



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
SUNGAI KAMPUNG KERAPU KABUPATEN SITUBONDO
SERTA SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

Oleh:

Ferina Nadya Pratama

NIM 162210101098

**BAGIAN KIMIA FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER**

2020



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
SUNGAI KAMPUNG KERAPU KABUPATEN SITUBONDO
SERTA SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

SKRIPSI

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

Oleh:

Ferina Nadya Pratama

NIM 162210101098

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

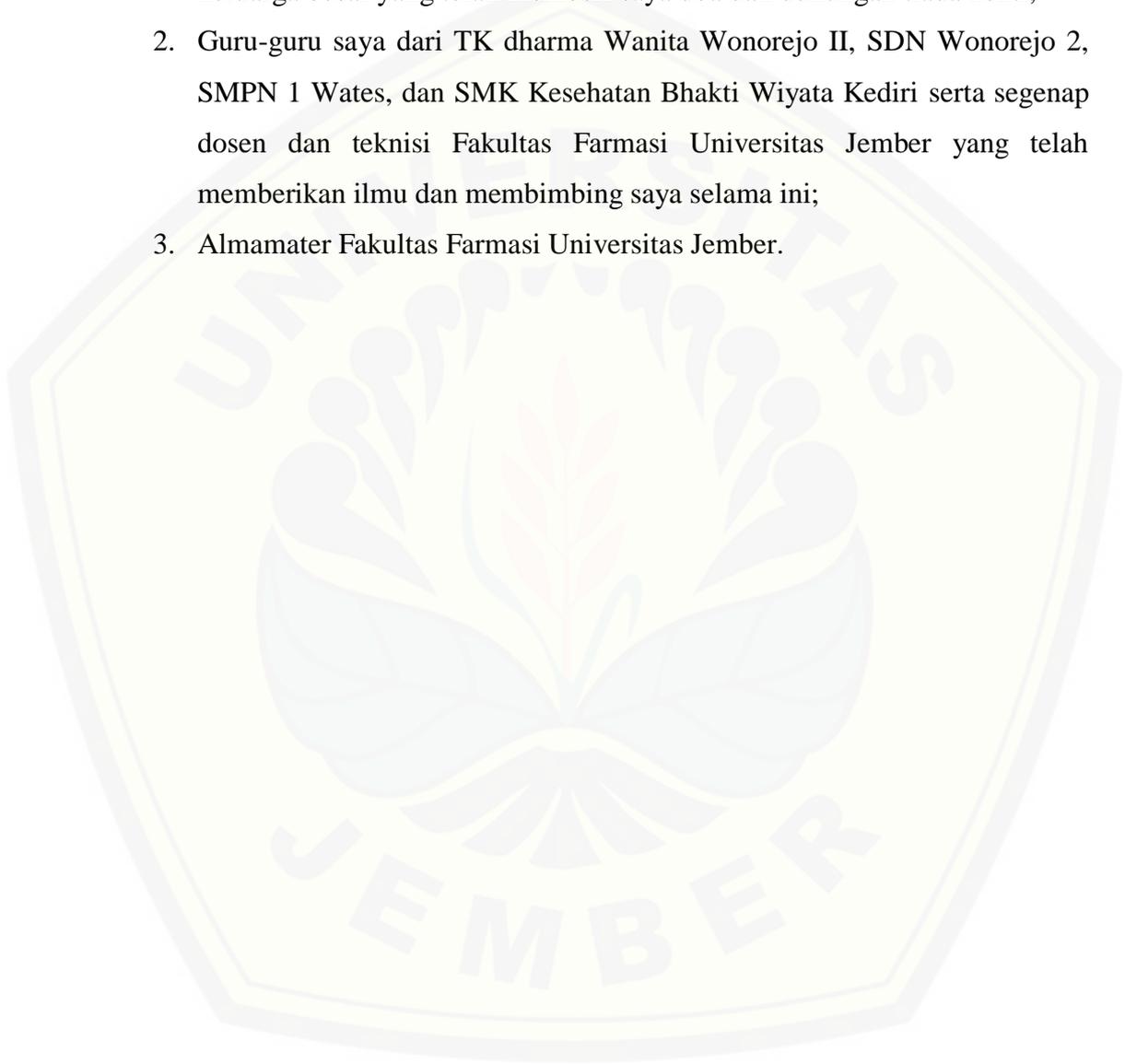
UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ayahanda Suyadi dan Ibunda Astutik tercinta, Kakek, Nenek serta segenap keluarga besar yang telah memberi saya doa dan dukungan tiada henti;
2. Guru-guru saya dari TK dharma Wanita Wonorejo II, SDN Wonorejo 2, SMPN 1 Wates, dan SMK Kesehatan Bhakti Wiyata 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.



MOTTO

“Hidayah untuk menjadi pribadi yang lebih baik tidak selalu datang dengan sendirinya, namun berusaha untuk menghampirinya dan terus memperbaiki diri menjadi pribadi yang lebih baik.”

“Hidup adalah proses belajar dan berbagi. Jangan pernah lelah untuk membantu orang lain, niscaya Allah akan senantiasa memudahkan setiap urusanmu.”

“Keberhasilan dan pencapaian dari setiap urusan kita bukanlah sepenuhnya hanya karena usaha kita, namun akan selalu ada keterlibatan doa dari orang-orang tersayang di sekitar kita.”

---Ferina---



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Ferina Nadya Pratama

NIM : 162210101098

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul ” Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Kampung Kerapu Kabupaten Situbondo serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*” 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, 6 Maret 2020

Yang menyatakan,

Ferina Nadya Pratama

NIM 162210101098

SKRIPSI

**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
SUNGAI KAMPUNG KERAPU KABUPATEN SITUBONDO
SERTA SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

Oleh:

Ferina Nadya Pratama

NIM 162210101098

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Kampung Kerapu Kabupaten Situbondo serta Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*” karya Ferina Nadya Pratama telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 6 Maret 2020

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota

Ari S. N., S.F., GdipSc., M.Sc-Res., Ph.D., Apt.
NIP 197807212003121001

Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198201292009121003

Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II

Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm
NIP 197604142002122001

Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt.
NIP 198304282008122004

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,

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

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA SUNGAI KAMPUNG KERAPU KABUPATEN SITUBONDO SERTA SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus* : Ferina Nadya Pratama : 162210101098 : 2020 : 68 Halaman : Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Indonesia adalah salah satu negara berkembang dengan angka kematian mencapai 2 juta jiwa pada tahun 2018. Salah satu penyebab kematian peringkat sepuluh tertinggi di Indonesia bahkan di dunia adalah infeksi. *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri gram positif yang paling banyak menyebabkan infeksi (PDPI, 2005). Pada saat ini bakteri *Staphylococcus aureus* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan penisilin, karbapenem, dan sefalosporin. Untuk mengatasi hal tersebut banyak dilakukan pengembangan terhadap agen-agen antibakteri. Banyak penelitian menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri dapat ditemukan di mikroorganisme dalam tanah. Pengembangan antibakteri dari fungi tanah masih minim dilakukan pada tanah muara. Hal ini menunjukkan penelitian antibakteri dari fungi tanah muara masih sangat diperlukan untuk mengetahui potensi keanekaragaman hayati di Indonesia sehingga dapat dimanfaatkan sebagai agen antibakteri.

Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian ini dilakukan penelusuran dan isolasi fungi tanah muara sungai Kampung Kerapu Desa Gundit, Kecamatan Kendit, Kabupaten Situbondo serta skrining aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Hasil yang diperoleh dari tahap isolasi yaitu 6 isolat fungi tanah yang diberi kode nama IS-KK-A1, IS-KK-A2, IS-KK-T1, IS-KK-T2, IS-KK-B1 dan IS-KK-B2. Dari isolat yang didapatkan dilakukan skrining awal uji aktivitas antibakteri dengan cara mengkontakkan secara langsung isolat dengan bakteri *Staphylococcus aureus*. Zona bening yang terbentuk menunjukkan aktivitas antibakteri dari isolat. Isolat fungi tanah muara kemudian dilakukan proses fermentasi untuk memproduksi metabolit sekunder. Hasil fermentasi akan di lakukan proses ekstraksi

menggunakan etil asetat yang nantinya ekstrak akan digunakan dalam uji aktivitas antibakteri menggunakan metode mikrodilusi. Uji tersebut dilakukan berdasarkan protokol *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* tahun 2015. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fungi tanah muara sungai Kampung Kerapu Kabupaten Situbondo memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Persen penghambatan yang diperoleh dari ekstrak fungi tanah muara dengan urutan mulai dari yang terbesar yaitu IS-KK-T1 $93,5 \pm 3,8\%$; IS-KK-B1 $88,7 \pm 4,2\%$; IS-KK-B2 $86,8 \pm 5,2\%$; IS-KK-A1 % $71,3 \pm 1,6\%$; IS-KK-A2 $17,9 \pm 6,6\%$; IS-KK-T2 $8,1 \pm 0,6\%$.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Kampung Kerapu Kabupaten Situbondo serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tentunya tidak lepas dari bantuan berbagai pihak baik secara lisan maupun tulisan, maka penulis berterima kasih kepada:

1. Allah SWT. yang telah memberikan nikmat dan kesempatan luar biasa kepada penulis hingga skripsi ini selesai dan Nabi Agung Muhammad SAW. yang selalu menjadi panutan dalam hidup penulis;
2. Ayahanda Suyadi, Ibunda Astutik, Kakek, Nenek dan keluarga tercinta terimakasih atas doa yang selalu menyertai setiap langkah penulis dalam menempuh studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Ibu Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember serta dosen penguji yang telah memberikan masukan kritik dan saran yang membangun dalam menulis naskah skripsi ini;
4. Bapak Ari S. N., S.F., GdipSc., M.Sc-Res., Ph.D., Apt. selaku Dosen Pembimbing Akademik dan Dosen Pembimbing Utama Skripsi yang telah membimbing dan memberi semangat serta arahan selama penulis menempuh S1 di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
5. Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan bimbingan serta arahan sehingga skripsi ini dapat tersusun dengan baik;

6. Ibu Indah Purnama Sary, S.Si., M.Farm., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan kritik, dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
7. Seluruh dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, pengalaman, dan motivasi penulis;
8. Sahabatku, Fidya Larasati, Aina Senja Yuliyani, yang selalu menerima curahan hati dan senantiasa memberi dukungan kepada penulis;
9. Sahabatku Hanin Afifah, Andika Prabandari, Norma Justika Elma Suvia, Regita Ardhia Ramadhany yang telah memberikan dukungan selama penulis menempuh studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember, dan telah menjadi keluarga kedua di perantauan;
10. Teman seperjuangan “DUDRG”, khususnya SOIL FUNGI GROUP Afrian Rosyadi, Amrina Rosyada Fajriyanti, Mariatul Khibtiyyah, Ziyah Nihlatul Millah yang telah memberi semangat, canda tawa, dan motivasi kepada penulis;
11. Saudara Muzxhirul Haq yang telah membantu penulis dalam persiapan sidang akhir skripsi dan telah memberikan dukungan kepada penulis;
12. Teman-teman kelas B angkatan 2016 yang telah kebersamai perjuangan selama menempuh kuliah S1;
13. Teman- Teman di BEMF RANGER, BEMF PIONEER dan BEMF PANDAWA yang telah memberi warna di dinamika kehidupan kampus juga telah membentuk penulis menjadi pribadi yang lebih bermanfaat;
14. Teman-teman Departemen Eksternal yang telah menjadi teman perjuangan dalam mengemban tugas dan amanah selama menjadi anggota BEMF tercinta;
15. Teman- Teman “KISMIS”, Ayik, Ajik, Sabda, Fania, Lilla, Intan, Besty, Nunu, Vinda, Rifdah, Ziyah, Ulyek, Arofa, Annisa, yang telah menjadi salah satu alasan untuk sekuat sekarang untuk bertahan hingga titik ini;
16. Keluarga “KKN 262”, Syihab, Reza, Mas Okta, Indah, Riska, Savira, Novita, Dinda, Hazlina yang telah kebersamai selama 45 hari perjuangan di desa

Opo-Opo tercinta dan senantiasa memberikan dukungan dan doa terhadap penulis;

17. Teman-teman Fakultas Farmasi Universitas Jember MORFIN 2016 yang selalu memberikan bantuan, dukungan, dan semangatnya dalam penyusunan skripsi ini;

18. Semua pihak yang telah berperan membantu menyelesaikan skripsi ini;

Penulis menyadari bahwa masih ada kelemahan dan kekurangan baik dalam segi materi ataupun teknik penulisan skripsi ini. Penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar skripsi ini menjadi lebih baik.

Jember, 6 Maret 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN	iv
RINGKASAN	v
PRAKATA	vii
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Penyakit Infeksi	6
2.2 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.3 Antibiotik	8
2.4 Fungi Tanah	10
2.5 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah	13
2.5.1 Isolasi Fungi	13
2.5.2 Fermentasi	14
2.6 Ekstraksi	16
2.7 Metode Uji Antibakteri	17
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	19
3.1 Jenis Penelitian	19
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	19
3.3 Variabel Penelitian	19
3.3.1 Variabel Bebas	19
3.3.2 Variabel Terikat	19

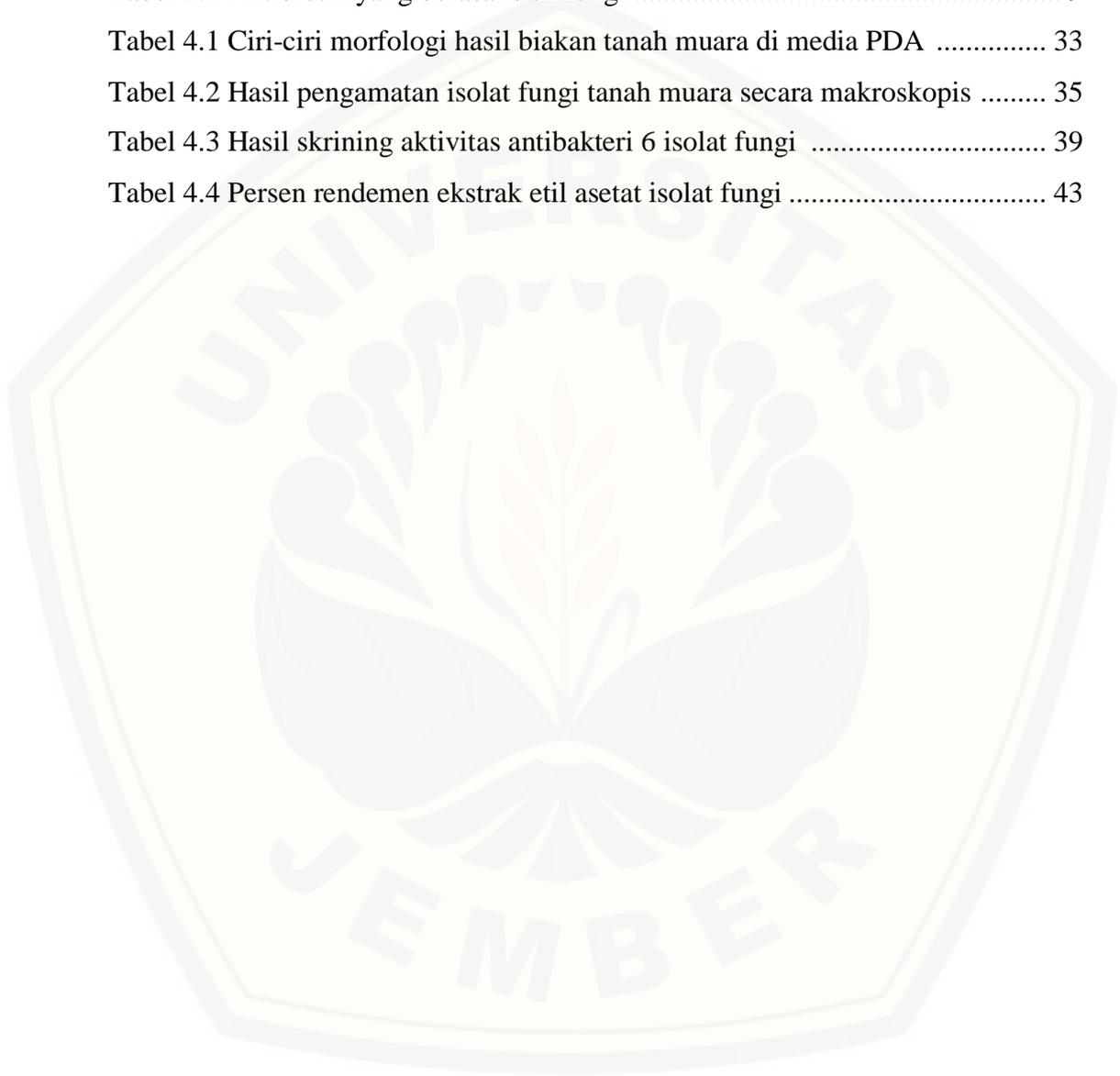
3.3.3 Variabel Terkendali.....	19
3.4 Rancangan Penelitian	20
3.4.1 Definisi operasional	20
3.4.2 Skema Prosedur penelitian.....	21
3.5 Alat dan Bahan Penelitian.....	22
3.5.1 Alat.....	22
3.5.2 Bahan.....	22
3.6 Prosedur Kerja	22
3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	22
3.6.2 Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA)	22
3.6.3 Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB)	23
3.6.4 Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA)	23
3.6.5 Persiapan Sampel Tanah	24
3.6.6 Isolasi Fungi Tanah.....	24
3.6.7 Skrining awal Aktivitas Antibakteri.....	25
3.6.8 Fermentasi	26
3.6.9 Ekstraksi.....	26
3.6.10 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah	27
3.6.11. Analisis Data	31
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Pengambilan Sampel Tanah Muara	32
4.2 Isolasi dan Identifikasi Fungi Tanah Muara	34
4.3 Skrining Aktivitas Antibakteri	38
4.4 Fermentasi dan Ekstraksi Isolat Fungi Tanah Potensial	40
4.4.1 Fermentasi Fungi Tanah Potensial	40
4.4.2 Ekstraksi Isolat Fungi Tanah Potensial	41
4.5 Uji Aktivitas Antibakteri	44
BAB 5. PENUTUP.....	48
LAMPIRAN.....	55

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	7
Gambar 2.2 Morfologi makroskopis fungi kapang dan khamir	10
Gambar 2.3 Morfologi mikroskopis sel fungi dengan perbesaran 400x.....	111
Gambar 2.4 Morfologi mikroskopis hifa dengan perbesaran 400x	11
Gambar 2.5 Faktor Lingkungan	102
Gambar 2.6 Media PDB sebelum dan sesudah proses fermentasi.....	15
Gambar 3.1 Skema Penelitian.....	21
Gambar 4.1 Pipa paralon untuk sampling tanah	32
Gambar 4.2 Biakan fungi tanah di media PDA pada hari ke-7	33
Gambar 4.3 Isolat fungi di media PDA pada hari ke-7.....	34
Gambar 4.4 Morfologi makroskopis aktinomisetes, bakteri, dan fungi.....	34
Gambar 4.5 Hasil pengamatan mikroskopis isolat fungi.	37
Gambar 4.6 Morfologi sel fungi jenis Khamir dan Kapang.....	38
Gambar 4.7 Hasil uji kontak isolat fungi terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Gambar 4.8 Contoh hasil fermentasi isolat fungi IS-KK-A2 di media PDB.....	41
Gambar 4.9 Ekstraksi partisi cair-cair.....	42
Gambar 4.10 Ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara.....	43
Gambar 4.11 Diagram batang persen penghambatan ekstrak fungi	46

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Mekanisme kerja antibiotik dan mekanisme resistensi	9
Tabel 2.2 Antibiotik yang berasal dari fungi	9
Tabel 4.1 Ciri-ciri morfologi hasil biakan tanah muara di media PDA	33
Tabel 4.2 Hasil pengamatan isolat fungi tanah muara secara makroskopis	35
Tabel 4.3 Hasil skrining aktivitas antibakteri 6 isolat fungi	39
Tabel 4.4 Persen rendemen ekstrak etil asetat isolat fungi	43



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah salah satu negara berkembang dengan angka kematian mencapai 2 juta jiwa pada tahun 2018. Salah satu penyebab kematian peringkat sepuluh tertinggi di Indonesia bahkan di dunia adalah infeksi (Wahjono, 2007). Infeksi adalah suatu proses invasi dan kolonisasi mikroorganisme di dalam jaringan tubuh inang sehingga menyebabkan terjadinya cedera lokal serta menimbulkan respon imunologis. Saat ini infeksi menjadi salah satu fokus *World Health Organisation* (WHO) dalam mengurangi tingkat mortalitas dan morbiditas (WHO, 2016). Negara berkembang dengan tingkat penghasilan penduduk yang rendah hingga menengah menjadi peluang utama terjadinya penyakit infeksi. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi sosial ekonomi dan faktor biologis lingkungan setempat. Pada tahun 2008 WHO melaporkan bahwa sebanyak lebih dari 8 juta kematian yang disebabkan oleh penyakit infeksi terjadi di negara berkembang salah satunya Indonesia. Angka kematian akibat infeksi di Indonesia mencapai peringkat kelima teratas, sehingga perlu dilakukan pengobatan yang tepat untuk kasus infeksi (WHO, 2012).

Berdasarkan data *World Health Organisation* (WHO) pada tahun 2016, bakteri merupakan salah satu penyebab utama infeksi yang mudah menular. Berdasarkan klasifikasi pewarnaan dan bentuk dinding sel, bakteri dibagi menjadi bakteri gram positif dan negatif. *Staphylococcus aureus* adalah salah satu bakteri gram positif yang paling banyak menyebabkan infeksi. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri flora normal yang berada pada kulit manusia, namun apabila keberadaannya melebihi batas dapat menyebabkan infeksi. Spesies ini merupakan penyebab infeksi nosokomial terbesar di Indonesia (PDPI, 2005). Penyakit yang dapat terjadi akibat infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* diantaranya infeksi saluran kemih, meningitis, infeksi pada kulit dan infeksi pada organ tubuh yang lain. (Oliveira, Tomasz and de Lencastre, 2002).

Antibiotik merupakan pilihan utama yang digunakan dalam terapi infeksi bakteri. Terapi antibiotik sering disalahgunakan dalam penggunaannya. Tingkat kepatuhan pasien yang rendah dalam mengonsumsi antibiotik menjadi salah satu penyebab terjadinya resistensi. Resistensi adalah kondisi dimana antibiotik tidak lagi dapat membunuh bakteri dengan dosis seperti terapi sebelumnya. (Bibi *et al.*, 2011). Pada saat ini bakteri *Staphylococcus aureus* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan penisilin yang selanjutnya disebut dengan istilah *Methicillin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA). Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga mengalami resistensi terhadap antibiotik lain diantaranya karbapenem dan sefalosporin. Dengan demikian pengobatan infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan antibiotik golongan tersebut sudah tidak efektif lagi. Resistensi *Staphylococcus aureus* merupakan masalah serius, sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menemukan alternatif antibiotik baru untuk mengatasi masalah resistensi tersebut (Zulkifli, Soelistya and Jekti, 2016).

Beberapa antibiotik yang sudah ada di pasaran berasal dari fungi seperti penisilin, griseofulvin, dan sefalosporin. Pada saat ini *Staphylococcus aureus* telah mengalami resistensi terhadap antibiotik golongan penisilin dan sefalosporin. Maka dari itu perlu dilakukan pencarian agen antibiotik baru. Saat ini penelitian agen antibiotik banyak berfokus pada fungi. Penelitian yang dilakukan oleh Laboratorium Mikrobiologi di Nigeria pada tahun 2011 telah ditemukan sebanyak lebih dari 100 spesies fungi yang memiliki aktivitas antibakteri. Jenis fungi yang diperkirakan banyak memiliki potensi sebagai antibiotik adalah fungi yang berasal dari tanah. Berdasarkan penelitian yang dilakukan dalam dua dekade terakhir telah ditemukan isolat fungi tanah yang memiliki aktivitas antibakteri. Dari penemuan tersebut, dapat dijadikan dasar bahwa fungi tanah berpotensi sebagai agen antibiotik khususnya sebagai alternatif pengobatan penyakit infeksi *Staphylococcus aureus* yang telah banyak mengalami resistensi (Oliveira, Tomasz and de Lencastre, 2002).

Fungi adalah salah satu mikroorganisme eukariotik yang memerlukan adanya karbon, nitrogen dan fosfat sebagai asupan utama dalam pertumbuhannya. Ketiga komponen ini banyak terdapat di tanah muara. Definisi tanah muara yaitu tanah yang

berada pada pertemuan antara air laut dan air sungai yang tergenang air saat air laut pasang dan tidak tergenang air saat air laut surut (Perkins dkk., 1983). Pada tanah muara banyak terdapat akar mangrove dimana akar tersebut mampu melepaskan senyawa organik sehingga pada rizosfer tersebut banyak ditumbuhi oleh fungi. Jenis fungi yang tumbuh pada setiap lapisan kedalaman tanah dipengaruhi oleh tingkat ketersediaan nutrisi, sehingga spesies fungi yang tumbuh bermacam-macam menyesuaikan dengan kebutuhan nutrisi yang tersedia (Perkins dkk., 1983). Diperlukan teknik tertentu untuk mengambil sampel tanah agar didapatkan fungi potensial yang memiliki aktivitas antibakteri (Perkins, Neilson and Cronin, 1983). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Abneuf pada tahun 2016 menyatakan bahwa terdapat beberapa isolat fungi yang didapatkan dari teluk Yankee Antartika memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Bacillus subtilis*. Hal ini membuktikan bahwa fungi tanah muara memiliki potensi besar untuk dikembangkan sebagai agen antibiotik (Zulkifli, Soelistya and Jekti, 2016).

Berdasarkan latar belakang di atas maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penemuan agen antibiotik baru yang berasal dari fungi tanah khususnya fungi tanah muara. Fungi tanah muara dianggap berpotensi sebagai agen antibiotik karena terdapat rizosfer yang banyak ditumbuhi oleh fungi. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi fungi tanah muara sebagai agen antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode mikrodilusi *single concentration*. Bakteri *Staphylococcus aureus* dipilih sebagai obyek uji dalam penelitian ini karena bakteri ini merupakan salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi nosokomial tertinggi di Indonesia dan telah mengalami resistensi terhadap beberapa antibiotik.

Lokasi pengambilan sampel yaitu berada di muara Sungai Kampung Kerapu Desa Gundit, Kecamatan Kendit, Kabupaten Situbondo. Alasan pemilihan lokasi sampel tersebut didasarkan pada penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Yunita pada tahun 2019 yang telah melakukan skrining aktivitas antibakteri isolat fungi tanah muara dari daerah Sampang, Sumenep, Rembang, Banyuwangi, Situbondo, Probolinggo, dan Jember menyatakan bahwa hanya isolat fungi yang berasal dari Situbondo yang memiliki potensi aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Selain itu karena tanah muara di daerah tersebut masih belum pernah dilakukan penelitian mengenai aktivitas antibakteri khususnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Ramirez dkk mengatakan bahwa suatu jenis fungi mampu memberikan aktivitas antibakteri yang lebih kuat apabila dalam bentuk ekstrak, sehingga pada penelitian kali ini dilakukan proses fermentasi dan ekstraksi terhadap isolat fungi tanah yang didapatkan. Pada penelitian kali ini ekstraksi dilakukan dengan metode partisi cair-cair menggunakan corong pisah dengan etil asetat sebagai pelarutnya. Pemilihan etil asetat sebagai pelarut didasarkan pada metode partisi cair-cair yang akan terbentuk dua fase saling terpisah yaitu fase air dan fase etil asetat. Etil asetat dipilih karena bersifat semi polar sehingga diharapkan mampu menarik senyawa yang bersifat sedikit non polar dan sedikit polar serta mudah dipisahkan dengan pelarut media PDB yang bersifat polar (Berk, 2018). Hasil ekstrak isolat fungi selanjutnya diuji aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi untuk mengetahui adanya potensi penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditunjukkan dengan nilai persen penghambatan.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*?
2. Berapakah nilai persen penghambatan dari ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Untuk mengetahui adanya aktivitas ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. Untuk mengetahui nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang ingin didapatkan dari penelitian ini antara lain :

1. Penelitian ini diharapkan mampu memberikan informasi mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* serta dapat memberikan pengetahuan yang berkontribusi dalam kemajuan di bidang kesehatan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar bagi penelitian selanjutnya untuk menemukan agen antibiotik yang dapat mengatasi masalah resistensi antibiotik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Penyakit Infeksi

Infeksi merupakan kondisi dimana suatu *host* (inang) mengalami invasi oleh mikroorganisme patogen. Bakteri, jamur, dan virus merupakan contoh mikroorganisme patogen yang dapat menular baik secara langsung maupun tidak langsung. Habitat hidup mikroorganisme patogen dipengaruhi oleh tingkat kebersihan dan kelembaban (WHO, 2016). Kondisi yang cenderung lembab, mampu meningkatkan resiko terjadinya infeksi mikroorganisme.

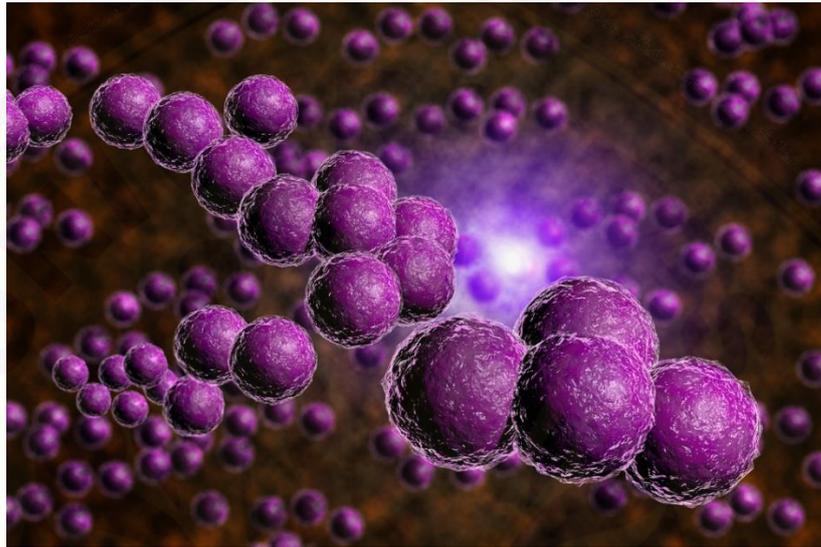
Proses terjadinya infeksi bakteri pada *host* (inang) terjadi melalui beberapa tahap. Tahap patogenesis infeksi antara lain: (1) transmisi yaitu proses masuknya bakteri ke dalam sel inang melalui mekanisme tertentu; (2) adesi adalah tahap awal bakteri untuk menempel pada sel inang dan menyebabkan infeksi; (3) kolonisasi merupakan tahap saat bakteri telah berada di dalam tubuh inang dan memperbanyak diri. Apabila bakteri telah menyebar ke seluruh tubuh melalui peredaran darah, maka kondisi tersebut disebut sepsis. (Jawetz dkk., 2005). Infeksi dapat terjadi apabila invasi oleh bakteri patogen dalam jumlah yang tidak terkontrol dalam tubuh dan sistem kekebalan tubuh tidak dapat membentuk pertahanan diri yang cukup kuat (Jawetz dkk., 2005).

Berdasarkan metode pewarnaan, bakteri dibagi menjadi dua yaitu bakteri gram positif dan gram negatif (Menichetti, 2005). *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* merupakan contoh bakteri gram positif yang mampu menyebabkan infeksi nosokomial dengan prevalensi yang cukup tinggi di Indonesia (Silver, 2011). Beberapa spesies bakteri ditemukan sebagai flora normal diantaranya yang berperan dalam proses metabolisme tertentu di dalam tubuh, namun apabila jumlah dari bakteri tersebut melebihi normal dapat menyebabkan terjadinya infeksi.

2.2 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri gram positif dari genus *Staphylococcus*. Morfologi *S.aureus* berbentuk kokus menyerupai anggur, bersifat fakultatif anaerob yang dapat tumbuh dengan maupun tanpa oksigen, dan berukuran

sekitar 1 μm . Koloni bakteri *S.aureus* ada yang tersusun tidak berpasangan dan berpasangan membentuk rantai 3 hingga 4 sel, tidak beraturan, tidak bergerak, dan tidak memiliki spora. Kondisi optimal bakteri *S.aureus* untuk tumbuh yaitu pada suhu 6,5 – 46 °C dan pada rentang pH 4,2 – 9,3. Bakteri *S.aureus* akan menghasilkan pigmen saat berada pada suhu 20-25 °C yang menyebabkan koloni bakteri ini berwarna putih kekuningan (Jawetz dkk, 2004). Morfologi *S.aureus* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi bakteri *Staphylococcus aureus* (Oktaviantris, 2007)

Pada kondisi normal *S.aureus* merupakan flora normal pada kulit manusia, namun apabila jumlahnya melebihi ambang batas maka dapat menyebabkan infeksi pada tubuh inangnya. Bakteri *S.aureus* merupakan patogen oportunistik yang banyak menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *S.aureus* dapat bersifat kronis maupun akut, dan dapat menyebar ke peredaran darah secara sistemik sehingga menyebabkan sepsis (Taylor and Unakal, 2018). Faktor virulensi yang berperan dalam patogenesis bakteri ini berupa toksin, protein, edesin, dan enzim yang dapat merusak jaringan pada tubuh inangnya. Kemampuan bakteri ini dalam menginfeksi tubuh inangnya dipengaruhi oleh adanya enzim hyaluronidase, koagulase, hemolisin, dan leukosidin (Oktaviantris, 2007).

Struktur dinding *S.aureus* terdiri dari polisakarida yang berperan dalam patogenesis bakteri ini. Peptidoglikan pada dinding sel bakteri *S.aureus* terdiri dari

gabungan subunit polisakarida yang mampu mengaktifasi komplemen, serta merangsang pembentukan sitokin dan agregat platelet. Selain itu, bakteri *S.aureus* mampu membentuk biofilm yang dapat berdampak meningkatkan kecepatan penyebarannya dengan mekanisme meningkatkan persisten dan proliferasi bakteri. Kemampuan *S.aureus* dalam menghasilkan biofilm mampu meningkatkan kemungkinan bakteri untuk berkoloni dan membangun sistem pertahanan diri dari terapi antibakteri sehingga mampu meningkatkan resiko terjadinya resistensi (Anwar *et al.*, 2009).

2.3 Antibiotik

Antibiotik adalah senyawa yang mampu membunuh atau mengontrol pertumbuhan mikroorganisme dalam sel inang pada kasus infeksi. Tujuan dari terapi menggunakan agen antibiotik adalah membunuh dan mengontrol pertumbuhan bakteri tanpa merusak sel inang (Irving dkk., 2005). Berdasarkan kemampuan aktivitas antibakteri dibagi menjadi dua yaitu bakterisidal yang dapat membunuh bakteri dan bakteristatik yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Kedua aktivitas tersebut dijadikan sebagai dasar untuk penggolongan antibiotik dalam pengobatan infeksi bakteri. Berdasarkan hasil survei yang dilakukan WHO pada tahun 2017 menyatakan bahwa sebanyak 42 agen antibakteri baru yang telah diteliti mencapai tahap pengujian klinis pada manusia (WHO, 2017).

Berdasarkan mekanisme antibiotik dalam menghambat dan membunuh bakteri serta tempat aksinya, dibagi menjadi empat macam mekanisme. Tabel 2.1 menjelaskan mengenai jenis antibiotik, target, dan mekanisme kerja.

Tabel 2.1 Mekanisme kerja antibiotik dan mekanisme resistensi (Nwousu, 2001)

Mekanisme Kerja	Antibiotik	Target	Mekanisme Resistensi
Menghambat sintesis dinding sel	B-laktam (Penisilin, amoksisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam)	Transpeptidase	Modifikasi enzim β -laktamase oleh bakteri
Menghambat sintesis protein	Eritromisin Tetrasiklin Aminoglikosida Oksazolidon	Peptidiltransferase	Modifikasi struktur rRNA pada bakteri
Menghambat sintesis DNA atau RNA	Florokuinolon (ciprofoxacin, levofloxacin, gemifloxacin, ofloxacin)	DNA girase	Mutasi pada topoisomerase IV dan DNA girase
Menghambat sintesis asam folat dan dihidroprotease	Trimetropim Sulfametoxazol Sulfonamid	Enzim bakteri	Mutasi pada enzim target

Berdasarkan sejarah perkembangan antibiotik, beberapa jenis antibiotik didapatkan dari mikroorganisme fungi. Tabel 2.2 menunjukkan beberapa contoh antibiotik yang berasal dari fungi.

Tabel 2.2 Antibiotik yang berasal dari fungi (Nwousu, 2001)

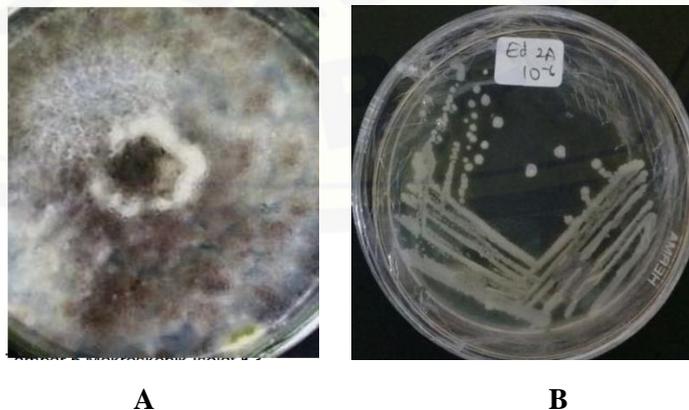
Antibiotika	Jenis Fungi yang memproduksi
Penisillin	<i>Penicillium chrysogenum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Griseofulvin	<i>Penicillium griseofulvin</i>
Sefalosporin	<i>Cephalosporium acremonium</i>

2.4 Fungi Tanah

Tanah merupakan elemen yang berperan besar dalam ekosistem. Terdapat berbagai macam unsur biotik maupun abiotik di dalam tanah. Sebagian besar organisme yang tumbuh di dalam tanah adalah fungi, bakteri, aktinomisetes, dan alga dengan prosentase lebih dari 50%. Tanah mengandung bahan organik seperti O₂, CO₂, karbon, dan nitrogen yang mampu menunjang kehidupan bagi organisme yang hidup di dalamnya (Lee Taylor and Sinsabaugh, 2014).

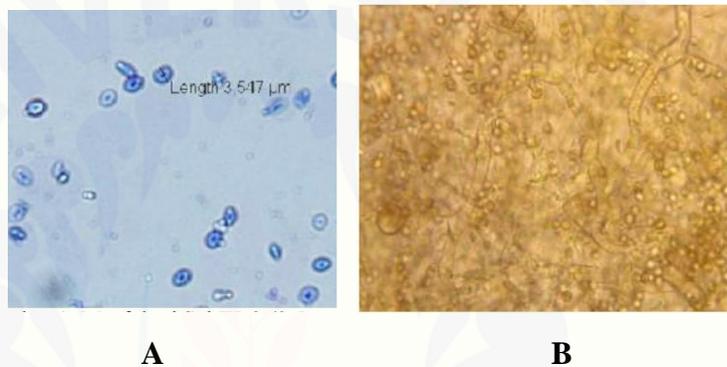
Fungi tanah merupakan organisme eukariotik yang bersifat kemoheterotrof yaitu membutuhkan adanya senyawa organik untuk tumbuh. Beberapa jenis senyawa organik yang berperan dalam pertumbuhan fungi tanah di antaranya karbon, fosfat, dan nitrogen. Struktur dinding sel fungi terdiri dari 80-90% polisakarida berupa kitin, glukon, dan mannan. Komponen penyusun dinding fungi lainnya yaitu protein, polifosfat, lipid, dan ion anorganik.

Berdasarkan morfologi fungi secara garis besar dibagi menjadi 2 kelompok, yaitu kapang (*mold*) dan khamir (*yeast*). Ciri-ciri koloni kapang secara makroskopis permukaannya cenderung tebal dan teksturnya lebih kasar, beberapa di antaranya berambut, koloni memiliki warna cenderung beragam. Sedangkan khamir memiliki bentuk koloni berwarna putih kekuningan, permukaannya halus dan teksturnya seperti lendir. Gambar 2.2 merupakan penampang makroskopis koloni kapang dan khamir pada media agar.



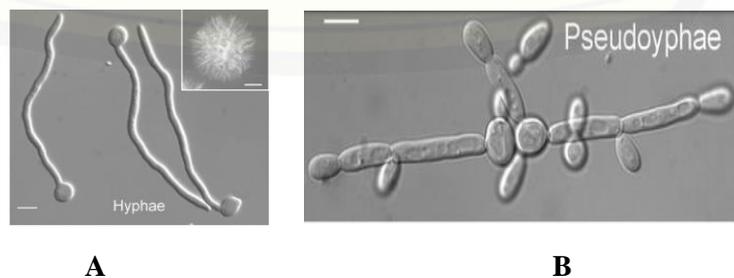
Gambar 2.2 Morfologi makroskopis fungi (A) kapang (Hafsari., 2013) dan (B) khamir (Angraini dkk., 2019)

Secara mikroskopis kapang merupakan fungi multiseluler yang memiliki hifa, miselium, dan spora. Sedangkan khamir merupakan fungi yang sebagian besar merupakan sel tunggal berbentuk oval dan bulat, tidak berfilamen, dan tidak berflagela. Beberapa spesies khamir ada yang memiliki hifa dan ada pula yang memiliki rantai sel panjang yang berbentuk menyerupai hifa (*pseudohifa*). Pada kondisi tertentu fungi mampu berubah menjadi kapang maupun khamir yang biasa disebut dengan fungi dimorfisme (Fierer *et al.*, 2009). Gambar 2.3 menunjukkan morfologi sel fungi yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 400x.



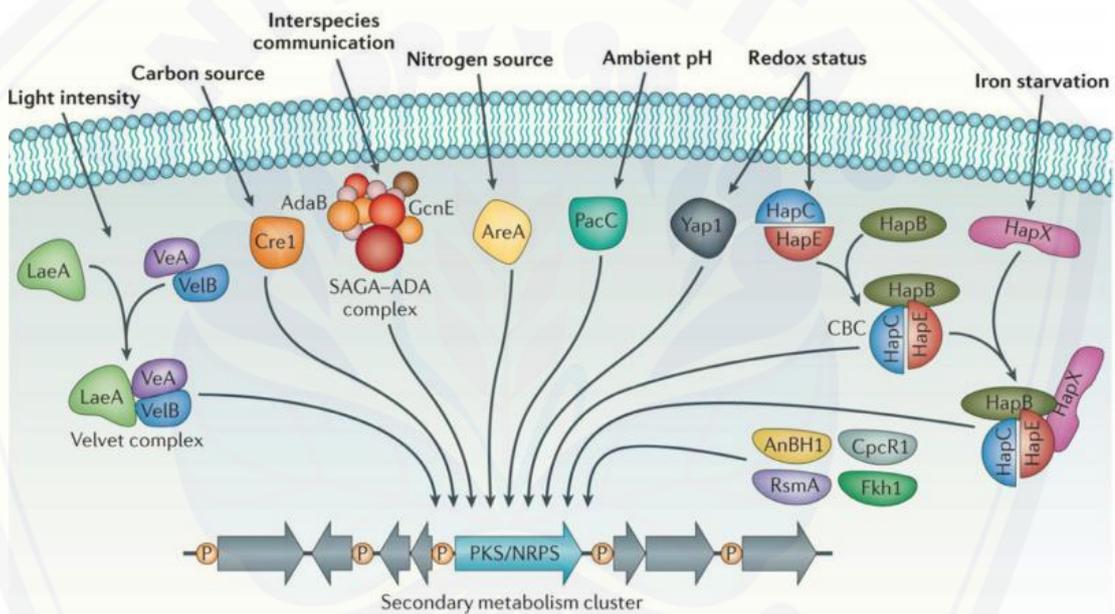
Gambar 2.3 Morfologi sel fungi (A) Khamir (Lasmini, 2016), (B) Kapang (Rahmi dan Asterina, 2013) pada mikroskop dengan perbesaran 400x

Bagian penyusun tubuh fungi yang berfilamen panjang disebut hifa. Diameter hifa pada setiap spesies fungi berbeda, tergantung pada jenis spesies, umur, dan kondisi tempat tinggal fungi. Pada umumnya hifa berukuran antara 3-10 μm . Hifa mampu bergabung dan membentuk bagian kompak dan panjang yang disebut miselium (Fierer *et al.*, 2009). Gambar 2.4 menunjukkan morfologi hifa yang diamati secara mikroskopis dengan perbesaran 400x.



Gambar 2.4 Morfologi (A) hifa dan (B) Pseudohifa dengan perbesaran 400x (Nichollas dkk., 2016)

Fungi tanah memiliki peran penting dalam proses degradasi dan ketersediaan unsur hara di dalam tanah. Fungi tanah mampu mengubah bahan organik yang ada di dalam tanah menjadi CO₂, dan asam organik yang berperan dalam keseimbangan nutrisi di dalam tanah. Fungi dapat menghasilkan berbagai produk alami, di antaranya metabolit sekunder yang berperan dalam sistem pertahanan diri fungi terhadap lingkungan. Jenis metabolit sekunder fungi diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok diantaranya alkaloid, lemak, dan terpen (Lee Taylor and Sinsabaugh, 2014). Gambar 2.5 merupakan beberapa faktor yang berperan dalam proses pembentukan metabolit sekunder.



Gambar 2.5 Faktor Lingkungan yang mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder (Perkins dkk., 1983)

Pada habitat aslinya, sebagian besar fungi tanah ditemukan pada kedalaman tanah 10 cm dari permukaan. Fungi dapat tumbuh secara optimal pada rentang suhu 25-30 °C dengan pH 5-6. Kondisi pertumbuhan yang sesuai bagi kebutuhan fungi salah satunya adalah tanah muara. Tanah muara merupakan tanah yang berada pada pertemuan antara sungai dengan pantai, dimana pada kondisi pasang tanah ini akan terendam oleh air laut dan saat kondisi surut maka tanah ini tidak akan terendam oleh air laut (Perkins dkk., 1983). Di dalam tanah muara terdapat akar-akar tanaman bakau

baik yang masih hidup maupun sudah lapuk yang mampu menyediakan zat-zat organik sehingga dapat menjadi tempat optimum bagi pertumbuhan fungi. Terdapat lebih dari 100 spesies fungi yang telah diisolasi dari tanah muara oleh Takasashi dkk di Brazil. Berdasarkan skrining aktivitas yang dilakukan dengan cara uji kontak langsung antara bakteri dengan isolat fungi, terdapat lebih dari 10 isolat yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri (Heyd *et al.*, 2007). Uji kontak langsung bertujuan untuk seleksi awal dalam melihat adanya potensi aktivitas antibakteri dari isolat fungi sebelum dilakukan uji aktivitas menggunakan metode yang lebih valid. Dengan demikian fungi tanah muara dapat dijadikan sebagai target penelitian yang potensial untuk menemukan agen antibiotik yang baru.

2.5 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah

2.5.1 Isolasi Fungi

Isolasi fungi merupakan pengambilan fungi tertentu dari biakan fungi untuk dipindahkan ke dalam media baru sehingga didapatkan kultur fungi spesifik. Pemilihan fungi spesifik didasarkan pada perbedaan morfologi meliputi warna, bentuk, dan tekstur permukaan fungi yang diamati secara makroskopis. Isolasi fungi dapat dilakukan dengan memindahkan fungi ke dalam media kultur baru yang sesuai. Media isolasi fungi dirancang menyerupai media tumbuh asli fungi yang mengandung senyawa organik tertentu untuk menunjang pertumbuhan fungi. Salah satu jenis media yang banyak digunakan untuk isolasi fungi adalah media *Potato Dextrose Agar* (PDA). Pembuatan media PDA pada penelitian kali ini merujuk pada penelitian yang telah dilakukan oleh Pamungkas pada tahun 2019. Hasil optimasi pada penelitian tersebut, media yang paling optimum terhadap pertumbuhan fungi adalah media PDA dengan air laut (Pamungkas, 2019).

Media PDA mengandung ekstrak kentang 20% dan dekstrosa 2%. Kandungan ekstrak kentang berfungsi untuk menyediakan unsur nitrogen dan karbon yang berperan dalam proses pertumbuhan fungi. Sedangkan kandungan dekstrosa akan dipecah menjadi glukosa dan digunakan sebagai sumber energi bagi fungi. Pada komposisi media PDA terdapat asam tartarat steril berperan sebagai buffer, sehingga menjaga agar

pH PDA cenderung asam yaitu 3,5. Kondisi pH yang cenderung asam mampu mencegah bakteri untuk tumbuh pada media ini, sehingga meminimalisir adanya kontaminasi bakteri pada saat proses isolasi fungi (Davis dkk, 1971).

2.5.2 Fermentasi

Fermentasi fungi merupakan proses memperbanyak massa fungi dan menghasilkan produk biologis fungi berupa metabolit primer dan metabolit sekunder. Metabolit primer merupakan hasil metabolisme fungi yang berperan dalam proses pertumbuhan fungi berupa polisakarida, asam amino, dan asam asetat. Sedangkan metabolit sekunder adalah hasil metabolisme fungi yang digunakan dalam mempertahankan kelangsungan hidup fungi diantaranya alkaloid, terpenoid, dan flavonoid (Harborne, 2006).

Proses fermentasi dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain *batch process*, *continuous batch process*, dan *fed-batch process*. *Batch process* merupakan sistem fermentasi tertutup. Pada metode ini, fungi diinokulasi dalam media selama kurun waktu tertentu tanpa menambahkan media baru. Oksigen, antifoam, asam dan basa ditambahkan pada saat awal proses fermentasi untuk memberikan kondisi optimum pada proses fermentasi (Pumphrey and Julien, 1996). Sedangkan *fed-batch process* merupakan hasil modifikasi dari metode *batch process*. Pada metode ini dilakukan penambahan substrat tertentu ke dalam media secara bertahap. Metode *fed batch process* memiliki laju produksi biomassa dan metabolit yang lebih cepat dibanding metode *batch process* karena adanya substrat mampu mempertahankan fase pertumbuhan fungi berada pada fase log dan stasioner. *Continuous batch process* adalah metode fermentasi dengan sistem terbuka. Pada metode ini dilakukan penambahan nutrisi baru secara berkala sesuai dengan jumlah nutrisi yang dikeluarkan pada waktu tertentu. Tujuan penambahan nutrisi baru dan pengeluaran nutrisi lama untuk mempertahankan pertumbuhan fungi berada pada fase *steady state* dimana volume, konsentrasi sel, konsentrasi produk, konsentrasi nutrisi, dan laju pertumbuhan fungi tidak mengalami perubahan (Pumphrey and Julien, 1996)..

Pada penelitian kali ini menggunakan metode *batch process* dengan pertimbangan metode ini lebih meminimalisir kontaminasi dan lebih sederhana. Sedangkan metode *fed batch process* dan *continuous process* memiliki kekurangan diantaranya waktu inkubasi lebih lama, biaya proses lebih besar, serta tinggi kemungkinan untuk terjadi kontaminasi selama adanya penambahan media maupun nutrisi. Media fermentasi yang digunakan pada penelitian ini adalah media *Potatto Dextrose Broth* (PDB), dengan pertimbangan kandungan senyawa organik yang mampu memfasilitasi untuk pertumbuhan kapang dan khamir (Himedia, 2015).

Proses fermentasi dapat dilakukan selama 10 – 14 hari. Media hasil fermentasi akan cenderung mengalami perubahan warna dan bau dari media awal sebelum dilakukan fermentasi. Perubahan warna dan bau pada media diakibatkan karena pembentukan biomassa dan metabolit sekunder fungi selama proses fermentasi berlangsung (Rollando, 2013). Gambar 2.6 menunjukkan media PDB sebelum dan setelah dilakukan proses fermentasi isolat fungi.

**A****B**

Gambar 2.6 Media PDB (A) sebelum proses fermentasi (B) sesudah proses fermentasi (Rollando, 2013)

2.6 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa dari suatu campuran menggunakan pelarut tertentu. Tujuan ekstraksi pada penelitian kali ini untuk mendapatkan metabolit sekunder yang terkandung dalam hasil fermentasi fungi dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Pemilihan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi dengan mempertimbangkan kelarutan senyawa target berdasarkan prinsip “like dissolve like”, keamanan, dan biaya (Harborne, 2006).

Berdasarkan campuran media yang digunakan, ekstraksi dibagi menjadi 2 yaitu ekstraksi cair-cair dan ekstraksi padat-cair. Ekstraksi padat-cair adalah ekstraksi yang menggunakan sampel dalam bentuk sediaan padat dan diekstraksi menggunakan pelarut tertentu. Sedangkan ekstraksi cair-cair, sampel yang digunakan dalam bentuk sediaan cair dan diekstraksi dengan pelarut tertentu. Metode ekstraksi cair-cair dikenal dengan istilah partisi cair-cair yaitu metode ekstraksi yang digunakan untuk menarik senyawa tertentu berdasarkan kelarutan senyawa terhadap pelarut yang digunakan. Prinsip ekstraksi cair-cair didasarkan pada kelarutan senyawa terhadap dua pelarut yang tidak saling campur yaitu fase air dan fase organik, yang dapat dipisahkan menggunakan corong pisah (Harborne, 2006).

Secara umum metode ekstraksi dibagi menjadi dua yaitu dengan cara dingin seperti maserasi dan perkolasi serta dengan cara panas seperti soxhletasi dan reflux. Pertimbangan dalam pemilihan metode ekstraksi didasarkan pada ketahanan sampel terhadap panas. Untuk senyawa yang tidak tahan terhadap panas, maka direkomendasikan untuk menggunakan metode ekstraksi dengan cara dingin. Pada penelitian kali ini menggunakan metode ekstraksi dengan cara dingin menggunakan stirer (Balouiri dkk., 2016).

Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan stirer bertujuan untuk memaksimalkan proses pelarutan senyawa dalam media yang digunakan dan mencegah kerusakan senyawa karena proses pemanasan. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini adalah etil asetat sebagai fase organik dan air sebagai fase air. Etil asetat dipilih sebagai fase organik dengan mempertimbangkan bahwa etil asetat merupakan senyawa

yang mampu menarik senyawa metabolit sekunder yang bersifat polar dan non polar diantaranya alkaloid, terpenoid, flavonoid, polifenol, sterol, dan glikosida. Etil asetat adalah senyawa semipolar yang memiliki tingkat toksisitas lebih rendah dibanding kloroform dan diklorometana. Dengan beberapa pertimbangan tersebut, etil asetat dipilih sebagai fase organik pada penelitian ini. Kedua fase cair tersebut diaduk menggunakan bantuan stirer pada erlenmeyer kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah hingga didapatkan dua fase cairan yang tidak saling bercampur (Balouiri dkk., 2016).

Hasil ekstraksi dipindahkan ke dalam corong pisah untuk memisahkan antara fase air dan fase organik. Fase air akan berada di bagian bawah dan mengandung media dan aquadest, sedangkan fase organik akan berada di atas yang mengandung metabolit sekunder. Fase organik ditampung pada wadah untuk diuapkan pelarutnya, sedangkan untuk fase air akan dilakukan replikasi ekstraksi 2-3 kali dengan perbandingan fase air dan fase organik sebanyak 1: 1.

2.7 Metode Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan beberapa metode antara lain metode KLT bioautografi, difusi, dan dilusi. Metode KLT bioautografi adalah metode pengujian aktivitas antibakteri yang dengan prinsip kromatografi. Pada metode ini, plat KLT dimasukkan ke dalam media biakan bakteri. Aktivitas antibakteri digambarkan dengan adanya zona hambat pada plat KLT. Selanjutnya, Metode yang umum digunakan dalam skrining awal aktivitas antibakteri adalah metode difusi. Pada metode ini, senyawa uji diletakkan di atas biakan bakteri sehingga sampel uji akan terdifusi masuk ke dalam media biakan bakteri. Adanya aktivitas antibakteri digambarkan dengan adanya zona bening disekitar sampel. Sedangkan metode dilusi adalah metode uji antibakteri yang bersifat kuantitatif. Berdasarkan volume larutan uji, metode mikrodilusi dibagi menjadi dua yaitu mikrodilusi dan makrodilusi. Volume larutan uji pada mikrodilusi adalah kurang dari 2 mL (satuan mikroliter), sedangkan pada makrodilusi sebanyak 2 mL atau lebih. Parameter dalam metode ini dapat dinyatakan dalam nilai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), *Minimum Inhibitory*

Concentration (MIC), dan *Inhibitory Concentration* (nilai IC₅₀). MBC adalah konsentrasi minimum sampel yang mampu membunuh bakteri sebanyak 99,9%. MIC adalah konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dalam larutan uji yang diamati berdasarkan kekeruhan larutan uji. Sedangkan nilai IC₅₀ adalah konsentrasi sampel yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri sebanyak 50% dalam larutan uji. Ketiga parameter diatas dinyatakan dalam satuan mg/L atau µg/mL. Penelitian kali ini menggunakan metode mikrodilusi dengan volume larutan uji sebesar 1 mL (Balouiri dkk., 2016).

Dalam uji antibakteri diperlukan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif digunakan sebagai kontrol yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Antibiotik adalah kontrol positif yang sering digunakan dalam uji antibakteri. Pemilihan kontrol positif disesuaikan dengan jenis bakteri yang diuji dan mengacu pada antibiotik yang direkomendasikan dalam *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Pada penelitian ini digunakan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini disesuaikan dengan kondisi analisis yang digunakan. Agen antibiotik yang akan diuji, diinokulasi ke dalam suspensi bakteri yang telah disetarakan dengan media *Mc Farland* 0,5 sebanyak 1 mL (Walsh, 2003; CLSI, 2015)..

Pada penelitian kali ini, pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di *microplate 96 well*. Keuntungan dari metode mikrodilusi salah satunya adalah didapatkannya data kuantitatif yang mudah diinterpretasikan menjadi kemampuan aktivitas antibakteri. Pemilihan kontrol positif pada pengujian ini didasarkan pada CLSI dimana pada pengujian aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dapat menggunakan kontrol positif salah satu diantara berikut : gentamisin, piperasilin-tozobaktam, seftazidim, dan tobramisin. Berdasarkan rekomendasi CLSI, salah satu kontrol positif yang direkomendasikan untuk kontrol positif bakteri *Staphylococcus aureus* adalah gentamisin karena gentamisin merupakan antibiotik spektrum luas yang mampu menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal ini yang mendasari pemilihan gentamisin sebagai kontrol positif dalam penelitian ini. (CLSI, 2017).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelusuran dan isolasi fungi tanah muara serta skrining aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* pada penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia, Laboratorium Farmasetika, Laboratorium Biomedik, Laboratorium Analisis Instrumen Fakultas Farmasi dan Laboratorium Biosains Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember dimulai dari bulan Agustus 2019 hingga selesai.

3.3 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etil asetat isolat fungi tanah.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai persen penghambatan dalam uji antibakteri ekstrak etil asetat isolat fungi tanah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan media biakan fungi tanah.
2. Metode pembiakan, isolasi, fermentasi, dan ekstraksi fungi tanah muara.
3. Pembuatan biakan bakteri *Staphylococcus aureus*.
4. Suhu inkubasi bakteri 37° C selama 24 jam.
5. Metode pengujian dan pengamatan tingkat kekeruhan hasil uji antibakteri.
6. Prosedur penelitian.

3.4 Rancangan Penelitian

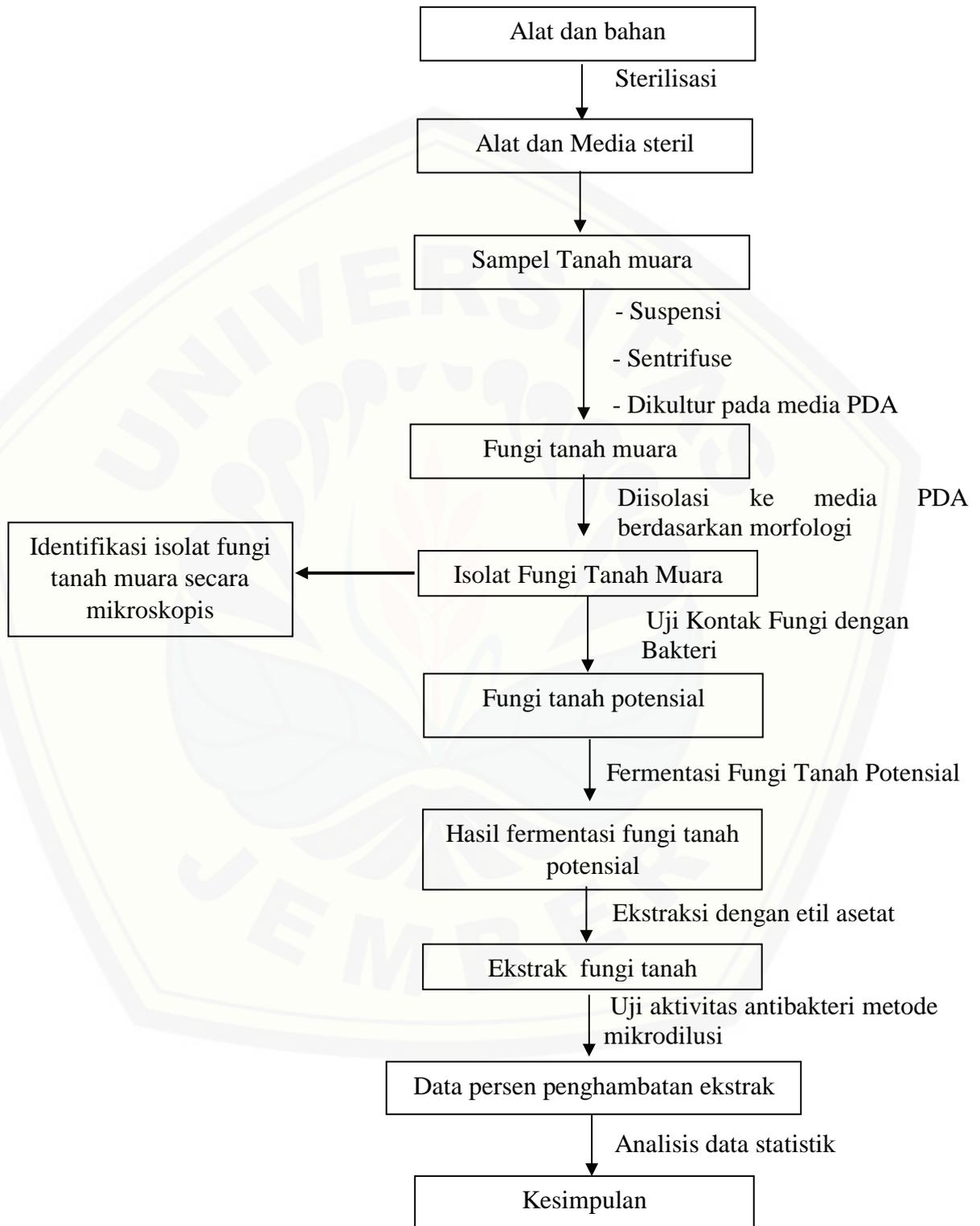
3.4.1 Definisi operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Sampel tanah pada penelitian ini diambil di tanah muara sungai Kampung Kerapu Kabupaten Situbondo dengan menggunakan pipa sepanjang 40 cm.
2. Tanah muara yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah yang berada diperbatasan antara air sungai dengan pantai yang terendam air laut apabila sedang dalam kondisi pasang dan tidak terendam apabila air laut surut serta berada di dekat perakaran bakau.
3. Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan dengan uji kontak langsung antara permukaan media isolat fungi dengan permukaan biakan bakteri untuk mengetahui aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan munculnya zona bening disekitar isolat fungi.
4. Pengujian antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi dalam plate 96 sumuran yang berisi 100 µL tiap sumurannya.
5. Persen penghambatan menunjukkan nilai persen hambatan yang dihasilkan sampel terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, didapatkan dari hasil absorbansi yang diukur dengan *microplate reader* dan dihitung menggunakan rumus yang tertera pada prosedur penelitian.

3.4.2 Skema Prosedur penelitian

Skema percobaan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :



Gambar 3 .1 Skema Penelitian

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Alat

Autoklaf (B-ONE), *Laminar Air Flow* / LAF (THERMO CIENTIFIC SERIES 1300 A2), *shacker inkubator* (B-ONE), *hot plate* (UC-152), vortex (GENE-2), spektrofotometer UV-Vis, mikropipet (SOCOREX), mikroskop, gelas ukur (DURAN), erlenmeyer (SCHOTT DURAN), cawan petri (DURAN), jarum ose, *yellow tip*, pipet tetes, jangka sorong (TRICLE BRAND), batang pengaduk, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kuvet, *microplate reader* (CORONA SH-1000), spatula logam, vial, gelas beker (BOROSIL), aluminium foil, plastik wrap, kain kasa, parafilm.

3.5.2 Bahan

Sampel tanah muara; *water for injection*; aqua demineral (HYDROBATT); *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA); *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA); *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck); *Mueller Hinton Broth* (MHB); infus NaCl 0,9%; air laut; bakteri *Staphylococcus aureus* (HIMEDIA); BaCl₂; DMSO; etil asetat; H₂SO₄; gentamisin; dan alkohol 70% .

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Alat dan bahan yang disterilisasi, dibungkus menggunakan kertas perkamen sebanyak 2 lapis, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan dilakukan proses sterilisasi.

3.6.2 Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Media PDA dibuat dengan menimbang 3,9 gram PDA pada erlenmeyer. Ditambahkan air laut yang sudah disaring sebanyak 100 ml, kemudian dipanaskan menggunakan hot plate dengan suhu 100 ° C hingga mendidih dibantu dengan pengadukan untuk melarutkan media. Mulut erlenmeyer ditutup menggunakan kapas

yang dibungkus dengan kain kasa, dilapisi dengan aluminium foil dan direkatkan dengan parafilm. Kemudian media disterilisasi sesuai prosedur sterilisasi yang dijelaskan sebelumnya. Media PDA yang sudah disterilisasi dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 20 mL, dilakukan pada LAF dengan aliran udara terjaga. Cawan petri direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis, kemudian diberi label.

3.6.3 Pembuatan Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Media PDB ditimbang sebanyak 4,8 gram, dimasukkan dalam erlenmeyer ditambahkan 200 mL aquadest sebagai pelarut. Media dipanaskan di atas hot plate dengan suhu 100 °C sambil diaduk hingga media mendidih. Mulut erlenmeyer ditutup menggunakan kapas yang dibungkus dengan kain kasa, dilapisi aluminium foil dan direkatkan menggunakan parafilm. Media PDB diberi label, kemudian disterilisasi dengan metode panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media PDB siap digunakan untuk fermentasi isolat fungi tanah.

3.6.4 Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA ditimbang 3,8 gram, dimasukkan dalam erlenmeyer. Ditambahkan akua demineral 100 mL, kemudian dipanaskan di atas hotplate dengan suhu 100 °C sampai media mendidih. Media ditutup menggunakan kapas yang dibungkus dengan kain kasa, dilapisi dengan aluminium dan direkatkan menggunakan parafilm. Media MHA disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit. Media MHA yang sudah steril dituang ke dalam cawan petri steril dalam kondisi steril di dalam LAF, lalu direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis. Media MHA pada cawan petri diberi label, dan siap digunakan untuk menumbuhkan bakteri.

3.6.5 Persiapan Sampel Tanah

Sampel tanah muara ditimbang sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam tube, ditambahkan aquadest steril hingga batas 10 ml. sampel dihomogenkan menggunakan vortex. Selanjutnya sampel disentrifus dengan kecepatan 100 rpm selama 15 menit hingga terpisah menjadi 2 fasa yaitu supernatan dan pelet. Supernatan dipipet sebanyak 100 μ L menggunakan mikropipet, dipindahkan ke atas media PDA dan diratakan menggunakan *spreader*. Tahap ini dilakukan pada kondisi steril di dalam LAF dengan aliran udara terkontrol. Cawan petri direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis, lalu diinkubasi pada suhu ruangan $\pm 30^{\circ}\text{C}$ selama 7-14 hari. Pertumbuhan fungi diamati selama proses inkubasi.

3.6.6 Isolasi Fungi Tanah

Isolasi fungi tanah bertujuan untuk memperoleh jamur tunggal dari hasil biakan jamur. Isolasi fungi tanah dilakukan dengan menumbuhkan kembali fungi tanah yang telah tumbuh pada media PDA ke media PDA yang baru. Pengambilan biakan fungi berdasarkan perbedaan morfologi fungi yang diamati secara makroskopis. Fungi dengan morfologi tertentu diambil menggunakan ose lalu ditanam dengan cara digoreskan di atas media PDA baru. Hasil isolasi diinkubasi pada suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$.

Hasil isolasi fungi diamati morfologinya secara makroskopis dan mikroskopis :

a. Pengamatan Isolat Fungi secara Makroskopis

Isolat fungi yang diinkubasi, diamati morfologinya meliputi warna dan bentuknya.

b. Identifikasi Fungi secara Mikroskopis

Isolat fungi yang telah diinkubasi optimal, digoreskan tipis pada *object glass* lalu diberi 1 tetes aquadest dan diberi *cover glass*. Preparat isolat fungi diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x untuk melihat bentuk sel fungi.

3.6.7 Skrining awal Aktivitas Antibakteri

Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan bertujuan untuk mengetahui kemampuan antibakteri dari fungi tanah terhadap bakteri *S. aureus* dengan cara uji kontak langsung antara fungi dengan bakteri. Berikut adalah beberapa tahap skrining awal aktivitas antibakteri :

a. Peremajaan Bakteri *S. aureus*

Biakan bakteri *S. aureus* diambil menggunakan ose, kemudian ditanam dengan cara digoreskan pada media MHA. Cawan petri direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis dan diberi label. Kemudian bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C .

b. Pembuatan Suspensi Bakteri *S. aureus*

Disiapkan 10 mL larutan NaCl steril dalam tube steril. Diambil 1 ose bakteri *S. aureus* kemudian disuspensikan ke dalam 10 mL NaCl steril dan divortex hingga homogen. Diukur absorbansi suspensi menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga mendapatkan absorbansi antara 0,08–0,13 (dibandingkan dengan standar *Mc Farland* 0,5).

c. Skrining Aktivitas Antibakteri

Suspensi bakteri dipipet sebanyak 100 µL diletakkan di atas media MHA kemudian di ratakan menggunakan spreader. Isolat fungi tanah yang sudah berumur 14 hari dilubangi menggunakan sumuran dengan diameter 9 mm. Isolat jamur dengan diameter 9 mm diletakkan di atas biakan bakteri *S. aureus* dengan posisi permukaan fungi kontak langsung dengan permukaan biakan bakteri kemudian diberi label. Media diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37° C . Diamati adanya zona bening disekitar isolat fungi yang kontak dengan bakteri. Hasil zona bening diukur menggunakan jangka sorong dan menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap bakteri.

3.6.8 Fermentasi

Isolat fungi tanah potensial di fermentasi dengan tujuan untuk memperbanyak jumlah sel fungi dan metabolit sekunder yang dihasilkan. Isolat fungi dilubangi menggunakan sumuran dengan diameter 9 mm sebanyak 5 buah, kemudian dimasukkan ke dalam media PDB dan diinkubasi pada *shacker incubator* dengan kecepatan 100 rpm selama 14 hari. Fermentasi fungi dilakukan selama 14 hari bertujuan agar fungi maksimal dalam memperbanyak sel hingga mencapai fase stationer.

3.6.9 Ekstraksi

Ekstraksi bertujuan untuk mengambil hasil metabolit sekunder dari hasil fermentasi fungi tanah. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat adalah jenis pelarut yang dapat menarik metabolit sekunder fungi. Hasil fermentasi fungi tanah disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan media fermentasi dengan fungi. Larutan media fermentasi diukur menggunakan gelas ukur, dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Ditambahkan pelarut etil asetat dengan perbandingan 1:1 terhadap jumlah larutan fermentasi, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan diaduk menggunakan stirer dengan kecepatan 100 rpm selama 15 menit. Proses ekstraksi diulangi sebanyak 2-3 kali partisi. Didapatkan hasil ekstraksi menjadi 2 fasa yaitu fasa etil asetat berada di atas dan fasa PDB di bagian bawah. Kemudian diambil fasa etil asetat dan diletakkan pada wadah kaca dengan permukaan mulut yang lebar. Ekstrak yang terlarut dalam etil asetat diuapkan dalam lemari asam hingga pelarut menguap. Disiapkan vial kosong yang sudah ditimbang, kemudian hasil akhir ekstrak ditimbang pada vial kemudian ditutup dan disimpan untuk digunakan uji aktivitas antibakteri pada tahap selanjutnya.

3.6.10 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah Muara

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *S.aureus* dilakukan dengan metode mikrodilusi. Berikut ini adalah langkah kerja uji aktivitas antibakteri pada penelitian ini :

a. Pembuatan media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB)

Media CAMHB dibuat dengan melarutkan 1,05 gram MHB dengan 50 mL akua demineralata dalam erlenmeyer dan dikocok hingga larut. Kemudian media disterilisasi dalam autoklaf. Media ditambahkan larutan CaCl_2 dan MgCl_2 hingga didapatkan konsentrasi Ca^{2+} dalam media sejumlah 20-25 mg/L dan Mg^{2+} dalam media sejumlah 10-12,5 mg/L (CLSI, 2015). Pembuatan larutan induk CaCl_2 dilakukan dengan melarutkan 0,2775 g dalam 10 mL akua demineral hingga didapat konsentrasi Ca^{2+} dalam larutan induk sebesar 10 mg/ml. Pembuatan larutan induk MgCl_2 dilakukan dengan melarutkan 0,3195 g MgCl_2 dalam 10 mL akua demineral hingga didapat konsentrasi Mg^{2+} sebesar 10 mg/mL. kemudian ditambahkan larutan induk CaCl_2 sebesar 112,5 μL dan larutan induk MgCl_2 sebesar 56,25 μl dalam 50 mL media MHB sehingga didapatkan konsentrasi 22,5 mg Ca^{2+} /L dan 11,25 mg Mg^{2+} /L.

b. Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri *S. aureus* pada stok media MHA diambil menggunakan ose, kemudian digoreskan pada media MHA baru secara aseptis. Cawan petri yang berisi biakan bakteri *S. aureus*, direkatkan menggunakan plastik wrap sebanyak 3 lapis kemudian diinkubasi pada suhu 32° C selama 24 jam di dalam inkubator.

c. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

Standard Mc Farland dibuat dengan mencampurkan 9,95 mL H_2SO_4 , dengan BaCl_2 1% sebanyak 0,005 mL kemudian divortex hingga homogen. Absorbansi campuran diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 625 nm hingga didapatkan absorbansi memasuki rentang 0,08-0,13 (CLSI, 2013).

c. Pembuatan Biakan Bakteri Aktif

Disiapkan 10 mL media CAMHB dalam tube steril, kemudian bakteri *S.aureus* hasil peremajaan diambil sebanyak 1 ose lalu divortex hingga homogen. Diukur absorbansi menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm hingga mencapai rentang 0,08-0,13 sesuai standar Mc Farland 0,5. Kekeruhan pada tingkat absorbansi ini menunjukkan bahwa suspensi mengandung 1×10^8 CFU/mL koloni bakteri (CLSI, 2012).

d. Pembuatan Larutan Kontrol

1) Kontrol Positif

Kontrol positif yang digunakan adalah 4 macam konsentrasi gentamisin yaitu : 0,5; 1; 2; dan 4 mg/mL.

2) Kontrol Negatif

Kontrol negatif pada pengujian kali ini adalah DMSO 1% dalam media CAMHB. DMSO dipipet sebanyak 1 mL dan dilarutkan dalam 100 mL media CAMHB.

e. Pembuatan Larutan Uji

Preparasi larutan uji dilakukan dengan menimbang 100 μ g ekstrak fungi tanah, kemudian dilarutkan dengan DMSO 100 μ L sehingga didapatkan konsentrasi 100ppm larutan uji ekstrak fungi tanah dalam DMSO 1%.

f. Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Proses uji aktivitas antibakteri dilakukan dalam *microplate* 96 secara aseptis di dalam LAF dengan sistem sirkulasi udara terkontrol. Suspensi bakteri dalam CAMHB diencerkan 100 kali dari konsentrasi 1×10^8 CFU/mL hingga didapatkan konsentrasi 1×10^6 . Setiap sumuran diisi dengan 50 μ L suspensi bakteri dalam CAMHB, kemudian

ditambahkan kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan uji masing-masing sebanyak 50 μ L hingga didapatkan konsentrasi bakteri sebesar 5×10^4 .

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fermentasi fungi tanah muara menggunakan metode mikrodilusi terdiri dari campuran 50 μ L suspensi bakteri dalam CAMHB ditambahkan dengan 50 μ L ekstrak dengan konsentrasi sebesar 100 μ g/ml dalam DMSO 1%. Untuk kontrol ekstrak sumuran berisi 50 μ L ekstrak konsentrasi 100 μ g/mL dalam DMSO 1% dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak sumuran berisi 50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μ L suspensi bakteri dalam CAMHB. Kontrol DMSO 1% sumuran berisi 50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol positif sumuran berisi 50 μ L gentamisin konsentrasi 0,5 μ g/mL dan 50 μ L suspensi bakteri dalam CAMHB. Kontrol gentamisin sumuran berisi 50 μ L gentamisin konsentrasi 4; 2; 1 dan 0,5 μ g/ml dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin berisi 50 μ L CAMHB dan 50 μ L suspensi bakteri dalam CAMHB, sedangkan kontrol media sumuran berisi 100 μ L CAMHB.

Semua perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali replikasi menggunakan *microplate* yang sama. *Microplate* yang telah berisi larutan uji, selanjutnya diinkubasi selama 18-24 jam di dalam inkubator dengan suhu 37 °C dan diberik *shaker* sebesar 100 rpm. *Microplate* dibaca dengan *microplate reader* menggunakan gelombang UV 625 nm dan didapatkan data absorbansi. Data absorbansi selanjutnya dimasukkan ke dalam rumus hingga didapatkan nilai persen penghambatan.

Gambar 3.2 adalah desain *microplate* yang digunakan untuk uji antibakteri .

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
B	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
C	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
D	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
E	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
F	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
G	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red
H	Orange	Orange	Orange	Blue	Green	Yellow	Purple	Pink	Grey	Red	Red	Red

Gambar 3.2 Desain *microplate* uji aktivitas antibakteri

Keterangan:

	50 μ l Ekstrak etil asetat fungi tanah dalam DMSO 1 % + bakteri dalam CAMHB 50 μ l
	50 μ l Ekstrak etil asetat fungi tanah atas dalam DMSO 1 % + 50 μ l media CAMHB
	50 μ l Gentamisin + bakteri dalam CAMHB 50 μ l
	50 μ l Gentamisin 50 μ l + media CAMHB 50 μ l
	50 μ l DMSO 1% dalam CAMHB + bakteri dalam CAMHB 50
	50 μ l DMSO 1% dalam media CAMHB + media CAMHB 50 μ l
	50 μ l Media CAMHB + bakteri dalam CAMHB 50 μ l
	100 μ l Media CAMHB

3.6.11. Analisis Data

Pada penelitian ini didapatkan data nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode mikrodilusi dapat dihitung menggunakan rumus berikut :

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

Keterangan :

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

Setelah didapatkan nilai persen penghambatan, dilakukan pengujian statistik untuk adanya hubungan antara nilai persen penghambatan setiap kelompok uji. Data ekstrak beserta nilai persen penghambatan dilihat homogenitasnya. Apabila data homogen, maka dianalisis menggunakan Analisis One Way Anova. Syarat hasil analisis One Way Anova, penyebaran datanya harus normal. Analisis *One Way Anova* dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok uji.

Apabila data tidak homogen ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$ maka dilanjutkan analisis dengan uji Mann Whitney untuk mengetahui kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan bermakna. Parameter yang diamati dari nilai $p < 0,05$ menunjukkan makna bahwa adanya perbedaan signifikan antara kelompok uji tersebut.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara sungai Kampung Kerapu Desa Gundit, Kecamatan Kendit, Kabupaten Situbondo memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.
2. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara yang didapatkan menghasilkan persen penghambatan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan urutan mulai dari yang terbesar yaitu IS-KK-T1 $93,5 \pm 3,8\%$; IS-KK-B1 $88,7 \pm 4,2\%$; IS-KK-B2 $86,8 \pm 5,2\%$; IS-KK-A1 $71,3 \pm 1,6\%$; IS-KK-A2 $17,9 \pm 6,6\%$; IS-KK-T2 $8,1 \pm 0,6\%$.

5.2 Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan fermentasi dan ekstraksi yang lebih banyak terhadap isolat IS-KK-T1 yang memiliki persen penghambatan paling besar namun persen rendemennya paling kecil.
2. Perlu dilakukan identifikasi spesies fungi yang memiliki aktivitas antibakteri.
3. Perlu dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa yang berperan dalam ekstrak isolat fungi terhadap aktivitas antibakteri.
4. Perlu dilakukan isolasi untuk mendapatkan senyawa yang bertanggung jawab dalam aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara.

DAFTAR PUSTAKA

- Alkhulaifi, M. M., A. S. Awaad, H. A. AL-Mudhayyif, M. R. Alothman, S. I. Alqasoumi, dan S. M. Zain. 2019. *Evaluation of antimicrobial activity of secondary metabolites of fungi isolated from sultanate oman soil. Saudi Pharmaceutical Journal*. 27(3):401–405.
- Anwar, S., L. R. Prince, S. J. Foster, M. K. B. Whyte, dan I. Sabroe. 2009. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clinical and Experimental Immunology*. 157(2):216–224.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibnsouda. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : a review \$. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Berk, Z. 2018. Liquid-liquid extraction latest developments in the analysis of heterocyclic amines in cooked foods
- Bibi, Y., S. Nisa, F. M. Chaudhary, dan M. Zia. 2011. Antibacterial activity of some selected medicinal plants of pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11
- Bonev, B. dan J. Hooper. 2008. *Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method*. (March):1295–1301.
- Cazar, M. E., L. Astudillo, dan L. D. P. Naturales. 2005. Antimicrobial butyrolactone i derivatives from the ecuadorian soil fungus aspergillus terreus thorn . var terreus. 1067–1075.
- Davis, W. W. dan T. R. Stout. 1971. *Disc plate method of microbiological antibiotic assay. ii. novel procedure offering improved accuracy. Applied Microbiology*. 22(4):666–670.
- Drews, J. dan J. Drews. 2009. Drug discovery: a historical perspective. *Science*. 287 (5460):1960–1964.

- Fierer, N., A. S. Grandy, J. Six, dan E. A. Paul. 2009. Soil biology & biochemistry searching for unifying principles in soil ecology. *Soil Biology and Biochemistry*. 41(11):2249–2256.
- Gandjar, I., R. A. Samson, A. Oetari, dan I. Santoso. 2002. Pengenalan kapang tropik umum. *Yayasan Obor Indonesia*. 2013.
- Hernández-montiel, L. G., J. Luis, E. Troyo-diéguez, dan C. P. Larralde-corona. 2010. Biocontrol of postharvest blue mold (*penicillium italicum* wehmer) on mexican lime by marine and citrus debaryomyces *hansenii* isolates. *Postharvest Biology and Technology*. 56:181–187.
- Hillel, D. 2008. *Soil Biodiversity*. New York: Academic Press is an imprint of Elsevier. *Soil in the Environment*.
- Irving, W. dan D. Ala'adeen. 2006. *Medical Microbiology*
- ITIS Global dan T. Orrell. 2017. *ITIS Global: The Integrated Taxonomic Information System (Version Apr 2016)*
- Jain, P. and Pundir, R. K. 2011. Effect of fermentation medium , ph and temperature variations on antibacterial soil fungal metabolite production. *Journal of Agricultural Technology*. 7(2):247–269.
- Jawetz, Melnick, & A. 2004. *Mikrobiologi iftdokteran*. 23
- Jeanson, S., J. Floury, V. Gagnaire, dan S. Lortal. 2015. Bacterial colonies in solid media and foods : a review on their growth and interactions with the. *Front Microbiol*. 6:1–20.
- Johnston, H. H. 2010. *The ecology of soil fungi*. *Soil Science Society of America Journal*. 25(1):vi.
- Kalakoutskii, L. V dan N. S. Agre. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriological Reviews*. 40(2):469–524.

- Kuswandi. 2011. *Resistensi bakteri terhadap antibiotika kian meningkat*. Universitas Gadjah Mada
- Lee Taylor, D. dan R. L. Sinsabaugh. 2014. *The Soil Fungi*. Edisi 4. Elsevier Inc. *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*.
- Luc, M. 2015. *A comparison of disc diffusion and microbroth dilution methods for the detection of antibiotic resistant subpopulations in gram negative bacilli*. (March):51.
- Mahizan, N. A., S. K. Yang, C. L. Moo, A. A. L. Song, C. M. Chong, C. W. Chong, A. Abushelaibi, S. H. Erin Lim, dan K. S. Lai. 2019. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules*. July 2019.
- Nanjwade, B. K., S. Chandrashekhara, P. S. Goudanavar, A. M. Shamarez, dan F. V. Manvi. 2010. *Production of antibiotics from soil-isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities*. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9(4):373–377.
- Oktaviantris, F. . 2007. Deteksi bakteri staphylococcus aureus pada susu bubuk skim (skim milk powder) impor. 2.
- Oliveira, D. C., A. Tomasz, dan H. de Lencastre. 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet Infectious Diseases*. 2(3):180–189.
- Pamungkas, F. B. P. 2019. Penelusuran Dan Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Pseudomonas Aeruginosa. Universitas Jember.
- Paul, E. A. 2015. *Soil Microbiology , Ecology , and Biochemistry Edited by*
- Pradesh, U. 2010. *Soil Biology Series Editor Ajit Varma , Amity Institute of Microbial Sciences ,*
- Pepper, I. L. dan T. J. Gentry. 2015. Actinomycete earth environments. (Chapter 19)

- Petit, P., E. M. F. Lucas, L. M. Abreu, dan L. H. Pfenning. 2009. Novel antimicrobial secondary metabolites from a penicillium sp . isolated from brazilian cerrado soil. 12(4)
- Pokhrel, C. P. dan S. Ohga. 2007. Submerged culture conditions for mycelial yield and polysaccharides production by lyophyllum decastes. *Food Chemistry*. 105(2):641–646.
- Pumphrey, B. dan C. Julien. 1996. Fermentation basics. *An Introduction to Fermentation*. (May):1–24.
- Ramirez-Ronda, C. H., R. K. Holmes, dan J. P. Sanford. 1975. Effects of divalent cations on binding of aminoglycoside antibiotics to human serum proteins and to bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 7(3):239–245.
- Raja, M., G. Praveena, dan S. J. William. 2017. Isolation and identification of fungi from soil in loyola college campus, chennai, india. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 6(2):1789–1795.
- RISKESDAS. 2013. Hasil riset kesehatan dasar kementerian ri 2013. *Proceedings, Annual Meeting - Air Pollution Control Association*. 6
- Sabdaningsih, A. 2016. Bioprospecting of Fungi Associated with Cladiella Sp. as Antibacterial-MDR against Acinetobacter Baumannii from Panjang Island Vicinity. 2016
- Saifudin, A. 2014. Senyawa Alam Metabolit Sekunder : Teori, Konsep Dan Teknik Pemurnian. Yogyakarta. 2014.
- Sousa, A. M., I. Machado, A. Nicolau, dan M. O. Pereira. 2013. Improvements on colony morphology identification towards bacterial pro fi ling. 95:327–335.
- Sundari, I. 2010. *IDENTIFIKASI SENYAWA DALAM EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH MERAH (Pandanus Conoideus Lamk.)*. Surakarta

- Taylor, T. A. dan C. G. Unakal. 2018. *Staphylococcus Aureus*. StatPearls Publishing. *StatPearls*.
- Thakur, D., A. Yadav, B. K. Gogoi, dan T. C. Bora. 2007. Isolation and screening of streptomycetes in soil of protected forest areas from the states of assam and tripura , india , for antimicrobial metabolites isolement et criblage de streptomycetes du sol des fore ^ts prote ´ es des e ´ tats d ´ assam et de tripura pour des me ´ tabolites antimicrobiens. 242–249.
- Ukhty, N. 2015. KAPANG endofit laut dari tumbuhan pesisir terong pungo (*solanum* sp.) dan potensinya sebagai antibakteri. *JURNAL PERIKANAN TROPIS*. 2(1)
- Utami, E. R. 2002. 124 antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. 124–138.
- Utami, E. R. 2017. Antibiotika, resistensi, dan rasionalitas terapi. *Sainstis*. 1(4):191–198.
- Wahjono, H. 2007. Peran mikrobiologi klinik pada penanganan penyakit infeksi. *Badan Penerbit Universitas Diponegoro Semarang*. 24.
- WHO. 2015. *World Health Organization*
- World Health Organisation. 2016. Monitoring health for the sdgs. *World Health Statistics*. 1.121.
- Zhang, Y., A. H. Overview, dan T. B. Characteristics. 1943. Mechanisms of antibiotic resistance in the microbial world
- Zhu, F., C. Qin, L. Tao, X. Liu, Z. Shi, X. Ma, J. Jia, Y. Tan, C. Cui, J. Lin, C. Tan, Y. Jiang, dan Y. Chen. 2011. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(31):12943–12948.
- Zulkifli, L., D. Soelistya, dan D. Jekti. 2016. Isolasi bakteri endofit dari sea grass yang tumbuh di kawasan pantai pulau lombok dan potensinya sebagai sumber antimokroba terhadap bakteri patogen 1). 16(2):80–93.



LAMPIRAN**Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Media****1. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)**

Media PDA dibuat dalam 100 mL air laut dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\frac{39 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

$$x \text{ gram} = 3,9 \text{ gram}$$

Media PDA ditimbang sebanyak 3,9 gram dan dilarutkan dalam 100 mL air laut. Masing-masing petri diisi media PDA ± 20 mL.

2. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA dibuat dalam 100 mL aqua demineralisata dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\frac{34 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x \text{ gram}}{100 \text{ mL}}$$

$$x \text{ gram} = 3,4 \text{ gram}$$

Media MHA ditimbang sebanyak 3,4 gram dan dilarutkan dalam 100 mL aqua demineralisata. Masing-masing petri diisi media MHA ± 20 mL.

3. Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Media MHA dibuat dalam 200 mL aqua demineralisata dengan perhitungan sebagai berikut :

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

$$X \text{ gram} = 4,8 \text{ gram}$$

Media MHA ditimbang sebanyak 4,8 gram dan dilarutkan dalam 200 mL aqua demineralisata. PDB dibuat 7 erlenmeyer jadi media PDB yang ditimbang keseluruhan 28,8 gram.

4. Media Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB)

a. Media Mueller Hinton Broth (MHB)

Pembuatan media MHB dibuat dalam 200 mL aqua demineralisata. Dalam pembuatan 21 gram media dibutuhkan 1 L aqua demineralisata.

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

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

Berat media yang digunakan untuk 200 mL aqua demineralisata adalah 4,2 gram.

media CAMHB

b. Pembuatan larutan induk MgCl₂

Bahan = MgCl₂ 6H₂O (Berat molekul = 203,3027 g/mol)

Berat molekul MgCl₂ = 95,211 g/mol

Berat molekul Mg²⁺ = 24,305 g/mol

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

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \text{ yang dibutuhkan} &= \frac{BM \text{ MgCl}_2}{BM \text{ Mg}^{2+}} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{95,211}{24,305} \times 10 \text{ mg/mL} \\ &= 39,123 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{BM \text{ MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}}{BM \text{ MgCl}_2} \times 39,123 \text{ mg/mL} \\ &= \frac{203,3027}{95,211} \times 39,123 \text{ mg/mL} \\ &= 83,539 \text{ mg/mL} \end{aligned}$$

Larutan induk MgCl₂ dibuat dengan melarutkan 835,39 mg MgCl₂ 6H₂O dalam 10 mL aqua demineralisata.

Perhitungan MgCl₂ yang ditambahkan ke dalam media MHB

Konsentrasi yang dibutuhkan dalam media MHB yaitu 11,25 mg Mg²⁺/L. Kation Mg²⁺ ditambahkan dari larutan induk MgCl₂ konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL. Media yang digunakan yaitu sebanyak 200 mL, maka dibutuhkan Mg²⁺ 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.

c. Pembuatan larutan induk CaCl_2

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

Berat molekul MgCl_2 = 95,211 g/mol

Berat molekul Mg^{2+} = 24,305 g/mol

Dibuat larutan induk MgCl_2 dengan konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL

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

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

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

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

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

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

Larutan induk MgCl_2 dibuat dengan melarutkan 83,539 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dalam 10 mL aqua demineralisata.

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 2. Perhitungan Persen Rendemen Ekstrak Isolat Fungi

Kode Isolat	Volume Fermentasi	Bobot (Gram)			Persen Rendemen (%)
		Wadah + Ekstrak	Wadah	Ekstrak	
IS-KK-A1	164	10,8157	10,6145	0,2012	0,123
IS-KK-A2	176	10,5667	10,3788	0,1879	0,107
IS-KK-T1	168	10,413	10,3581	0,0549	0,033
IS-KK-T2	180	10,2752	10,1657	0,1095	0,061
IS-KK-B1	174	10,5004	10,3302	0,1702	0,098
IS-KK-B2	181	10,2459	10,0856	0,1603	0,089

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat sampel tanah}} \times 100\%$$

Lampiran 3. Pembuatan Larutan Uji

1. Larutan Uji Gentamisin

a. 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 dicampur drngan media CAMHB ad 10000 μL sehingga konsentrasi larutan induk gentamisin 100 $\mu\text{g/mL}$.

b. 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 $\mu\text{g/mL}$.

2. Larutan Uji DMSO 1%

$$\frac{X \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 100 \% = 1 \%$$

$$X = 0,1 \text{ ml}$$

Untuk membuat DMSO 1% dipipet 0,1 ml DMSO di add kan sampai 10 ml

3. Larutan Uji ekstrak

Larutan uji ekstrak dibuat dengan konsentrasi 100 µg/mL

$$\frac{1 \text{ mg ekstrak}}{100 \text{ } \mu\text{L DMSO 100\%}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \mu\text{g/mL}$$

Pengenceran larutan ekstrak dalam media CAMHB

$$\frac{50 \text{ } \mu\text{L}}{5 \text{ mL}} \times 10.000 \text{ } \mu\text{g/mL} = 100 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Kode Ekstrak	Berat Ekstrak yang Ditimbang (mg)	DMSO 100% yang ditambahkan (µl)	Konsentrasi Larutan Uji (µg/mL)
IS-KK-A1	1,036	103,6	10000
IS-KK-A2	1,041	104	10000
IS-KK-T1	1,039	103,9	10000
IS-KK-T2	1,043	104,3	10000
IS-KK-B1	1,038	103,8	10000
IS-KK-B2	1,007	100,7	10000

Kode Ekstrak	Jumlah Larutan Uji 1000 µg/mL yang dipipet (µL)	Media CAMHB yang ditambahkan (µL)	Konsentrasi akhir ekstrak (µg/mL)
IS-KK-A1	50	4950	100
IS-KK-A2	50	4950	100
IS-KK-T1	50	4950	100
IS-KK-T2	50	4950	100
IS-KK-B1	50	4950	100
IS-KK-B2	50	4950	100

Lampiran 5. Data Hasil dan Persentase Penghambatan Kontrol Positif, Larutan Uji dan Kontrol Negatif terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*

1. Data hasil absorbansi dan persentase penghambatan gentamisin (kontrol positif) terhadap pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan (%)
	Uji	Kontrol uji	Rerata Kontrol negatif	Rerata Kontrol media	
1	0,133	0,132	0,469	0,138	99,7
	0,139	0,135			98,8
	0,144	0,136			97,6

2. Data hasil absorbansi dan persentase penghambatan DMSO 1% (kontrol negatif) terhadap pertumbuhan bakteri.

Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)	Absorbansi				Penghambatan (%)
	Uji	Kontrol uji	Rerata Kontrol negatif	Rerata Kontrol media	
1	0,469	0,141	0,469	0,138	0,9
	0,459	0,132			1,2
	0,449	0,12			0,6

3. Data hasil absorbansi dan persentase penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara konsentrasi 100 µg/mL terhadap pertumbuhan bakteri.

Kode Fungi	Absorbansi			Penghambatan (%)
	Kelompok Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	
IS-KK-A1	0,565	0,474		72,3
	0,437	0,346	0,459	72,3
	0,620	0,520		69,5
IS-KK-A2	0,615	0,370		25,3
	0,679	0,393	0,459	12,8
	0,761	0,484		15,5
IS-KK-T1	0,388	0,358		90,9
	0,361	0,354	0,459	97,9
	0,330	0,303		91,8
IS-KK-T2	0,609	0,306		7,6
	0,627	0,328	0,459	8,8
	0,578	0,276		7,9
IS-KK-B1	0,493	0,463		90,9
	0,483	0,455	0,459	91,5
	0,485	0,432		83,8
IS-KK-B2	0,415	0,377		88,4
	0,414	0,382	0,459	90,2
	0,413	0,353		81,7

Lampiran 6. Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Antibakteri dengan Program SPSS

1. Uji Normalitas

Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk
	Statistic	df	Sig.	Statistic
PersenPenghambatan A1	,374	3	.	,776
A2	,307	3	.	,903
T1	,342	3	.	,845
T2	,292	3	.	,923
B1	,360	3	.	,808
B2	,309	3	.	,900

Tests of Normality

Ekstrak	Shapiro-Wilk ^a	
	df	Sig.
PersenPenghambatan A1	3	,058
A2	3	,395
T1	3	,226
T2	3	,463
B1	3	,134
B2	3	,386

2. Uji Homogenitas dan Uji LSD

Test of Homogeneity of Variances

PersenPenghambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,423	5	12	,057

ANOVA

PersenPenghambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21775,513	5	4355,103	263,219	,000
Within Groups	198,547	12	16,546		
Total	21974,060	17			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PersenPenghambatan

LSD

(I)	(J)	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak	Ekstrak					

A1	A2	53,5333*	3,3212	,000	46,297	
	T1	-22,1333*	3,3212	,000	-29,370	
	T2	63,3000*	3,3212	,000	56,064	
	B1	-17,3333*	3,3212	,000	-24,570	
	B2	-15,3667*	3,3212	,001	-22,603	
A2	A1	-53,5333*	3,3212	,000	-60,770	
	T1	-75,6667*	3,3212	,000	-82,903	
	T2	9,7667*	3,3212	,012	2,530	
	B1	-70,8667*	3,3212	,000	-78,103	
	B2	-68,9000*	3,3212	,000	-76,136	
T1	A1	22,1333*	3,3212	,000	14,897	
	A2	75,6667*	3,3212	,000	68,430	
	T2	85,4333*	3,3212	,000	78,197	
	B1	4,8000	3,3212	,174	-2,436	
	B2	6,7667	3,3212	,064	-,470	
T2	A1	-63,3000*	3,3212	,000	-70,536	
	A2	-9,7667*	3,3212	,012	-17,003	
	T1	-85,4333*	3,3212	,000	-92,670	
	B1	-80,6333*	3,3212	,000	-87,870	
	B2	-78,6667*	3,3212	,000	-85,903	
B1	A1	17,3333*	3,3212	,000	10,097	
	A2	70,8667*	3,3212	,000	63,630	
	T1	-4,8000	3,3212	,174	-12,036	
	T2	80,6333*	3,3212	,000	73,397	
	B2	1,9667	3,3212	,565	-5,270	

B2	A1	15,3667*	3,3212	,001	8,130	
	A2	68,9000*	3,3212	,000	61,664	
	T1	-6,7667	3,3212	,064	-14,003	
	T2	78,6667*	3,3212	,000	71,430	
	B1	-1,9667	3,3212	,565	-9,203	

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

