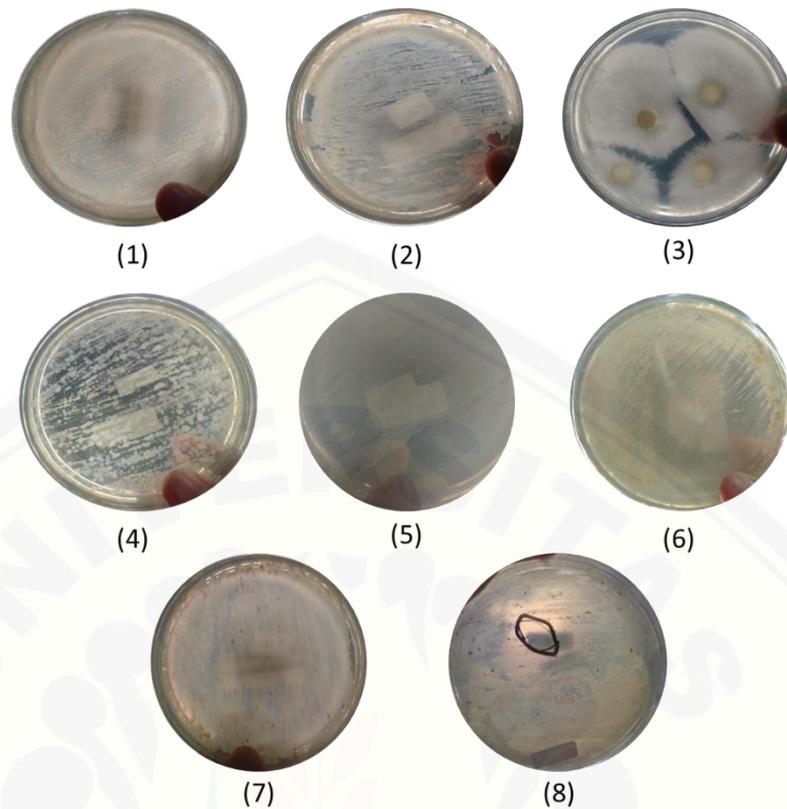


Gambar 4.3 Skema Isolasi Fungi Tanah Muara dari Sampel Tanah BTG8

Ketika melalui proses isolasi kedua, terjadi perubahan morfologi pada IS2-BTG8-1-3 yang awalnya menunjukkan ciri morfologi khamir menjadi morfologi kapang. Kapang merupakan jenis fungi yang memiliki ciri makroskopis dengan tekstur seperti kapas. Pada kapang, kumpulan hifa yang membentuk miselium dapat dilihat secara visual, ukuran koloninya yang besar juga membedakannya

dari khamir yang umumnya bertekstur lembek dengan sel-sel soliter (McGinnis dan Tying, 1996). Morfologi kapang ini muncul semakin jelas pada hari ke-14. Dalam mikologi, perubahan morfologi fungi yang bersifat reversibel dari khamir menjadi kapang atau sebaliknya disebut dengan dimorfik (Gow dkk., 2012). Dimorfisme dipicu oleh kondisi lingkungan yang berbeda, seperti temperatur, pH, oksigen, ketersediaan glukosa, sumber nitrogen, ion metal, dan komposisi nutrisi yang kompleks (Pathan dkk., 2019a). Umumnya, bentuk dimorfik dimiliki oleh fungi yang bersifat patogen, contohnya *Candida albicans*. *C. albicans* akan berada pada bentuk khamir ketika berada di lingkungan *in vivo* pada suhu 37 °C dan akan berada pada bentuk kapang ketika berada di lingkungan *in vitro* pada suhu sekitar 25 °C (Boyce dan Andrianopoulos, 2015).

Isolat IS2-BTG8-1-3 telah memenuhi persyaratan untuk disebut sebagai fungi dimorfik hanya berdasarkan suhu yang dibutuhkan untuk pertumbuhannya. Tetapi faktanya, literatur lain mengatakan bahwa komposisi media yang tinggi akan unsur karbon dan nitrogen justru lebih menguntungkan untuk pertumbuhan khamir pada fungi dimorfik (Pathan dkk., 2019b). Tentu hal ini kontra dengan kondisi kultur yang digunakan dalam penelitian, yang mana media PDA sebagai media kultur fungi justru menyediakan nutrisi karbon dan nitrogen yang melimpah. Karena banyaknya kemungkinan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan fungi dimorfik, kepastian apakah IS2-BTG8-1-3 merupakan fungi jenis ini sangatlah diragukan. Oleh sebab itu, munculnya morfologi kapang pada isolat IS2-BTG8-1-3 diduga sebagai koloni baru yang berbeda dari koloni sebelumnya sehingga perlu dipisahkan kembali.

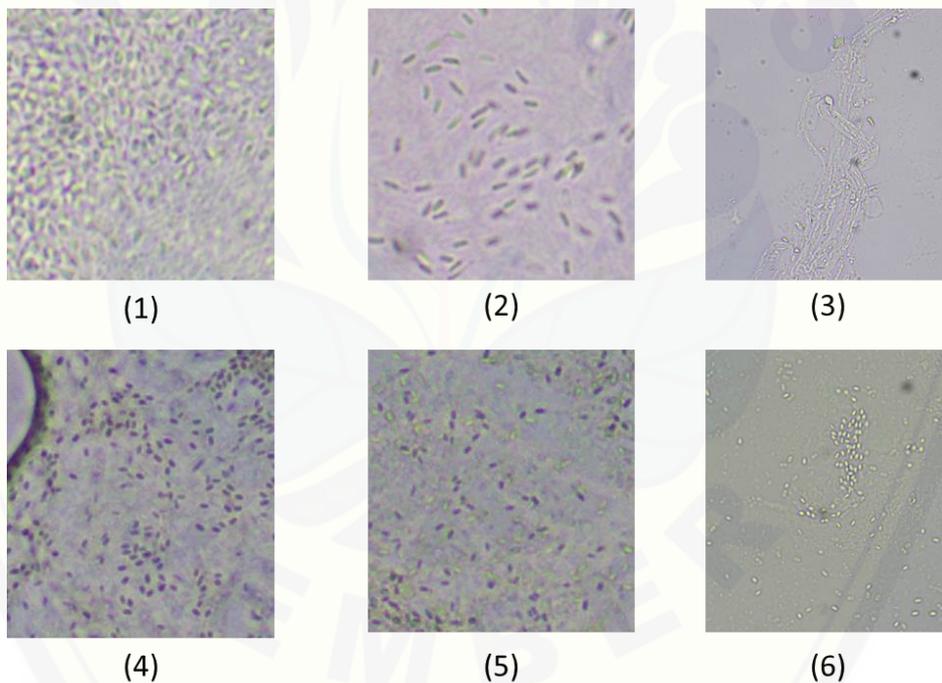


Gambar 4.4 Isolat Tunggal Fungi Tanah Muara pada Media PDA: (1) IS2-BTG8-1-1, (2) IS2-BTG8-1-2, (3) IS2-BTG8-1-3, (4) IS1-BTG8-2, (5) IS1-BTG8-3, (6) IS3-BTG8-4-1-1, (7) IS3-BTG8-4-1-2, dan (8) IS2-BTG8-4-2

Tabel 4.1 Ciri-Ciri Makroskopis Delapan Isolat Fungi Tanah Muara pada Media PDA

No.	Kode Sampel	Warna	Bentuk Koloni/Tekstur
1	IS2-BTG8-1-1	Putih kecokelatan	Permukaan tidak rata, bergranul
2	IS2-BTG8-1-2	Putih kecokelatan	Permukaan tidak rata
3	IS2-BTG8-1-3	Putih hingga kecokelatan	Permukaan tidak rata, berfilamen, tepi <i>irregular</i>
4	IS1-BTG8-2	Putih	Permukaan tidak rata
5	IS1-BTG8-3	Putih	Permukaan rata/halus
6	IS3-BTG8-4-1-1	Putih kekuningan	Permukaan tidak rata
7	IS3-BTG8-4-1-2	Putih susu	Permukaan tidak rata, bergranul
8	IS2-BTG8-4-2	Putih kecokelatan	Permukaan tidak rata, bergranul

Berdasarkan hasil pengamatan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa sebagian besar isolat fungi tanah muara yang tumbuh, kecuali IS2-BTG8-1-3, cenderung memiliki warna putih kecokelatan dengan permukaan yang tidak rata yang selanjutnya dapat diperkirakan merupakan ciri morfologi dari khamir. Untuk memastikan apakah hasil identifikasi morfologi secara makroskopis valid, maka dilakukan identifikasi mikroskopis terhadap isolat fungi tanah muara. Identifikasi mikroskopis dilakukan terhadap enam isolat aktif fungi tanah muara (yang diperoleh dari hasil uji antagonis) dengan tujuan untuk menghemat waktu dan sumber daya penelitian. Hasil identifikasi mikroskopis dari enam isolat aktif fungi tanah muara dapat dilihat pada Gambar 4.5 sedangkan ciri mikroskopisnya tertera pada Tabel 4.2.



Gambar 4.5 Hasil Pengamatan Mikroskopis Enam Isolat Aktif Fungi Tanah Muara: (1) IS2-BTG8-1-1 (100x), (2) IS2-BTG8-1-2 (100x), (3) IS2-BTG8-1-3 (40x), (4) IS1-BTG8-2 (40x), (5) IS1-BTG8-3 (40x), dan (6) IS3-BTG8-4-1-1 (40x)

Tabel 4.2 Ciri-Ciri Mikroskopis Isolat Aktif Fungi Tanah Muara

No.	Nama Sampel	Bentuk sel	Hifa/Pseudohifa
1	IS2-BTG8-1-1	Oval	-
2	IS2-BTG8-1-2	Oval	-
3	IS2-BTG8-1-3	Memanjang/Filamen	+
4	IS1-BTG8-2	Oval	-
5	IS1-BTG8-3	Oval	-
6	IS3-BTG8-4-1-1	Oval	-

(-) Tidak ada

Berdasarkan data hasil pengamatan secara mikroskopis, dapat dipastikan bahwa lima dari enam isolat fungi tanah muara yang tumbuh adalah jenis khamir karena memiliki sel berbentuk oval (Phale, 2018). Sedangkan, isolat IS2-BTG8-1-3 termasuk ke dalam jenis kapang dikarenakan memiliki bentuk sel memanjang seperti filamen dan menunjukkan adanya hifa yang merupakan bentuk dari pertumbuhan spora (Cairns dkk., 2019). Hifa yang ditunjukkan oleh isolat tersebut merupakan hifa yang bersekat/berseptata. Selain fungi, mikroorganisme lain yang ikut mendominasi ekosistem mangrove adalah aktinomisetes. Aktinomisetes merupakan bentuk peralihan antara fungi dan bakteri serta termasuk bakteri gram-positif yang memiliki struktur berupa miselium (Barka dkk., 2016). Meskipun memiliki morfologi yang hampir sama, aktinomisetes berbeda dari fungi sebab termasuk mikroorganisme prokariotik (tidak memiliki membran inti sel) dan ukuran hifanya lebih kecil daripada fungi (Barka dkk., 2016). Pada hasil penelitian mikroskopis isolat fungi tanah muara, inti sel tidak dapat diamati sehingga sulit memperkirakan ada atau tidaknya aktinomisetes. Namun, dapat dipastikan tidak ada pertumbuhan aktinomisetes, dengan pertimbangan bahwa selama proses isolasi, fungi telah dipindahkan ke media PDAC yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, termasuk aktinomisetes. Untuk mengetahui secara spesifik spesies dari isolat fungi tersebut, maka diperlukan uji filogenetik.

4.3 Uji Antagonis Isolat Fungi Tanah Muara

Uji antagonis berfungsi sebagai skrining awal untuk mendapatkan isolat yang berpotensi memiliki aktivitas penghambatan terhadap *P. aeruginosa*. Proses ini dilakukan menggunakan *agar plug method* dengan hasil pengamatan berupa diameter zona hambat. Data hasil uji antagonis dapat dilihat pada Tabel 4.3.

Tabel 4.3 Diameter Zona Hambat Isolat Fungi Tanah Muara

No.	Kode sampel	Diameter zona hambat (mm)
1	IS2-BTG8-1-1	15,43
2	IS2-BTG8-1-2	11,75
3	IS2-BTG8-1-3	5,37
4	IS1-BTG8-2	10,22
5	IS1-BTG8-3	10,90
6	IS3-BTG8-4-1-1	12,10
7	IS3-BTG8-4-1-2	-
8	IS2-BTG8-4-2	-

Zona hambat atau zona bening muncul ketika isolat fungi yang memiliki kandungan senyawa aktif mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji. Dari delapan isolat yang diuji antagonis, dua di antaranya tidak menunjukkan aktivitas penghambatan, yaitu IS3-BTG8-4-1-2 dan IS2-BTG8-4-2. Fenomena ini dapat diperantarai oleh beberapa sebab, antara lain fungi tidak memproduksi senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri atau media yang digunakan untuk menumbuhkan fungi tidak cukup kondusif sehingga tidak mendukung fungi dalam menghasilkan senyawa antibakterinya (Barton dan Northup, 2011).

Berdasarkan hasil pengukuran zona hambat pada Tabel 4.3, diperoleh enam isolat dengan diameter zona hambat yang bervariasi. Variasi zona hambat antar isolat mengindikasikan beberapa dari kemungkinan berikut: 1) perbedaan jumlah atau konsentrasi agen antibakteri yang dihasilkan, 2) kemampuan agen antibakteri dari isolat fungi untuk berdifusi melalui media, 3) perbedaan jenis metabolit sekunder yang diproduksi dan 4) tingkat ketahanan strain bakteri uji terhadap agen antibakteri (Moran dkk., 2016). Bakteri memiliki sensitivitas yang bervariasi terhadap ekstrak uji. Faktor-faktor lain yang berpengaruh terhadap aktivitas antibakteri antara lain konsentrasi mikroorganisme uji, temperatur, dan

pH (Pelczar dan Chan, 2008). Dapat disimpulkan bahwa pada penelitian ini hanya enam isolat yang dikatakan aktif dan dapat dilanjutkan ke proses fermentasi dan ekstraksi. Isolat IS2-BTG8-1-1 diduga memiliki potensi antibakteri terbesar dengan diameter zona hambat 15,43 mm sedangkan isolat IS2-BTG8-1-3 diduga memiliki potensi aktivitas antibakteri terkecil dengan diameter zona hambat 5,37 mm.

4.4 Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Tanah

4.4.1 Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan memasukkan inokulum dari masing-masing isolat fungi ke dalam media kultur, yaitu PDB. Fungi, sama halnya dengan bakteri, akan memulai proses metabolisme sekundernya ketika memasuki fase stasioner. Pada fase ini, laju pertumbuhan fungi sama dengan laju kematiannya dan terjadi akumulasi produk metabolit sekunder, salah satunya antibiotik. Fase stasioner berlangsung selama 9-15 hari (Tarman dkk., 2013) dan terjadi saat fungi kekurangan sumber nutrisi (Navarro Llorens dkk., 2010). Oleh sebab itu, fermentasi dilakukan dengan masa inkubasi 14 hari untuk memperoleh metabolit sekunder yang diinginkan. Agitasi diberikan selama proses fermentasi berlangsung dengan cara menginkubasi isolat fungi di dalam *shaker incubator*. Proses agitasi membantu meratakan ketersediaan nutrisi dalam media (Ibrahim dkk., 2015). Selama fermentasi, beberapa macam perubahan diamati, di antaranya perubahan warna dan bentuk fungi. Perubahan warna dan konsistensi media dapat dikaitkan dengan pertumbuhan miselia fungi yang intens, metabolisme nutrisi, dan produksi beberapa metabolit (Mascarin dkk., 2010). Hasil fermentasi isolat aktif fungi tanah muara dapat dilihat pada Gambar 4.6. Terlihat bahwa tiga sampel hasil fermentasi menunjukkan perubahan warna medium menjadi lebih gelap atau pucat dan konsistensi medium menjadi lebih pekat dan keruh, yang kemungkinan menandakan bertambah banyaknya massa fungi yang tumbuh maupun metabolit yang diproduksinya.



Gambar 4.6 Hasil Fermentasi Isolat Aktif Fungi Tanah Muara Selama 14 Hari pada Media PDB. (1) IS2-BTG8-1-1, (2) IS2-BTG8-1-2, (3) IS2-BTG8-1-3, (4) IS1-BTG8-2, (5) IS1-BTG8-3, dan (6) IS3-BTG8-4-1-1 (+Etil asetat)

4.4.2 Ekstraksi

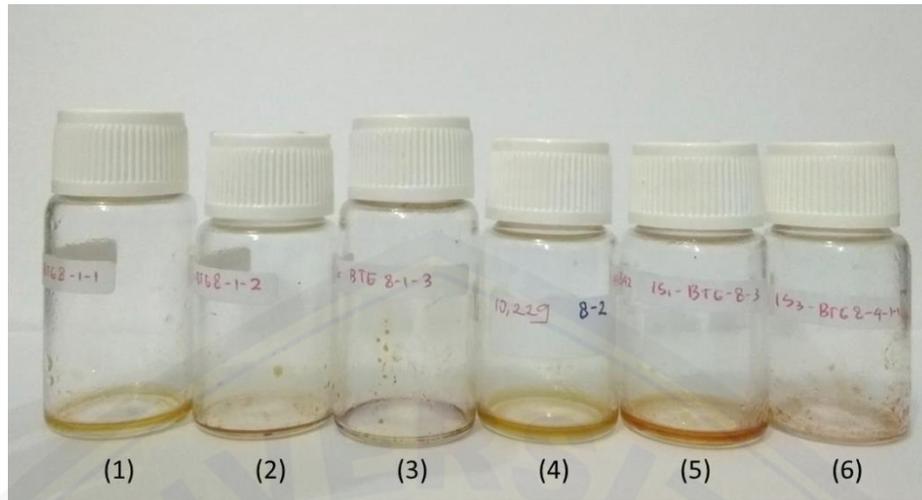
Proses ekstraksi diawali dengan menyaring hasil fermentasi untuk memisahkan antara isolat fungi dan kaldu media yang berisi metabolit sekunder. Kaldu fermentasi kemudian ditambahkan etil asetat dengan perbandingan 1:1 dalam corong pisah dan dikocok kuat serta dibiarkan selama 15 menit hingga fase air dan pelarut terpisah (Jain dan Pundir, 2011). Proses ekstraksi cair-cair dapat dilihat pada Gambar 4.7. Etil asetat dipilih karena memiliki sifat semi polar sehingga dapat menarik senyawa yang bersifat polar maupun non polar dan mudah dipisahkan dengan pelarut (air) dari media PDB (Berk, 2018).

Hasil ekstraksi fungi tanah muara dapat berupa ekstrak cair hingga kental dengan berat yang berbeda-beda seperti yang ditunjukkan pada Gambar 4.8. Persen rendemen menunjukkan banyaknya ekstrak yang diperoleh selama proses

ekstraksi, selain itu persen rendemen juga dikaitkan dengan banyak atau sedikitnya senyawa aktif yang terkandung dalam suatu ekstrak. Semakin besar persen rendemen yang dihasilkan suatu ekstrak, maka semakin banyak senyawa aktif yang terkandung di dalamnya (Harborne, 1987). Besar persen rendemen dari masing-masing ekstrak fungi tanah muara dapat dilihat pada Tabel 4.4.



Gambar 4.7 Proses Ekstraksi Cair-Cair Menggunakan Corong Pisah Sehingga Terbentuk 2 Fase: Fase Etil Asetat (Atas) dan Fase Air (Bawah).



Gambar 4.8 Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara: (1) IS2-BTG8-1-1, (2) IS2-BTG8-1-2, (3) IS2-BTG8-1-3, (4) IS1-BTG8-2, (5) IS1-BTG8-3, (6) IS3-BTG8-4-1-1

Tabel 4. 4 Rendemen Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara

No.	Kode sampel	Volume (mL)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen (% b/v)
1	IS2-BTG8-1-1	185	0,1861	0,100
2	IS2-BTG8-1-2	191	0,0494	0,026
3	IS2-BTG8-1-3	199	0,0474	0,024
4	IS1-BTG8-2	187	0,152	0,081
5	IS1-BTG8-3	179	0,139	0,078
6	IS3-BTG8-4-1-1	183	0,0488	0,027

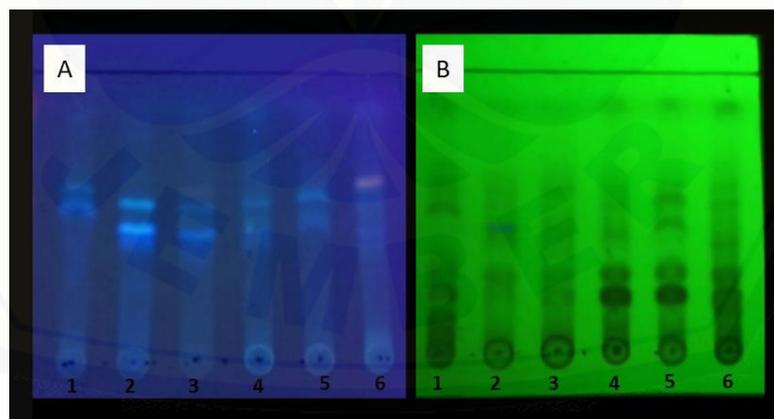
Berdasarkan perolehan data di atas, dapat diketahui bahwa ekstrak IS2-BTG8-1-1 menghasilkan % rendemen terbesar, yaitu 0,100 % dan IS2-BTG8-1-3 menghasilkan % rendemen terkecil, yaitu 0,024 %. Diduga ekstrak IS2-BTG8-1-1 mengandung lebih banyak senyawa aktif dan IS2-BTG8-1-3 mengandung paling sedikit senyawa aktif. Terdapat beberapa aspek yang mempengaruhi banyak-sedikitnya ekstrak yang dihasilkan, yaitu: 1) ditinjau dari proses ekstraksi, misalnya jenis metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan (Wakeel dkk., 2019), 2) ditinjau dari proses fermentasi yang sebelumnya dilakukan: konsentrasi nutrisi (karbon dan nitrogen) yang tidak mencukupi atau media yang tidak sesuai dan

banyak-sedikitnya jumlah inokulum yang dimasukkan ke dalam media fermentasi (Mascarin dkk., 2010).

4.5 Skrining Kandungan Kimia

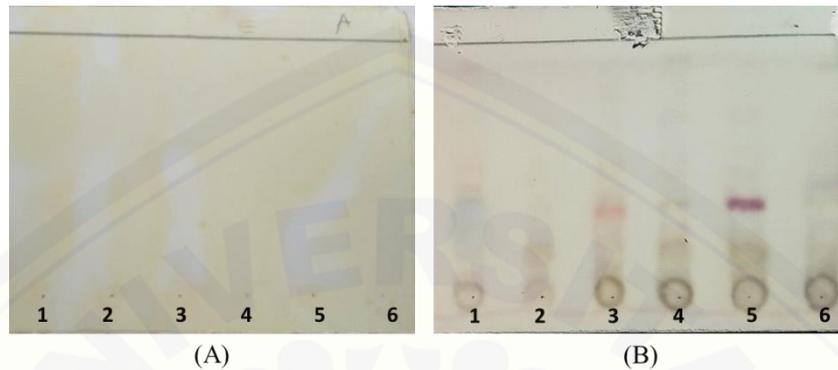
Skrining kandungan kimia dilakukan dengan metode KLT. Proses ini diawali dengan optimasi eluen secara *trial and error*. Eluen dikatakan baik apabila dapat memisahkan senyawa dalam ekstrak secara jelas di bawah sinar UV. Berdasarkan optimasi, didapatkan eluen diklorometana : metanol dengan perbandingan 9,5 : 0,5. Selanjutnya, eluen dimasukkan ke dalam *chamber* dan ditunggu hingga jenuh.

Keenam ekstrak etil asetat fungi tanah muara masing-masing dilarutkan secukupnya di dalam metanol kemudian lempeng KLT silika gel 60 F₂₅₄ disiapkan. Sampel ditotolkan menggunakan pipa kapiler sebanyak kurang lebih dua kali penotolan dengan jarak antar sampel 0,8 cm dan jarak eluasi 4 cm. Setelah eluen jenuh, lempeng KLT yang sudah ditotolkan sampel lalu dimasukkan ke dalam *chamber*. Profil kromatogram ekstrak fungi tanah muara dapat dilihat pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Profil Kromatogram Ekstrak Fungi Tanah Muara dalam Eluen Diklorometana : Metanol (9,5 : 0,5) di Bawah (A) Deteksi UV 365 nm dan (B) Deteksi UV 254 nm; 1 = IS2-BTG8-1-1, 2 = IS2-BTG8-1-2, 3 = IS2-BTG8-1-3, 4 = IS1-BTG8-2, 5 = IS1-BTG8-3, 6 = IS3-BTG8-4-1-1

Pada penelitian ini, kandungan kimia yang ingin dicari yaitu alkaloid, terpenoid, dan fenolat. Hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak dapat dilihat pada Gambar 4.10 dan Tabel 4.5.



Gambar 4.10 Hasil Identifikasi Kandungan Kimia Menggunakan (A) Reagen dragendorff untuk alkaloid dan (B) Reagen vanilin- H_2SO_4 untuk terpenoid/fenolat; 1 = IS2-BTG8-1-1, 2 = IS2-BTG8-1-2, 3 = IS2-BTG8-1-3, 4 = IS1-BTG8-2, 5 = IS1-BTG8-3, 6 = IS3-BTG8-4-1-1

Tabel 4.5 Identifikasi Kandungan Kimia Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara

No.	Kode Fungi	Hasil Skrining Kandungan Kimia		
		Alkaloid	Terpenoid	Fenolat
1	IS2-BTG8-1-1	-	+	-
2	IS2-BTG8-1-2	-	+	-
3	IS2-BTG8-1-3	-	-	+
4	IS1-BTG8-2	-	+	-
5	IS1-BTG8-3	-	+	-
6	IS3-BTG8-4-1-1	-	+	-

Hasil skrining menunjukkan bahwa kelima ekstrak tidak mengandung alkaloid karena tidak menunjukkan noda berwarna jingga. Sementara itu, empat ekstrak (kecuali IS2-BTG8-1-3) setelah disemprot dengan reagen vanilin- H_2SO_4 menunjukkan noda berwarna biru, ungu, hingga ungu kecokelatan, menandakan bahwa ekstrak tersebut mengandung terpenoid (Sulistijowati dan Gunawan, 2001). Terakhir, dengan reagen yang sama yaitu vanilin- H_2SO_4 , ekstrak IS2-BTG8-1-3 menunjukkan noda berwarna merah muda yang menandakan adanya kandungan senyawa fenolat.

Terpenoid merupakan metabolit sekunder penting yang dihasilkan oleh fungi yang berasal dari ekosistem laut (*marine fungi*), termasuk fungi dari ekosistem muara dan mangrove. Bahkan dari beberapa penelitian diketahui bahwa beragam bioaktivitas di antaranya aktivitas sitotoksik, antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, dan inhibitor enzim banyak dihasilkan dari senyawa terpenoid, terutama dari golongan seskuiterpen (Jiang dkk., 2020). Wang dkk. (2018), dalam penelitiannya terhadap fungi endofit *Aspergillus* sp. yang diisolasi dari mangrove *Xylocarpus moluccensis*, menyebutkan bahwa dihasilkan empat senyawa baru seskuiterpen dari jenis *bisabolane* yang terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dengan IC_{50} berkisar antara 31,5 – 41,9 μ M. Selain itu, fungi *Aspergillus sydowii* SW9 yang diisolasi dari air laut juga menunjukkan adanya kandungan senyawa seskuiterpen dari jenis *bisabolane* yang memberikan aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, dan *S. pneumonia* dengan nilai MIC berkisar antara 2,0 – 16 μ g/mL (dengan kloramfenikol sebagai kontrol positif, MIC 1,0 – 2,0 μ g/mL) (Liu dkk., 2019).

Fenolat termasuk senyawa metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam, seringkali dijumpai dengan gugus aromatik mulai dari yang bercincin satu sampai yang membentuk substansi polimer yang sangat kompleks. Di lingkungan laut, fenolat terkadang juga dijumpai dengan struktur yang mengikat halogen (Abad dkk., 2011). Belakangan ini, peran fenolat dalam memberikan aktivitas antibakteri telah banyak diteliti, salah satunya yaitu fenolat yang dihasilkan oleh spons laut *Dysidea granulosa* yang diisolasi dari daerah pantai di sekitar Kepulauan Lakshadweep, Samudera Hindia. Fenolat tersebut terbukti poten dan memberikan aktivitas penghambatan berspektrum luas terhadap bakteri *methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *vancomycin-resistant Enterococci* dan *Bacillus* sp. (Shridhar dkk., 2009). Penelitian lain juga melaporkan bahwa lima senyawa fenolat dari golongan antrakuinon yang dihasilkan oleh fungi *Aspergillus versicolor* dan diisolasi dari spons laut *Petrosia* sp. menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri gram-positif dengan nilai MIC 0,78-6,25 μ g/mL (Lee dkk., 2010).

Berdasarkan penelitian-penelitian yang telah dipaparkan maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibakteri dari keenam ekstrak etil asetat fungi tanah muara disebabkan oleh kandungan senyawa terpenoid dan fenolat yang ada di dalamnya. Sementara itu, terpenoid menjadi senyawa utama yang mendominasi sebagian besar ekstrak dan memberikan aktivitas penghambatan terbesar daripada yang diberikan oleh senyawa fenolat.

4.6 Uji Aktivitas Antibakteri Menggunakan Metode Mikrodilusi

Uji mikrodilusi dilakukan untuk menentukan nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap *P. aeruginosa*. Pada metode ini, digunakan kontrol positif gentamisin sulfat dan kontrol negatif DMSO (CLSI, 2017). Hasil rerata persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara (dengan konsentrasi tunggal 100 µg/mL), gentamisin sulfat, dan DMSO terhadap *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Tabel 4.6.

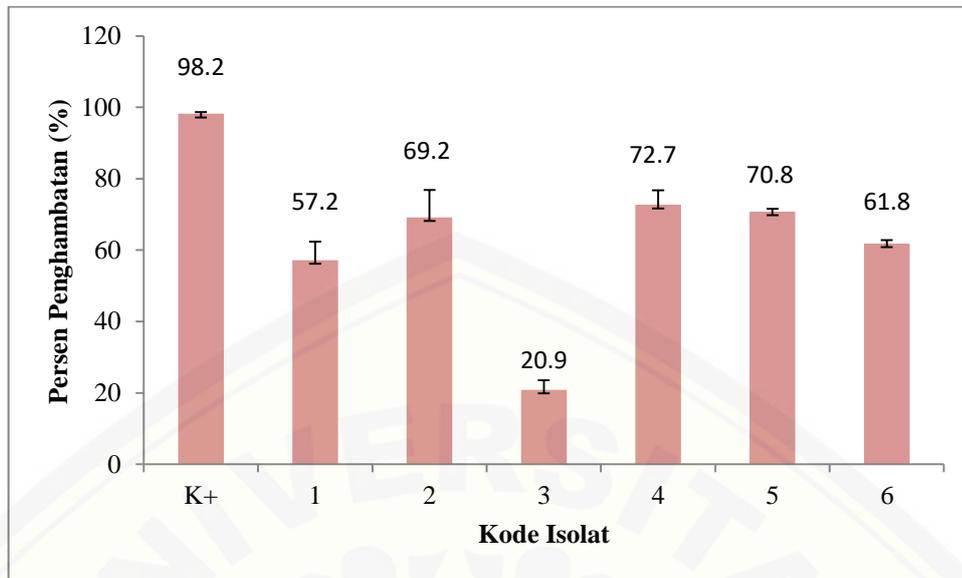
Tabel 4.6 Data Hasil Rerata Persen Penghambatan Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara, Gentamisin, dan DMSO terhadap *P. aeruginosa*.

No.	Kode Fungi	Rerata % Penghambatan Bakteri ± SD	CV
1	IS2-BTG8-1-1	57,2 ± 5,2	9,1
2	IS2-BTG8-1-2	69,2 ± 7,7	11,1
3	IS2-BTG8-1-3	20,9 ± 2,6	12,6
4	IS1-BTG8-2	72,7 ± 4,1	5,6
5	IS1-BTG8-3	70,8 ± 0,8	1,2
6	IS3-BTG8-4-1-1	61,8 ± 1,0	1,7
Kontrol Positif (Gentamisin Sulfat)		98,2 ± 0,5	0,5
Kontrol Negatif (DMSO)		7,5 ± 1,4	19,1

Kontrol positif berfungsi untuk mengetahui apakah metode yang digunakan sudah baik. Syarat metode dikatakan baik yaitu apabila persen penghambatan gentamisin sulfat yang diperoleh selama pengujian $\geq 80\%$ (CLSI, 2017). Berdasarkan Tabel 4.6, persen penghambatan gentamisin sulfat telah memenuhi kriteria yaitu $98,2\% \pm 0,5$ sehingga menunjukkan bahwa metode yang digunakan sudah baik.

DMSO merupakan pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak, baik dari senyawa polar maupun non polar (Rahmi dan Putri, 2020). Penggunaan DMSO sebagai kontrol negatif bertujuan untuk mengetahui apakah aktivitas antibakteri yang dihasilkan oleh ekstrak fungi tidak dipengaruhi oleh DMSO sehingga hasil persen penghambatan tidak positif palsu. Berdasarkan perolehan data, DMSO memiliki aktivitas penghambatan sebesar 7,5%. Hal ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Ansel dkk. (1969), yang menyatakan bahwa DMSO pada konsentrasi 1% dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dengan rerata persen penghambatan yang sama, yaitu sebesar 7,5%. Namun, dalam penelitian ini pengaruh DMSO telah dihilangkan karena telah dijadikan sebagai faktor pengurang terhadap persen penghambatan ekstrak pada proses perhitungan sehingga aktivitas penghambatan atau antibakteri ekstrak murni didapatkan dari ekstrak itu sendiri.

Uji statistik menggunakan *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa data persen penghambatan masing-masing ekstrak berbeda secara signifikan dengan nilai $p = 0,000$. Ekstrak dengan kode isolat IS1-BTG8-2 diketahui memiliki aktivitas penghambatan terbesar terhadap *P. aeruginosa* yaitu $72,7\% \pm 4,1$ dan ekstrak dengan kode isolat IS2-BTG8-1-3 memiliki aktivitas penghambatan terkecil terhadap *P. aeruginosa* yaitu $20,9\% \pm 2,6$ (Tabel 4.6). Grafik 4.1 menggambarkan perbandingan persen penghambatan masing-masing ekstrak dengan kontrol positif gentamisin.



Grafik 4.1 Persen Penghambatan Ekstrak Fungi Tanah Muara dan Gentamisin terhadap *P. aeruginosa* (data dinyatakan dalam rerata, *error bars* berdasarkan nilai *standard deviation* (SD), dan analisis statistik menunjukkan $p = 0,000$); k+ = kontrol positif (gentamisin sulfat), 1 = IS2-BTG8-1-1, 2 = IS2-BTG8-1-2, 3 = IS2-BTG8-1-3, 4 = IS1-BTG8-2, 5 = IS1-BTG8-3, 6 = IS3-BTG8-4-1-1

Nilai persen penghambatan pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$ (*single point*) digunakan sebagai prediksi nilai IC_{50} masing-masing ekstrak uji. Jika persen penghambatan $\geq 50\%$ pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/mL}$, maka diperkirakan IC_{50} berada pada konsentrasi di bawah 100 $\mu\text{g/mL}$ (Cos dkk., 2006). Dengan demikian, ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara yang memiliki aktivitas penghambatan berpotensi untuk dilanjutkan ke proses isolasi senyawa aktif dan dapat dilanjutkan untuk penentuan nilai IC_{50} .

Terdapat ketidaksesuaian antara hasil uji mikrodilusi dengan data diameter zona hambat yang diperoleh sebelumnya. Asumsi bahwa diameter zona hambat yang besar mengindikasikan aktivitas antibakteri lebih poten tidak terbukti dalam penelitian ini. Isolat IS1-BTG8-2 yang memiliki zona hambat lebih kecil dibandingkan dengan IS2-BTG8-1-1 justru menghasilkan persen penghambatan tertinggi. Hal ini dapat terjadi karena beberapa kemungkinan, di antaranya perbedaan konsentrasi atau jenis metabolit sekunder yang dihasilkan. Merujuk pada hasil uji KLT, diketahui kedua ekstrak mengandung senyawa dari golongan terpenoid. Terpenoid sendiri terbagi menjadi enam kelompok besar, dengan tiga di

antaranya banyak dijumpai pada penelitian terkait *marine fungi* dan diketahui memiliki aktivitas antimikroba. Ketiga senyawa tersebut yaitu seskuiterpen, meroterpen, dan diterpen (Jiang dkk., 2020) sehingga ada kemungkinan kedua ekstrak tersebut mengandung jenis terpenoid yang berbeda. Selain itu, banyak-sedikitnya konsentrasi metabolit sekunder yang dihasilkan juga dapat mempengaruhi perbedaan hasil persen penghambatan ekstrak. Sebab lain yang mungkin menjadi faktor penentu besar-kecilnya aktivitas antibakteri adalah adanya kandungan senyawa lain / baru (di luar alkaloid, terpenoid, dan fenolat) yang tidak diketahui, sehingga perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa yang dimaksud.

Pada isolat IS2-BTG8-1-3, persen penghambatan yang diperoleh kecil sejalan dengan uji antagonis dari isolat tersebut yang memberikan diameter zona hambat terkecil. Hal ini bisa jadi disebabkan oleh kandungan senyawa fenolat yang tidak lebih poten dibandingkan senyawa terpenoid dari ekstrak yang lain. Fenolat sejauh ini dikenal sebagai senyawa antioksidan (Wu dkk., 2016; Vitale dkk., 2020). Meskipun beberapa penelitian menyebutkan fenolat memiliki aktivitas antibakteri (Shridhar dkk., 2009; Lee dkk., 2010), namun hingga kini terpenoid diduga sebagai senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri terbesar. Sebuah penelitian mengungkap bahwa terpenoid bersifat bakteriostatik pada sebagian besar bakteri gram-negatif dengan mekanisme merusak integritas membran seluler bakteri sehingga menyebabkan kematian (Guimarães dkk., 2019).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Dari delapan isolat tunggal, diperoleh enam isolat aktif hasil uji antagonis, yaitu IS2-BTG8-1-1, IS2-BTG8-1-2, IS2-BTG8-1-3, IS1-BTG8-2, IS1-BTG8-3, dan IS3-BTG8-4-1-1.
2. Hasil skrining kandungan kimia dari enam isolat fungi tanah muara menunjukkan lima isolat dengan golongan senyawa terpenoid dan satu isolat dengan golongan senyawa fenolat.
3. Nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara dari yang terbesar hingga terkecil adalah IS1-BTG8-2 ($72,7\% \pm 4,1$), IS1-BTG8-3 ($70,8\% \pm 0,8$), IS2-BTG8-1-2 ($69,2\% \pm 7,7$), IS3-BTG8-4-1-1 ($61,8\% \pm 1,0$), IS2-BTG8-1-1 ($57,2\% \pm 5,2$), dan IS2-BTG8-1-3 ($20,9\% \pm 2,6$).

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan, antara lain:

1. Perlu dilakukan determinasi terhadap spesies fungi tanah muara Desa Kema Satu yang memiliki aktivitas antibakteri.
2. Perlu dilakukan isolasi kandungan kimia dari isolat fungi tanah muara yang memiliki aktivitas antibakteri dan penelitian lebih lanjut terkait kandungan senyawa kimia yang lain yang mungkin mendasari aktivitas ini.
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan IC_{50} dari isolat fungi tanah muara Desa Kema Satu terhadap isolat IS2-BTG8-1-1, IS2-BTG8-1-2, IS2-BTG8-1-3, IS1-BTG8-2, IS1-BTG8-3, dan IS3-BTG8-4-1-1.

DAFTAR PUSTAKA

- Abad, M. J., L. M. Bedoya, dan P. Bermejo. 2011. *Marine Compounds and Their Antimicrobial Activities*. Dalam *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current and Technological Advances*. Editor A. Medez-Vilas. Badajoz: Formatex Research Center, cop.
- Acker, H. Van dan T. Coenye. 2016. The role of efflux and physiological adaptation in biofilm tolerance and. *The Journal of Biological Chemistry*. 291(24):12565–12572.
- Alappatt, J. P. 2018. *Structure and Species Diversity of Mangrove Ecosystem*. London: Elsevier Inc. *Biodiversity and Climate Change Adaptation in Tropical Islands*.
- Ali, S. R. M., A. J. Fradi, dan A. M. Al-aaraji. 2016. Comparison between different cultural medium on. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 5(8):9–16.
- Ambarwati, N. S. S., B. Elya, A. N. Sa'adah, N. Puspitasari, A. Malik, dan M. Hanafi. 2018. Activity of fractions from *garcinia latissima* miq. leaves ethyl acetate extract as antibacterial against *bacillus subtilis* and antioxidant. *Advanced Science Letters*. 24(9):6366–6370.
- Aminov, R. I., M. Otto, dan A. Sommer. 2010. A brief history of the antibiotic era : lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*. 1(December):1–7.
- Ansel, H. C., W. P. Norred, dan I. L. Roth. 1969. Antimicrobial activity of dimethyl sulfoxide against *escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, and *bacillus megaterium*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 58(7):836–839.
- Arzanlou, M., W. C. Chai, dan H. Venter. 2017. Intrinsic , adaptive and acquired antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Essays in Biochemistry*. 61:49–60.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*.

6(2):71–79.

Barbier, F., A. Andremont, M. Wolff, dan L. Bouadma. 2013. Hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: recent advances in epidemiology and management. *Curr Opin Pulm Med*. 19(3):216–228.

Barka, E. A., P. Vatsa, L. Sanchez, N. Gaveau-vaillant, C. Jacquard, H. Klenk, C. Clément, Y. Ouhdouch, dan P. Van Wezel. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria. *American Society for Microbiology*. 80(1):1–44.

Barragán, L. A. P., J. J. B. Figueroa, C. N. A. González, dan C. Hennigs. 2016. *Fermentative Production Methods*. Dalam *Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products: The Food, Feed, Fibre, Fuel (4F) Economy*. Editor P. Poltronieri dan O. F. D'Urso. Elsevier Inc.

Barton, L. L. dan D. E. Northup. 2011. *Microbial Ecology*. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, A John Wiley & Sons, Inc. Publication.

Bassetti, M., A. Vena, A. Croxatto, E. Righi, dan B. Guery. 2018. How to manage pseudomonas aeruginosa infections risk factors for antimicrobial resistance in P. aeruginosa. *Drug in Context*. 7(212527):1–18.

Basu, S., C. Bose, N. Ojha, N. Das, J. Das, M. Pal, dan S. Khurana. 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 11(4):182.

Behera, S. S., R. C. Ray, U. Das, S. K. Panda, dan P. Saranraj. 2019. *Microorganisms in Fermentation*. Dalam *Essentials in Fermentation Technology*. Editor A. Berenjian. Springer, Cham.

Berk, Z. 2013. *Food Process Engineering and Technology*. Edisi 2. London: Academic Press.

Berk, Z. 2018. *Food Process Engineering and Technology*. Edisi 3. London: Academic Press.

Bills, G. F. dan J. B. Gloer. 2016. Biologically active secondary metabolites from the fungi. *Microbiology Spectrum*. 4(6):1–32.

- Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Rev. Microbiol.* 13:42–51.
- Boyce, K. J. dan A. Andrianopoulos. 2015. Fungal dimorphism: the switch from hyphae to yeast is a specialized morphogenetic adaptation allowing colonization of a host. *FEMS Microbiology Reviews.* 39(6):797–811.
- Brackman, G. dan T. Coenye. 2015. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current Pharmaceutical Design.* 21:5–11.
- Cairns, T. C., X. Zheng, P. Zheng, J. Sun, dan V. Meyer. 2019. Moulding the mould: understanding and reprogramming filamentous fungal growth and morphogenesis for next generation cell factories. *Biotechnology for Biofuels.* 12(77):1–18.
- CDC. 2013. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013.* Atlanta: Departement of Health and Human Services; CDC.
- CDC. 2019. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.* Atlanta: Departement of Health and Human Services; CDC.
- Cheesman, M. J., A. Ilanko, B. Blonk, dan I. E. Cock. 2017. Developing new antimicrobial therapies: are synergistic combinations of plant extracts/compounds with conventional antibiotics the solution? *Pharmacogn. Rev.* 11(22):57–72.
- CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition.* 2.
- CLSI. 2017. *Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing.* Edisi 27th. Wayne: CLSI supplement M100-S20.
- Cos, P., A. J. Vlietinck, D. Vanden Berghe, dan L. Maes. 2006. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. *Journal of Ethnopharmacology.* 106(3):290–302.
- Davies, J. dan D. Davies. 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(3):417–433.

- Dolatabadi, S., G. S. de Hoog, J. F. Meis, dan G. Walther. 2014. Species boundaries and nomenclature of *rhizopus arrhizus* (syn. r. *oryzae*). *Mycoses*. 57(s3):108–127.
- Fernández, L., E. B. M. Breidenstein, dan R. E. W. Hancock. 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*. 14:1–21.
- Fierer, N. 2017. Embracing the unknown: disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 15(10):579–590.
- Gelpi, A., A. Gilbertson, dan J. D. Tucker. 2016. NIH public access. *Sex Transm Infect*. 91(1):68–69.
- Gow, N. A. R., F. L. Van De Veerdonk, A. J. P. Brown, dan M. G. Netea. 2012. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*. 10(2):112–122.
- Guimarães, A. C., L. M. Meireles, M. F. Lemos, M. C. C. Guimarães, D. C. Endringer, M. Fronza, dan R. Scherer. 2019. Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*. 24(13):1–12.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. Edisi 2. Bandung: Penerbit ITB.
- Harborne, J. B. 2006. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB.
- HiMedia Technical Data. 2019. Potato Dextrose Agar w / Chloramphenicol M1941
- Hodges, N. A. 2004. *Pharmaceutical Microbiology*. Edisi 7th ed. USA: Blackwell Science Ltd.
- Hutchings, M., A. Truman, dan B. Wilkinson. 2019. ScienceDirect antibiotics : past , present and future. *Current Opinion in Microbiology*. 51:72–80.

- Ibrahim, D., H. Weloosamy, dan S.-H. Lim. 2015. Effect of agitation speed on the morphology of aspergillus niger hfd5a-1 hyphae and its pectinase production in submerged fermentation. *World Journal of Biological Chemistry*. 6(3):265–271.
- ITIS. 2012. *ITIS Standard Report Page: Pseudomonas aeruginosa*. https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=965278#null. [Diakses pada Januari 27, 2021].
- Jain, P. dan R. K. Pundir. 2011. Effect of fermentation medium, ph and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. *Journal of Agricultural Technology*. 7(2):247–269.
- Jakubczyk, D. dan F. Dussart. 2020. Selected fungal natural products with antimicrobial properties. *Molecules*. 25(911):1–18.
- Jia, S., Zhe Chi, G. Liu, Z. Hu, dan Zhen-ming Chi. 2020. Critical reviews in biotechnology fungi in mangrove ecosystems and their potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 40(6):852–864.
- Jiang, M., Z. Wu, H. Guo, L. Liu, dan S. Chen. 2020. A review of terpenes from marine-derived fungi: 2015-2019. *Marine Drugs*. 18(6):1–48.
- Katz, L. dan R. H. Baltz. 2016. Natural product discovery : past , present , and future. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*
- Kementrian Kesehatan RI. 2011. *Pedoman Pelayanan Kefarmasian Untuk Terapi Antibiotik*. Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
- Law, J. D. dan T. A. Todd. 2008. *Liquid-Liquid Extraction Equipment*. United States: Idaho National Laboratory.
- Lee, J., Y. K. Park, E. S. Chung, I. Y. Na, dan K. S. Ko. 2016. Evolved resistance to colistin and its loss due to genetic reversion in pseudomonas aeruginosa. *Nature Publishing Group*. (April):1–12.
- Lee, Y. M., H. Li, J. Hong, H. Y. Cho, K. S. Bae, M. A. Kim, D. K. Kim, dan J. H. Jung. 2010. Bioactive metabolites from the sponge-derived fungus aspergillus versicolor. *Archives of Pharmacal Research*. 33(2):231–235.

Lewis, K. 2010. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 64:357–372.

Liao, S., Y. Wang, H. Liu, G. Fan, S. K. Sahu, T. Jin, J. Chen, P. Zhang, L. Gram, M. L. Strube, Q. Shi, S. Ming, Y. Lee, dan X. Liub. 2020. Deciphering the microbial taxonomy and functionality of two diverse mangrove ecosystems and their potential abilities to produce bioactive compounds. 5(5):1–19.

Liu, Y. J., J. L. Zhang, C. Li, X. G. Mu, X. L. Liu, L. Wang, Y. C. Zhao, P. Zhang, X. D. Li, dan X. X. Zhang. 2019. Antimicrobial secondary metabolites from the seawater-derived fungus *aspergillus sydowii* sw9. *Molecules.* 24(4596):1–8.

Lobanovska, M. dan G. Pilla. 2017. Penicillin ' s discovery and antibiotic resistance : lessons for the future ? *Yale Journal of Biology and Medicine.* 90:135–145.

Lourencetti, N. M. S., F. D. Úbere, M. P. F. Lacerda, M. J. S. Mendes-Giannini, C. F. Zanelli, A. M. Fusco-Almeida, dan E. A. de L. Gattás. 2017. *Phenotypic Characterization of Yeasts Aiming at Bioethanol Production.* Dalam *Yeast - Industrial Applications.* Editor A. Morata dan I. Loira. InTech.

Madigan, Michael T., David, P., Clarck, David S., John, M. Martinko. 2011. *Brock Microbiology of microorganisms.* San Francisco: Benjamin Cummings Publishing.

Malek, N. A., Z. Zainuddin, A. J. K. Chowdury, dan Z. A. Z. Abidin. 2015. Diversity and antimicrobial activity of mangrove soil actinomycetes isolated from tanjung lumpur, kuantan. *Jurnal Teknologi.* 77(25):37–43.

Mascarin, G. M., S. B. Alves, dan R. B. Lopes. 2010. Culture media selection for mass production of *isaria fumosorosea* and *isaria farinosa*. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 53(4):753–761.

McGinnis, M. R. dan S. K. Tyring. 1996. Introduction to Mycology . <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8125/> [Diakses pada June 12, 2021].

Mohamed, D. J. dan J. B. H. Martiny. 2011. Patterns of fungal diversity and

composition along a salinity gradient. *ISME Journal*. 5(3):379–388.

Moradali, M. F., S. Ghods, dan B. H. A. Rehm. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle : a paradigm for adaptation , survival , and persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 7(February):1–29.

Moran, J. C., E. L. Crank, H. A. Ghabban, dan M. J. Horsburgh. 2016. Deferred growth inhibition assay to quantify the effect of bacteria-derived antimicrobials on competition. *Journal of Visualized Experiments*. (115):1–5.

Mosić, M., A. Dramićanin, P. Ristivojević, dan D. Milojković-Opsenica. 2021. Extraction as a critical step in phytochemical analysis. *Journal of AOAC International*. 103(2):365–372.

Najafpour, G. D. 2007. *Production of Antibiotics*. Elsevier B.V. *Biochemical Engineering and Biotechnology*.

Navarro Llorens, J. M., A. Tormo, dan E. Martínez-García. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(4):476–495.

Newbound, M., M. A. Mccarthy, dan T. Lebel. 2010. Fungi and the urban environment : a review landscape and urban planning fungi and the urban environment : a review. *Landscape and Urban Planning*. 96(3):138–145.

Newman, D. J. dan G. M. Cragg. 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*. 79:629–661.

O'Neill, J. 2014. Antimicrobial resistance : tackling a crisis for the health and wealth of nations. *The Review on Antimicrobial Resistance*. (December)

Pang, Z., R. Raudonis, B. R. Glick, T. Lin, dan Z. Cheng. 2018. Antibiotic resistance in *pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. 37(1):177–192.

Pathan, E. K., V. Ghormade, R. Panmei, dan M. V. Deshpande. 2019a. *Biochemical and Molecular Aspects of Dimorphism in Fungi*. Dalam *Advancing Frontiers in Mycology and Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi*. Editor T. Satyanarayana, S. K. Deshmukh, dan M. V.

Deshpande. Singapore: Springer Nature Singapore Pte Ltd.

Pathan, E. K., V. Ghormade, R. Panmei, dan M. V. Deshpande. 2019b. *Biochemical and Molecular Aspects of Dimorphism in Fungi*. Dalam *Advancing Frontiers in Mycology and Mycotechnology: Basic and Applied Aspects of Fungi*. Editor T. Satyanarayana, S. K. Deshmukh, dan M. V. Deshpande. Singapore: Springer.

Paul, E. A. 2015. *Soil Microbiology , Ecology , and Biochemistry*. Edisi Fourth Edi. USA: Academic Press.

Peláez F. 2005. Biological activities of fungal metabolites. In An Z (ed), *Handbook of Industrial Mycology*. New York: Marcel Dekker. p 49–92.

Pelczar, Michael J. dan Chan, E. C. S. 2008. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I*. Jakarta: UI Press.

Peterson, E. dan P. Kaur. 2018. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria : relationships between resistance determinants of antibiotic producers , environmental bacteria , and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*. 9(November):1–21.

Phale, S. 2018. Yeast: characteristics and economic significance. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 8(5):8–10.

Prestinaci, F., P. Pezzotti, dan A. Pantosti. 2016. Antimicrobial resistance : a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*. 109(7):309–318.

Rahmi, M. dan D. H. Putri. 2020. Aktivitas antimikroba dms0 sebagai pelarut ekstrak alami. *Serambi Biologi*. 5(2):56–58.

Reis, V. R., A. P. G. Bassi, J. C. G. da Silva, dan S. R. Ceccato-Antonini. 2013. Characteristics of *saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(4):1121–1131.

Sabdaningsih, A., O. Cristianawati, M. T. Sibero, H. Nuryadi, O. K. Radjasa, A. Sabdono, dan A. Trianto. 2016. Screening antibacterial agent from crude

extract of marine-derived fungi associated with soft corals against mdr-staphylococcus haemolyticus. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 55(2017):1–8.

Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman, dan A. S. Prince. 2005. Pathogen – host interactions in pseudomonas aeruginosa pneumonia respiratory infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 171:1209–1223.

Sashidaran, S., Y. Chen, D. Saravanan, K. M. Sundram, dan L. Y. Latha. 2011. Extraction, isolation, and characterization of bioactive compounds from plant's extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 8(1):1–10.

Savitri, G. R., B. Triatmoko, dan A. S. Nugraha. 2020. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi tumbuhan anyang-anyang (elaecarpus grandiflorus j. e. smith.) terhadap escherichia coli. *JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 5(1):22.

Senba, M. dan K. Watanabe. 2015. Possibility of novel therapeutic strategy for multidrug resistant pseudomonas aeruginosa using bactericidal activity in streptococcus sanguinis secretion. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current and Technological Advances A. Medez-Vilas (Ed.)*. (May):706–713.

Serna-chavez, H. M., N. Fierer, dan P. M. Van Bodegom. 2013. Global drivers and patterns of microbial abundance in soil. *Global Ecol. Biogeogr*. 22:1162–1172.

Shridhar, D. M. P., G. B. Mahajan, V. P. Kamat, C. G. Naik, R. R. Parab, N. R. Thakur, dan P. D. Mishra. 2009. Antibacterial activity of 2-(2',4'-dibromophenoxy)-4,6- dibromophenol from dysidea granulosa. *Marine Drugs*. 7(3):464–471.

Silambarasan, S., E. Praveen kumar, T. Murugan, D. Saravanan, dan R. Balagurunathan. 2012. Antibacterial and antifungal activities of actinobacteria isolated from rathnagiri hills. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(10):099–103.

Singhania, R. R., A. K. Patel, L. Thomas, M. Goswami, B. S. Giri, dan A. Pandey. 2015. *Industrial Enzymes*. Dalam Industrial Biorefineries and White Biotechnology. Editor A. Pandey, R. Hofer, M. Taherzadeh, M.

Nampoothiri, dan C. Larroche. Elsevier.

Subramaniam, R. dan R. Vimala. 2012. Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances : a comparative study. 3(3):480–486.

Sulistijowati, A. dan D. Gunawan. 2001. Efek ekstrak daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) terhadap *Candida albicans* serta profil kromatografinya. *Cermin Dunia Kedokteran*. 130:32-36.

Tacconelli, E., E. Carrara, A. Savoldi, S. Harbarth, M. Mendelson, D. L. Monnet, dan C. Pulcini. 2017. Articles discovery , research , and development of new antibiotics : the who priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. 3099(17):1–10.

Tamber, S. dan R. E. W. Hancock. 2003. On the mechanism of solute uptake in pseudomonas. *Frontiers in BBoscience*. 8:472–483.

Tarman, K., D. Safitri, dan I. Setyaningsih. 2013. Endophytic fungi isolated from rhizophora mucronata and their antibacterial activity. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 8(2):69.

Taylor, P. K., A. T. Y. Yeung, dan R. E. W. Hancock. 2014. Antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa biofilms : towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*. 191:121–130.

Tedersoo, L., M. Bahram, S. Põlme, U. Kõljalg, N. S. Yorou, R. Wijesundera, L. V. Ruiz, A. M. Vasco-palacios, P. Q. Thu, A. Suija, M. E. Smith, C. Sharp, E. Saluveer, A. Saitta, M. Rosas, T. Riit, D. Ratkowsky, K. Pritsch, K. Põldmaa, E. Otsing, E. Nouhra, A. L. Njouonkou, R. H. Nilsson, L. N. Morgado, J. Mayor, T. W. May, L. Majuakim, D. J. Lodge, S. S. Lee, K. Larsson, P. Kohout, K. Hosaka, I. Hiiesalu, T. W. Henkel, H. Harend, L. Guo, A. Greslebin, G. Grelet, J. Geml, G. Gates, W. Dunstan, C. Dunk, R. Drenkhan, J. Dearnaley, A. De Kesel, T. Dang, X. Chen, F. Buegger, dan F. Q. Brearley. 2014. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. 346(6213):1256688-1–10.

Thatoi, H., B. C. Behera, dan R. R. Mishra. 2013. Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: a review. *Mycology*. 4(1):54–71.

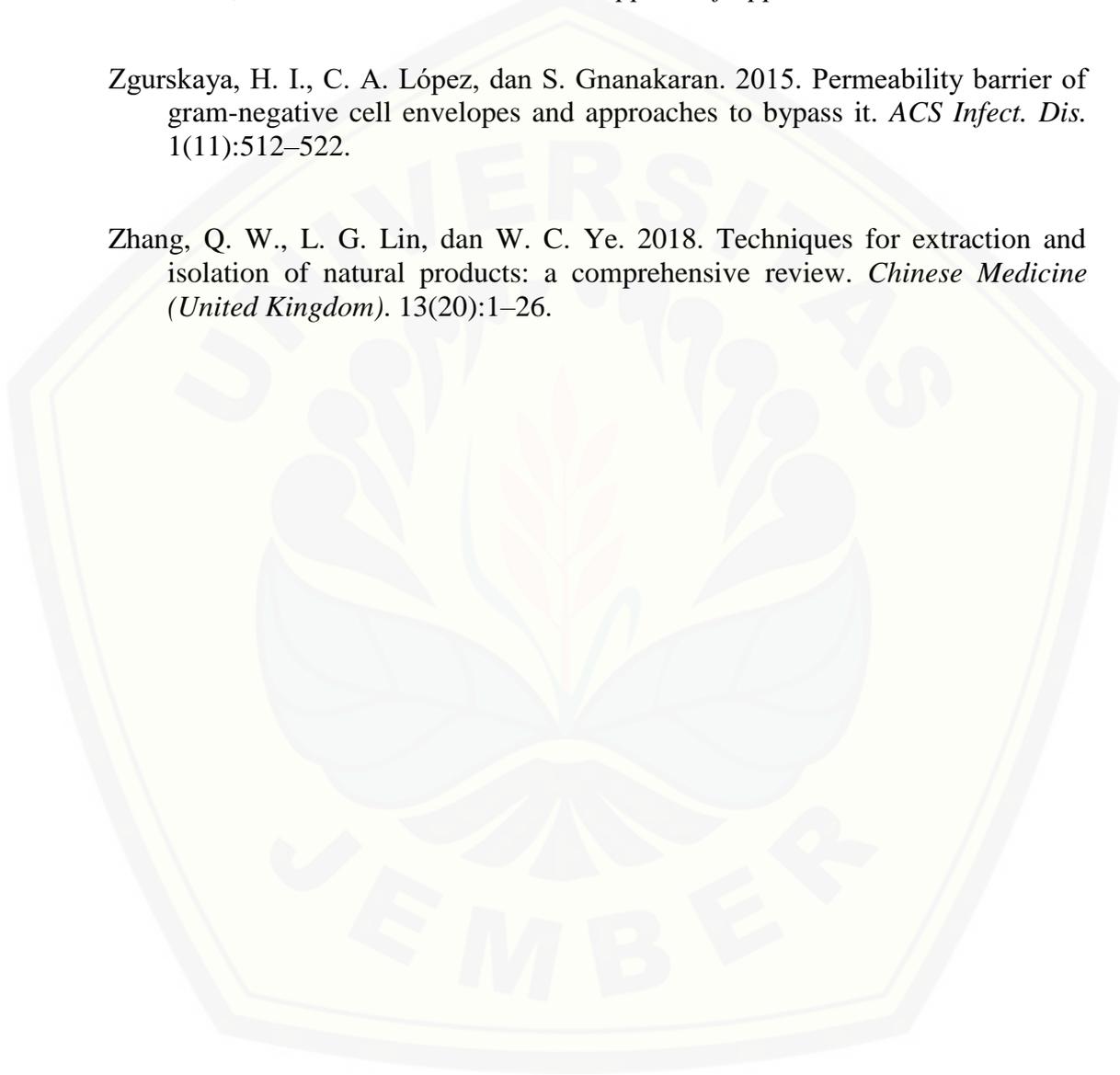
- Utama, C. S. dan C. Hanim. 2017. Isolation and identification of fungi type from juice of cabbage waste as probiotic agency. *The 7th International on Tropical Animal Production*. 324–328.
- Venter, H., Mowla, R., Ohene-Agyei, T. and Ma, S. 2015. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition. *Front. Microbiol.* 6:377.
- Vitale, G. A., D. Coppola, F. P. Esposito, C. Buonocore, J. Ausuri, E. Tortorella, dan D. de Pascale. 2020. Antioxidant molecules from marine fungi: methodologies and perspectives. *Antioxidants*. 9(12):1–36.
- Wagner, H. dan S. Blatt. 2001. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer International Publishing.
- Wakeel, A., S. A. Jan, I. Ullah, Z. K. Shinwari, dan M. Xu. 2019. Solvent polarity mediates phytochemical yield and antioxidant capacity of *isatis tinctoria*. *PeerJ*. 7(e7857):1–19.
- Waksman, S. A., A. Schatz, dan D. M. Reynolds. 2010. Production of antibiotic substances by actinomycetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1213:112–124.
- Walsh, C. 2003. *Antibiotics : Actions, Origins, Resistance*. Washington, DC: ASM Press.
- Wang, P., J. H. Yu, K. Zhu, Y. Wang, Z. Q. Cheng, C. S. Jiang, J. G. Dai, J. Wu, dan H. Zhang. 2018. Phenolic bisabolane sesquiterpenoids from a thai mangrove endophytic fungus, *Aspergillus* sp. xy02. *Fitoterapia*. 127(January):322–327.
- WHO. 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Wohlleben, W., Y. Mast, E. Stegmann, dan N. Ziemert. 2016. Antibiotic drug discovery. *Microbial Biotechnology*. 9(5):541–548.
- Wongjirathiti, A. dan S. Yottakot. 2017. Utilisation of local crops as alternative media for fungal growth. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*. 40(2):295–304.

Wu, Z., Y. Wang, D. Liu, P. Proksch, S. Yu, dan W. Lin. 2016. Antioxidative phenolic compounds from a marine-derived fungus *aspergillus versicolor*. *Tetrahedron*. 72(1):50–57.

Yang, Y. dan M. Sha. 2019. Beginner's guide to bioprocess modes-batch, fed-batch, and continuous fermentation. *Eppendorf Appl Note*. 408.

Zgurskaya, H. I., C. A. López, dan S. Gnanakaran. 2015. Permeability barrier of gram-negative cell envelopes and approaches to bypass it. *ACS Infect. Dis*. 1(11):512–522.

Zhang, Q. W., L. G. Lin, dan W. C. Ye. 2018. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*. 13(20):1–26.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Media

1. Pembuatan Media PDA dan PDAC

Jika dalam kemasan, 39 g media PDA atau PDAC dibutuhkan untuk 1000 mL aquades, maka untuk membuat media PDA dan PDAC dalam 250 mL pelarut air laut dibutuhkan:

$$\frac{39 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{250 \text{ mL}}$$

$$9,75 \text{ g} = x$$

Jadi, berat media PDA dan PDAC yang harus ditimbang sebanyak 9,75 g.

2. Pembuatan Media PDB

Jika dalam kemasan, 24 g media PDB dibutuhkan untuk 1000 mL aquades, maka untuk membuat media PDB dalam 200 mL aqua demineralisata dibutuhkan:

$$\frac{24 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{200 \text{ mL}}$$

$$4,8 \text{ g} = x$$

Jadi, berat media PDB yang harus ditimbang sebanyak 4,8 g.

3. Pembuatan Media MHA

Jika dalam kemasan, 34 g media MHA dibutuhkan untuk 1000 mL aquades, maka untuk membuat media MHA dalam 250 mL aquademineralisata dibutuhkan:

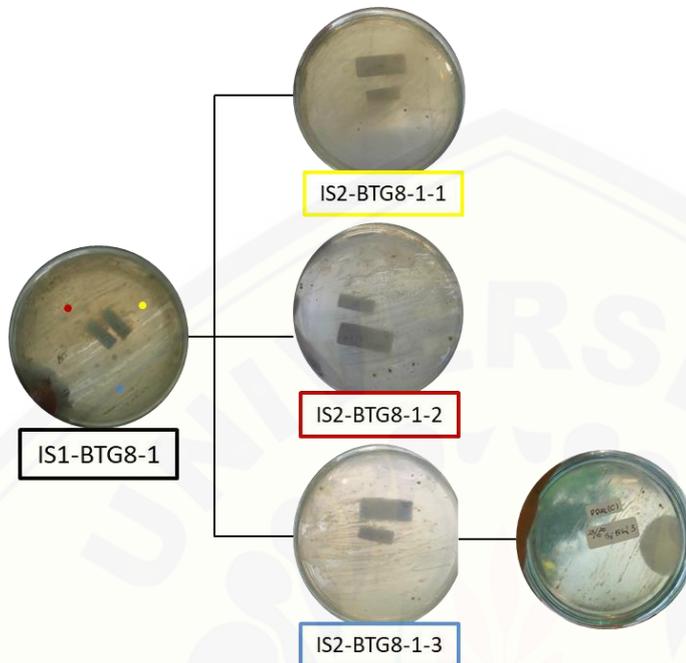
$$\frac{34 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{250 \text{ mL}}$$

$$8,5 \text{ g} = x$$

Jadi, berat media MHA yang harus ditimbang sebanyak 8,5 g.

Lampiran 2. Skema Isolasi Fungi Tanah Muara

1. Isolasi biakan IS1-BTG8-1

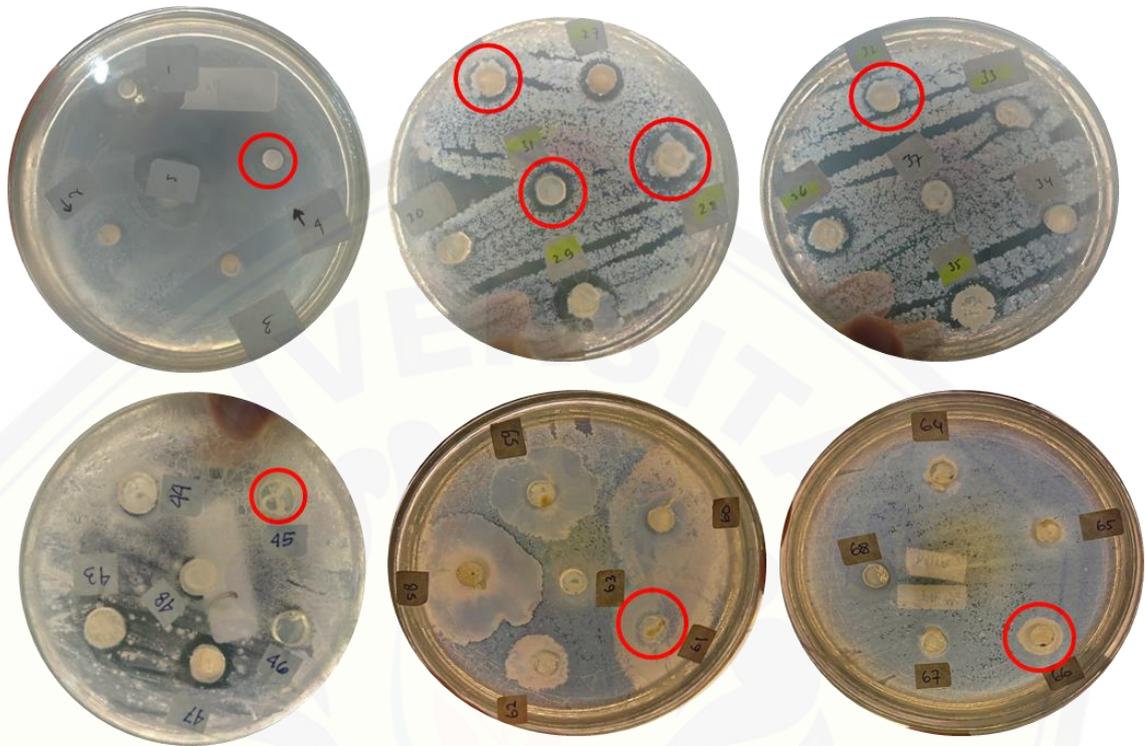


Isolat IS2-BTG-8-1-3 menunjukkan adanya pertumbuhan koloni yang berbeda, sehingga perlu dipisahkan lagi, namun bentuk kapang yang dipakai untuk skrining awal aktivitas antibakteri.

2. Isolasi Biakan IS1-BTG8-4



Lampiran 3. Hasil Uji Antagonis Isolat Fungi Tanah Muara terhadap *P. aeruginosa*



Keterangan:

- 4 : IS2-BTG8-1-3
- 26 : IS2-BTG8-1-2
- 28 : IS2-BTG8-1-1
- 31 : IS1-BTG8-3
- 32 : IS1-BTG8-2
- 45 : IS2-BTG8-4-2
- 61 : IS3-BTG8-4-1-1
- 66 : IS3-BTG8-4-1-2

Lampiran 4. Perhitungan Bobot dan % Rendemen Ekstrak Fungi Tanah Muara

1. Ekstrak IS2-BTG8-1-1

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 11,3831 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 11,197 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,1861 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,1861 \text{ gram}}{185 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,100 \%
 \end{aligned}$$

2. Ekstrak IS2-BTG8-1-2

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 10,3944 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 10,345 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,0494 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0494 \text{ gram}}{191 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,026 \%
 \end{aligned}$$

3. Ekstrak IS2-BTG8-1-3

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 11,119 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 11,0716 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,0474 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,0474 \text{ gram}}{199 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,0238 \%
 \end{aligned}$$

4. Ekstrak IS1-BTG8-2

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 10,381 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 10,229 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,152 \text{ gram}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,152 \text{ gram}}{187 \text{ ml}} \times 100\% \\ &= 0,081 \%\end{aligned}$$

5. Ekstrak IS1-BTG8-3

$$\begin{aligned}\text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 10,481 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah} &= 10,342 \text{ gram} \\ \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,139 \text{ gram} \\ \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,139 \text{ gram}}{179 \text{ ml}} \times 100\% \\ &= 0,0776 \%\end{aligned}$$

6. Ekstrak IS3-BTG8-4-1-1

$$\begin{aligned}\text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 10,2224 \text{ gram} \\ \text{Berat wadah} &= 10,1736 \text{ gram} \\ \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,0488 \text{ gram} \\ \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\ &= \frac{0,0488 \text{ gram}}{183 \text{ ml}} \times 100\% \\ &= 0,0267 \%\end{aligned}$$

Lampiran 5. Pembuatan Media CAMHB

1. Pembuatan Media MHB

Jika dalam kemasan, 21 g media MHB dibutuhkan untuk 1000 mL aquades, maka untuk membuat media MHB dalam 200 mL aquademineralisata dibutuhkan:

$$\frac{21 \text{ g}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{200 \text{ mL}}$$

$$4,2 \text{ g} = x$$

Jadi, berat media MHB yang harus ditimbang sebanyak 4,2 g.

2. Pembuatan Larutan Induk MgCl₂

$$\text{Bahan} = \text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ (BM=203,3027 g/mol)}$$

$$\text{BM MgCl}_2 = 95,211 \text{ g/mol}$$

$$\text{BM Mg}^{2+} = 24,305 \text{ g/mol}$$

Dibutuhkan larutan induk MgCl₂ dengan konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL

$$\text{Jumlah MgCl}_2 \text{ yang dibutuhkan} = \frac{\text{BM MgCl}_2}{\text{BM Mg}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL}$$

$$= \frac{95,211 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL}$$

$$= 39,123 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Jumlah MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} = \frac{\text{BM MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{\text{BM MgCl}_2} \times 39,123 \text{ mg/mL}$$

$$= \frac{203,3027 \text{ g/mol}}{95,211 \text{ g/mol}} \times 39,123 \text{ mg/mL}$$

$$= 83,539 \text{ mg/mL}$$

Larutan induk MgCl₂ dibuat dengan menimbang 835,39 mg MgCl₂·6H₂O dan dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralisata.

3. Pembuatan Larutan Induk CaCl₂

$$\text{Bahan} = \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ (BM = 147,01g/mol)}$$

$$\text{BM CaCl}_2 = 110,98 \text{ g/mol}$$

$$\text{BM Ca}^{2+} = 40,078 \text{ g/mol}$$

Dibutuhkan larutan induk CaCl₂ dengan konsentrasi 10 mg Ca²⁺/mL

$$\text{Jumlah CaCl}_2 \text{ yang dibutuhkan} = \frac{\text{BM CaCl}_2}{\text{BM Ca}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL}$$

$$= \frac{110,98 \text{ g/mol}}{40,078 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/mL}$$

$$= 27,691 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Jumlah CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} = \frac{\text{BM CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{BM CaCl}_2} \times 27,691 \text{ mg/mL}$$

$$= \frac{147,01 \text{ g/mol}}{110,98 \text{ g/mol}} \times 27,691 \text{ mg/mL}$$

$$= 36,681 \text{ mg/mL}$$

Larutan induk CaCl_2 dibuat dengan menimbang 366,81 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dan dilarutkan dalam 10 mL aqua demineralisata.

4. Perhitungan MgCl_2 yang ditambahkan ke dalam media MHB

Konsentrasi yang dibutuhkan dalam media MHB yaitu 11,25 mg Mg^{2+}/L .

Kation Mg^{2+} ditambahkan dari larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL . Media yang digunakan yaitu sebanyak 200 mL, maka dibutuhkan Mg^{2+} sebanyak :

$$\frac{200 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 11,25 \text{ mg Mg}^{2+} = 2,25 \text{ mg Mg}^{2+}$$

Jumlah larutan induk MgCl_2 yang ditambahkan :

$$\frac{2,25 \text{ mg Mg}^{2+}}{10 \text{ mg Mg}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,225 \text{ mL}$$

Media MHB 200 mL ditambahkan larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL sebanyak 0,225 mL.

5. Perhitungan CaCl_2 yang ditambahkan ke dalam media MHB

Konsentrasi yang dibutuhkan dalam media MHB yaitu 22,5 mg Ca^{2+}/L .

Kation Ca^{2+} ditambahkan dari larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Ca^{2+}/mL . Media yang digunakan yaitu sebanyak 200 mL, maka dibutuhkan Ca^{2+} sebanyak :

$$\frac{200 \text{ mL}}{1000 \text{ mL}} \times 22,5 \text{ mg Ca}^{2+} = 4,5 \text{ mg Ca}^{2+}$$

Jumlah larutan induk CaCl_2 yang ditambahkan :

$$\frac{4,5 \text{ mg Ca}^{2+}}{10 \text{ mg Ca}^{2+}} \times 1 \text{ mL} = 0,450 \text{ mL}$$

Media MHB 200 mL ditambahkan larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Ca^{2+} /mL sebanyak 0,450 mL.



Lampiran 6. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin (Kontrol Positif)**1. Pembuatan Larutan Induk Gentamisin**

Bahan = larutan injeksi gentamisin sulfat konsentrasi 40 mg/mL

BM gentamisin sulfat = 575,675 g/mol

BM gentamisin = 477,596 g/mol

$$\begin{aligned}\text{Konsentrasi gentamisin} &= \frac{\text{BM gentamisin}}{\text{BM gentamisin sulfat}} \times 40 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{477,596 \text{ g/mol}}{575,675 \text{ g/mol}} \times 40 \text{ mg/mL} \\ &= 33,185 \text{ mg/mL} \\ &= 33185 \text{ }\mu\text{g/mL}\end{aligned}$$

Konsentrasi larutan induk gentamisin yang dibutuhkan yaitu 100 $\mu\text{g/mL}$:

$$\frac{\text{volume yang diambil dari gentamisin sulfat}}{10000 \text{ }\mu\text{L media CAMHB}} \times 33185 \text{ }\mu\text{g/mL} = 100 \text{ }\mu\text{g/mL}$$

Volume yang dipipet dari larutan gentamisin sulfat = 30,1 μL ad media CAMHB 10000 μL sehingga konsentrasi larutan induk gentamisin 100 $\mu\text{g/mL}$.

2. Pengenceran Larutan Induk Gentamisin

Konsentrasi gentamisin yang dibutuhkan untuk uji aktivitas antibakteri yaitu 1 $\mu\text{g/mL}$:

$$\frac{\text{volume yang diambil dari larutan induk}}{10000 \text{ }\mu\text{L media CAMHB}} \times 100 \text{ }\mu\text{g/mL} = 1 \text{ }\mu\text{g/mL}$$

Volume yang dipipet dari larutan induk gentamisin = 100 μL ad media CAMHB 10000 μL sehingga konsentrasi gentamisin untuk kontrol positif 1 $\mu\text{g/mL}$.

Lampiran 7. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara

Berikut ini hasil penimbangan ekstrak etil asetat fungi tanah muara untuk uji mikrodilusi (konsentrasi tunggal 100 $\mu\text{g/mL}$).

Kode Fungi	Hasil Penimbangan Ekstrak (mg)	DMSO 100% yang Ditambahkan (μL)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
IS2-BTG8-1-1	1,055	105,5	1000
IS2-BTG8-1-2	1,077	107,7	1000
IS2-BTG8-1-3	1,003	100,3	1000
IS1-BTG8-2	1,038	103,8	1000
IS1-BTG8-3	1,074	107,4	1000
IS3-BTG8-4-1-1	1,017	101,7	1000

Ekstrak yang didapat diencerkan 100x dalam media CAMHB sehingga konsentrasi akhir DMSO dalam larutan ekstrak menjadi 1% dan konsentrasi ekstrak menjadi 100 $\mu\text{g/mL}$ seperti yang tercantum pada tabel berikut.

Kode Fungi	Jumlah yang Dipipet (μL)	Media CAMHB yang Ditambahkan (μL)	Konsentrasi Akhir Ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)
IS2-BTG8-1-1	50	4950	100
IS2-BTG8-1-2	50	4950	100
IS2-BTG8-1-3	50	4950	100
IS1-BTG8-2	50	4950	100
IS1-BTG8-3	50	4950	100
IS3-BTG8-4-1-1	50	4950	100

Lampiran 8. Data Hasil Absorbansi dan Persentase Penghambatan**1. Data Hasil Absorbansi dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri untuk Gentamisin**

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan (%)	Rerata Penghambatan (%) \pm SD	CV
	Uji	Kontrol Uji	Rerata Kontrol Negatif	Rerata Kontrol Media			
1	0.095	0.091	0.419	0.098	98.8	98.2 \pm 0.5	0.5
	0.097	0.091			98.1		
	0.098	0.091			97.8		

2. Data Hasil Absorbansi dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri untuk DMSO 1%

Konsentrasi	Absorbansi				Penghambatan (%)	Rerata Penghambatan (%) \pm SD	CV
	Uji	Kontrol Uji	Rerata Kontrol Negatif	Rerata Kontrol Media			
1%	0.444	0.142	0.419	0.098	5.9	7.5 \pm 1.4	19.1
	0.441	0.148			8.7		
	0.443	0.147			7.8		

3. Data Hasil Absorbansi dan Persentase Penghambatan Pertumbuhan Bakteri untuk Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara (100 $\mu\text{g/mL}$)

Kode Fungi	Absorbansi				Penghambatan (%)	Rerata Penghambatan (%) \pm SD	CV
	Uji	Kontrol Uji	Rerata Kontrol Negatif	Rerata Kontrol Media			
IS2-BTG8-1-1	0.253	0.142	0.443	0.098	62.6	57.2 \pm 5.2	9.1
	0.286	0.144			52.2		
	0.273	0.145			56.9		
IS2-BTG8-1-2	0.216	0.132	0.443	0.098	71.7	69.2 \pm 7.7	11.1
	0.204	0.131			75.4		
	0.248	0.131			60.6		
IS2-BTG8-1-3	0.391	0.151	0.443	0.098	19.2	20.9 \pm 2.6	12.6
	0.381	0.155			23.9		
	0.396	0.157			19.5		
IS1-BTG8-2	0.219	0.140	0.443	0.098	73.4	72.7 \pm 4.1	5.6
	0.215	0.145			76.4		
	0.234	0.140			68.4		
IS1-BTG8-3	0.227	0.143	0.443	0.098	71.7	70.8 \pm 0.8	1.2
	0.231	0.144			70.7		
	0.234	0.145			70.0		
IS3-BTG8-4-1-1	0.249	0.143	0.443	0.098	64.3	63.0 \pm 1.2	1.9
	0.257	0.145			62.3		
	0.259	0.147			62.3		

Lampiran 9. Analisis Data Hasil Uji Antibakteri Menggunakan *Oneway* ANOVA

1. Uji Normalitas

KodeEkstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	
PersenHambat	IS2-BTG8-1-1	.192	3	.	.997	3
	IS2-BTG8-1-2	.292	3	.	.923	3
	IS2-BTG8-1-3	.365	3	.	.798	3
	IS1-BTG8-2	.232	3	.	.980	3
	IS1-BTG8-3	.213	3	.	.990	3
	IS3-BTG8-4-1-1	.253	3	.	.964	3

KodeEkstrak	Shapiro-Wilk ^a	
	Statistic	Sig.
PersenHambat	IS2-BTG8-1-1	.894
	IS2-BTG8-1-2	.463
	IS2-BTG8-1-3	.109
	IS1-BTG8-2	.726
	IS1-BTG8-3	.806
	IS3-BTG8-4-1-1	.637

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

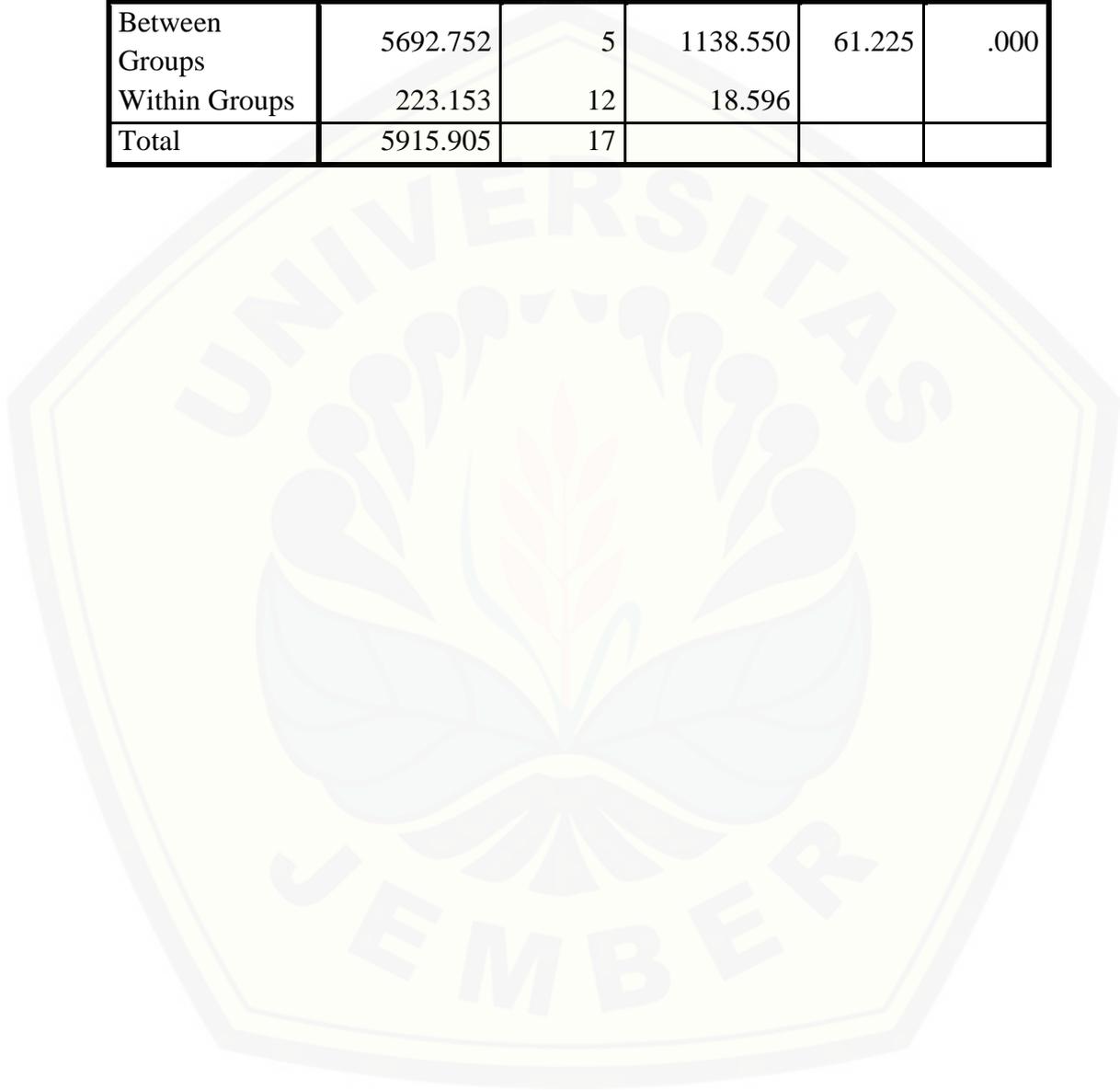
PersenHambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.973	5	12	.057

3. Uji *One-Way* ANOVA

PersenHambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5692.752	5	1138.550	61.225	.000
Within Groups	223.153	12	18.596		
Total	5915.905	17			



4. Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PersenHambat

LSD

(I) KodeEkstrak	(J) KodeEkstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval
					Lower Bound
IS2-BTG8-1-1	IS2-BTG8-1-2	-12.0000*	3.5210	.005	-19.672
	IS2-BTG8-1-3	36.3667*	3.5210	.000	28.695
	IS1-BTG8-2	-15.5000*	3.5210	.001	-23.172
	IS1-BTG8-3	-13.5667*	3.5210	.002	-21.238
	IS3-BTG8-4-1-1	-4.6000	3.5210	.216	-12.272
IS2-BTG8-1-2	IS2-BTG8-1-1	12.0000*	3.5210	.005	4.328
	IS2-BTG8-1-3	48.3667*	3.5210	.000	40.695
	IS1-BTG8-2	-3.5000	3.5210	.340	-11.172
	IS1-BTG8-3	-1.5667	3.5210	.664	-9.238
	IS3-BTG8-4-1-1	7.4000	3.5210	.057	-.272
IS2-BTG8-1-3	IS2-BTG8-1-1	-36.3667*	3.5210	.000	-44.038
	IS2-BTG8-1-2	-48.3667*	3.5210	.000	-56.038
	IS1-BTG8-2	-51.8667*	3.5210	.000	-59.538
	IS1-BTG8-3	-49.9333*	3.5210	.000	-57.605
	IS3-BTG8-4-1-1	-40.9667*	3.5210	.000	-48.638
IS1-BTG8-2	IS2-BTG8-1-1	15.5000*	3.5210	.001	7.828
	IS2-BTG8-1-2	3.5000	3.5210	.340	-4.172
	IS2-BTG8-1-3	51.8667*	3.5210	.000	44.195
	IS1-BTG8-3	1.9333	3.5210	.593	-5.738
	IS3-BTG8-4-1-1	10.9000*	3.5210	.009	3.228
IS1-BTG8-3	IS2-BTG8-1-1	13.5667*	3.5210	.002	5.895
	IS2-BTG8-1-2	1.5667	3.5210	.664	-6.105
	IS2-BTG8-1-3	49.9333*	3.5210	.000	42.262
	IS1-BTG8-2	-1.9333	3.5210	.593	-9.605
	IS3-BTG8-4-1-1	8.9667*	3.5210	.026	1.295
IS3-BTG8-4-1-1	IS2-BTG8-1-1	4.6000	3.5210	.216	-3.072
	IS2-BTG8-1-2	-7.4000	3.5210	.057	-15.072
	IS2-BTG8-1-3	40.9667*	3.5210	.000	33.295
	IS1-BTG8-2	-10.9000*	3.5210	.009	-18.572
	IS1-BTG8-3	-8.9667*	3.5210	.026	-16.638