



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
PELABUHAN BESUKI SERTA SKRINING AKTIVITAS
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

Oleh:

Mariatul Kibthiyah

NIM 162210101008

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
PELABUHAN BESUKI SERTA SKRINING AKTIVITAS
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:

Mariatul Kibthiyah

NIM 162210101008

BAGIAN KIMIA FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS JEMBER

2020

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ayahanda dan Ibunda tercinta serta segenap keluarga besar yang telah memberi saya doa dan dukungan tiada henti;
2. Guru-guru saya dari TK Al-Mutzfariah, SDN Lalangon 1, SMPN 2 Sumenep, dan SMAN 1 Sumenep 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

“Mulailah dari tempatmu berada, gunakan yang kau punya,
lakukan yang kau bisa”

-Arthur Ashe-

“Karena sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan”

(QS. Alam Nasyroh: 5)



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Mariatul Kibthiyah

NIM : 162210101008

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Pelabuhan Besuki serta Skrining Aktivitas 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, 09 Maret 2020

Yang menyatakan,



Mariatul Kibthiyah

NIM 162210101008

SKRIPSI

**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
PELABUHAN BESUKI SERTA SKRINING AKTIVITAS
ANTIBAKTERI TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa***

Oleh:

Mariatul Kibthiyah

NIM 162210101008

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 Pelabuhan Besuki serta Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*” karya Mariatul Kibthiyah telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Senin 09 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

Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt.
NIP 198504282009121004

Nia Kristiningrum, S.Farm., M.Farm,Apt.
NIP 198204062006042001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Lestya Wulanari, S.Si., Apt., M.Farm.

NIP 197604142002122001

RINGKASAN

Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Pelabuhan Besuki serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*: Mariatul Kibthiyah; 66 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Penyakit infeksi adalah masalah kesehatan di negara berkembang yang kerap menyebabkan kematian di seluruh dunia termasuk Indonesia yang disebabkan salah satunya oleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Penyakit infeksi oleh bakteri dapat diterapi menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik yang kurang tepat telah memberikan kontribusi signifikan terhadap munculnya kasus resistensi yang menyebabkan obat kehilangan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Resistensi tersebut membuat penemuan alternatif antibiotik baru untuk melawan penyakit infeksi akibat bakteri menjadi sangat diperlukan. Salah satu penemuan antibiotik dapat bersumber dari fungi. Penelitian antibakteri dari fungi masih minim dilakukan salah satunya fungi dari tanah muara. Hal ini menunjukkan penelitian antibakteri dari fungi tanah muara masih sangat diperlukan sebagai bentuk pencarian alternatif antibiotik baru.

Berdasarkan latar belakang tersebut, pada penelitian ini dilakukan penelusuran dan isolasi fungi dari tanah muara Pelabuhan Besuki serta menelusuri aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Didapatkan 7 isolat fungi berjenis khamir yang berhasil didapatkan dari sampel tanah muara Pelabuhan Besuki, sampel tersebut kemudian diberi kode IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, IS-PB-B2. Isolat tersebut kemudian diuji antagonis dengan *P.aeruginosa*. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa 7 isolat berpotensi memiliki aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan nilai diameter zona hambat bakteri. Isolat kemudian difermentasi dengan metode *batch fermentation* untuk memperoleh metabolit sekunder fungi. Hasil fermentasi selanjutnya diekstraksi untuk memisahkan fungi dari fase air yang tidak diperlukan dalam penelitian.

Ekstrak yang dihasilkan diuji aktivitas antibakterinya menggunakan metode mikrodilusi untuk menentukan persen penghambatan pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa*. Kontrol positif yang digunakan yaitu gentamisin, sedangkan kontrol negatif ekstrak yaitu DMSO 1% dalam media. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri sampel dengan kode IS-PB-A2 menunjukkan nilai persen penghambatan tertinggi ($84,7 \pm 1,4$ %) sedangkan nilai persen penghambatan terendah dihasilkan oleh sampel dengan kode IS-PB-T2 ($30,5 \pm 3,3$ %). Pengujian aktivitas antibakteri dalam penelitian ini menunjukkan sampel ekstrak fungi tanah yang diisolasi dari tanah muara Pelabuhan Besuki Situbondo dapat dinyatakan berpotensi sebagai antibakteri, namun belum bisa disimpulkan aktivitasnya karena dibutuhkan penelitian lebih lanjut terkait nilai IC_{50} dari masing-masing sampel.

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 Pelabuhan Besuki serta Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*”. 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 jadi panutan dalam hidup penulis;
2. Ibu Lestyo Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Prof. Drs. Bambang Kuswandi, M.Sc., Ph.D. selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing dan memberi semangat serta arahan selama penulis menempuh S1 di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
4. Bapak Ari Satia Nugraha, S.F., GDipSc., M.Sc-Res., Ph.D., Apt. dan Bapak Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc., Apt. selaku dosen pembimbing utama dan anggota yang telah memberikan bimbingan serta arahan sehingga skripsi ini dapat tersusun dengan baik;
5. Bapak Dwi Koko Pratoko, S.Farm., M.Sc., Apt. dan Ibu Nia Kristiningrum S.Farm., M.Farm., Apt selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan kritik, dan saran yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
6. Seluruh dosen dan teknisi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah memberi ilmu, pengalaman, dan motivasi penulis;
7. Ayahanda Hatib, Ibunda Suharyani, Sundari dan Gagas Lazuar Wanabhakti serta anggota keluarga besar Muammar, terimakasih atas doa

dan semangat serta motivasi demi kelancaran dan keberhasilan dalam menempuh studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;

8. Sahabat “Sambat”, Alfi Kamilia H., Amelliya N.H, Sabda K.R, dan Andella R. yang telah setia mendengar keluh kesah dan memberikan semangat kepada penulis.
9. Teman seperjuangan “DUDRG”, khususnya SOIL FUNGI GROUP Arofa, Afrian, Ferina, Ziyan yang telah berjuang bersama dalam penelitian ini dan senantiasa memberi semangat motivasi kepada penulis;
10. Teman seperjuangan “Pesen Kopi”, Jeni J., Tyas P.R., S. Yessika S., Amelia W.A. yang telah memberi dukungan, hiburan, canda dan solusi dalam bertukar pikiran kepada penulis;
11. Teman-teman Fakultas Farmasi Universitas Jember KELAS A dan MORFIN 2016 yang selalu memberikan bantuan, dukungan, serta semangatnya dalam penyusunan skripsi ini;
12. 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. Peneliti sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar skripsi ini menjadi lebih baik.

Jember, 09 Maret 2020

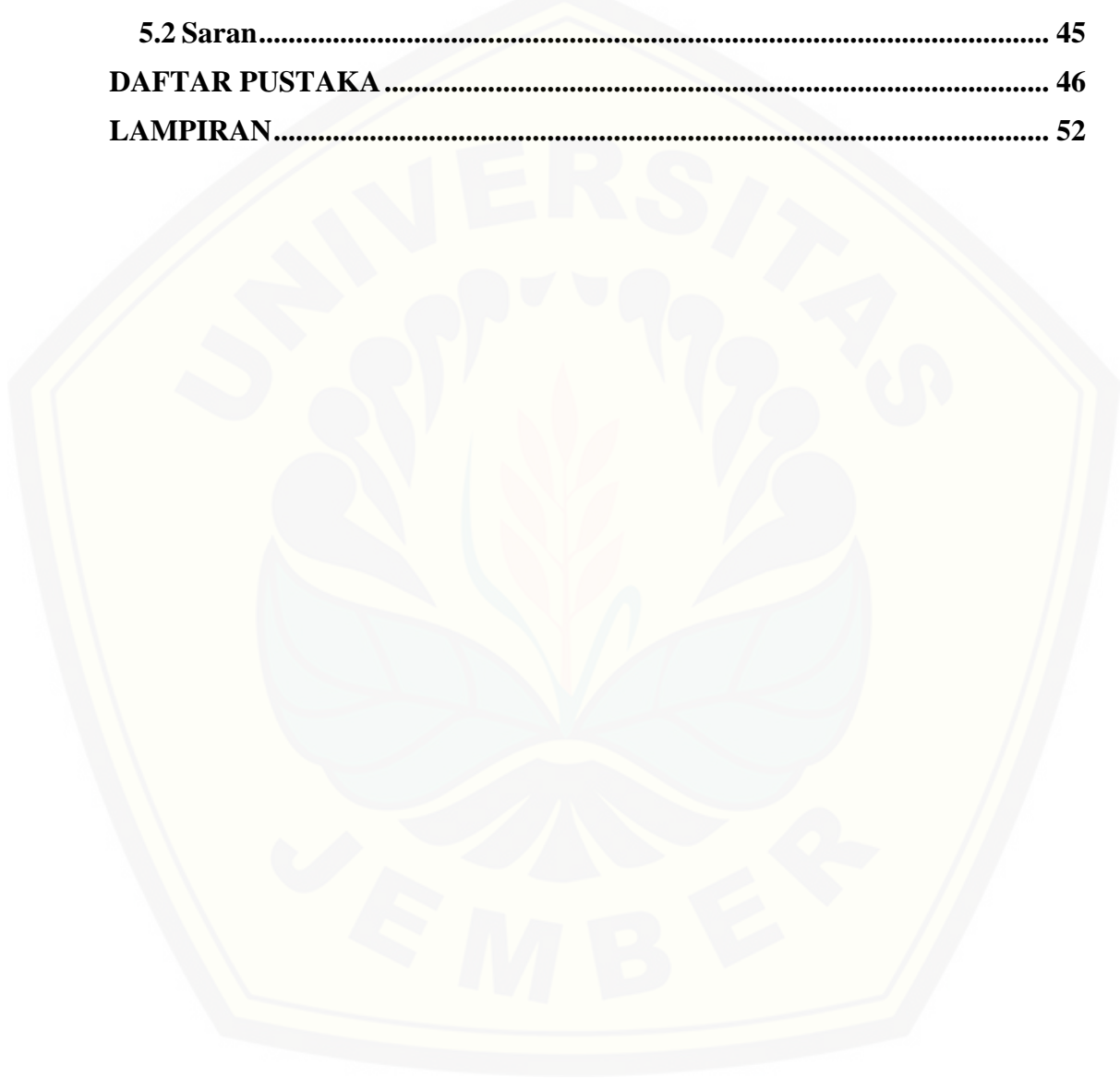
Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PENGESAHAN	vi
RINGKASAN	vii
PRAKATA	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
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 Penyakit Infeksi	5
2.2 Antibiotik	5
2.2.1 Mekanisme Antibiotik	5
2.2.2 Resistensi Antibiotik.....	6
2.3 Fungi Tanah	6
2.3.1 Penelitian terkait Fungi Tanah.....	9
2.4 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah	10
2.4.1 Isolasi	10
2.4.2 Fermentasi.....	10
2.5 Ekstraksi	11
2.6 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.7.1 Klasifikasi	12
2.7.2 Deskripsi	13
2.7 Metode Uji Antibakteri	14

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN	15
3.1 Jenis Penelitian	15
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	15
3.3 Variabel Penelitian	15
3.3.1 Variabel Bebas	15
3.3.2 Variabel Terikat	15
3.3.3 Variabel Terkendali	15
3.4 Rancangan Penelitian.....	16
3.5 Definisi Operasional	17
3.6 Alat dan Bahan	18
3.5.1 Alat.....	18
3.5.2 Bahan	18
3.7 Prosedur Kerja	19
3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	19
3.6.2 Penyiapan Media.....	19
3.6.3 Persiapan Sampel Tanah	20
3.6.4 Pemurnian Fungi Tanah.....	20
3.6.5 Skrining Awal Aktivitas Antibakteri Fungi Tanah.....	21
3.6.6 Fermentasi Isolat Fungi Tanah	21
3.6.7 Ekstraksi Fungi Tanah	22
3.6.8 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah	22
3.6.9 Analisis Data.....	26
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	27
4.1 Pengumpulan Sampel Tanah Muara.....	27
4.2 Pemiakan dan Isolasi Fungi Tanah	28
4.2.1 Pemiakan.....	28
4.2.2 Isolasi	28
4.3 Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis Fungi Tanah	30
4.3.1 Makroskopis.....	30
4.3.2 Mikroskopis	31
4.4 Skrining Awal Fungi Tanah.....	35
4.5 Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Tanah	36

4.5.1 Fermentasi.....	36
4.5.2 Ekstraksi.....	37
4.6 Uji Aktivitas Antibakteri.....	40
BAB 5. PENUTUP.....	45
5.1 Kesimpulan.....	45
5.2 Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	52



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Komponen dinding sel fungi.....	7
Tabel 4.1 Morfologi kultur fungi (A) atas, (T) tengah, (B) bawah berumur 7 hari secara makroskopis.....	30
Tabel 4.2 Morfologi isolat fungi	31
Tabel 4.3 Morfologi sel fungi khamir sampel fungi tanah IS-PB-A1, IS-PB-A2, IS-PB-A3, IS-PB-T1, IS-PB-T2, IS-PB-B1, IS-PB-B2.....	34
Tabel 4.4 Diameter zona hambat sampel atas, tengah, dan bawah	35
Tabel 4.5 Rendemen ekstrak etil asetat fungi tanah.....	39

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Struktur Fungi (Islam dkk., 2017).....8

Gambar 2.2 Khamir (Kiri), Kapang (Kanan) (Disalco dan Reiss, 2018).....9

Gambar 2.3 *Pseudomonas aeruginosa* (Kaiser, 2018).....13

Gambar 3.1 Skema Rancangan Penelitian17

Gambar 3.2 Desain *microplate* ekstrak etil asetat dengan metode mikrodilusi.....25

Gambar 4.1 Pipa untuk pengambilan sampel dengan spesifikasi panjang 40 cm, diameter 2,8 cm, dan berbahan PVC.....27

Gambar 4.2 Hasil kultur fungi selama 7 hari (A) bagian atas, (B) bagian tengah, (C) bagian bawah.....28

Gambar 4.3 Hasil isolasi fungi tanah: (A) IS-PB-A1, (B) IS-PB-A2, (C) IS-PB-A3, (D) IS-PB-T1, (E) IS-PB-T2, (F) IS-PB-B1, (G) IS-PB-B2..29

Gambar 4.4 Pengamatan morfologi sel fungi khamir sampel fungi tanah, perbesaran 1000x, scale bar 20 μ m (A) IS-PB-A1, (B) IS-PB-A2, (C) IS-PB-A3, (D) IS-PB-T1, (E) IS-PB-T2, (F) IS-PB-B1, (G) IS-PB-B233

Gambar 4.5 Proses ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah sehingga terbentuk 2 fase: (1) fase etil asetat (2) fase air.....38

Gambar 4.6 Ekstrak kering etil asetat fungi tanah (A) IS-PB-A1, (B) IS-PB-A2, (C) IS-PB-A3, (D) IS-PB-T1, (E) IS-PB-T2, (F) IS-PB-B1, (G) IS-PB-B239

Gambar 4.7 Diagram persentase penghambatan pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* oleh ekstrak fungi tanah muara dari yang terkecil hingga terbesar. ^(a,b,c) Huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($p>0,05$) antar kelompok uji. Data ditransformasi dengan Ln dan dianalisis menggunakan ANOVA.42

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara berkembang dengan berbagai persoalan yang perlu diatasi terutama terkait kesehatan. Salah satu masalah kesehatan di negara berkembang yang kerap menyebabkan kematian di seluruh dunia adalah penyakit infeksi (Mustaqof dkk., 2015). *World Health Organization* (WHO) melaporkan bahwa pada tahun 2014 penyakit infeksi masih menyerang 9,6 juta orang dan menyebabkan 1,2 juta kematian di seluruh dunia terutama balita (WHO, 2015). Penyakit infeksi disebabkan oleh mikroorganisme patogen, seperti virus, bakteri, parasit atau jamur yang dapat ditularkan dari hewan kepada manusia atau satu orang ke orang lainnya (Nursidika dkk., 2014).

Penyakit infeksi oleh bakteri dapat diterapi menggunakan antibiotik. Antibiotik merupakan salah satu agen untuk memerangi penyakit infeksi dengan menghambat sintesis sel bakteri, sintesis protein, asam deoksiribonukleat (DNA), asam ribonukleat (RNA) (Levy, 2014). Penggunaan antibiotik yang kurang tepat telah memberikan kontribusi signifikan terhadap munculnya kasus resistensi. Resistensi menyebabkan obat kehilangan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri sehingga bakteri menjadi “tahan” dan terus berkembang biak. Resistensi tersebut membuat penemuan alternatif antibiotik baru untuk melawan penyakit infeksi akibat bakteri menjadi sangat diperlukan. (Zaman dkk., 2017).

Secara garis besar bakteri penyebab infeksi dibagi menjadi dua, yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif hanya memiliki membran tunggal, sedangkan gram negatif memiliki membran ganda yang terdiri dari lipopolisakarida dan fosfolipid dengan permeabilitas rendah terhadap beberapa senyawa. Hal tersebut menyebabkan gram negatif lebih berbahaya dibanding gram positif (Kramer dkk., 2019). Salah satu bakteri gram negatif penyebab infeksi adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri patogen ini umumnya menyebabkan infeksi jaringan lunak, infeksi saluran kemih, bakteremia, pneumonia, otitis eksterna, keratitis, otitis media, dan sering dihubungkan dengan

rendahnya sistem imun penderita seperti fibrosis kistik dan neutropenia (Lyczak dkk., 2000). Angka kejadian infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* sekitar 15% pada tahun 2015 dengan perkiraan sebanyak 922.000 terjadi pada balita. Hal tersebut 0,16% lebih tinggi dibandingkan pada tahun 2014 (Kemenkes, 2016). Beberapa penelitian terhadap beberapa rumah sakit di Indonesia menyebutkan bahwa penyebab penyakit infeksi terbanyak disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan kejadian sekitar 3,3-30,8% (Taslim dan Maskoen, 2016). Penemuan alternatif antibiotik efektif untuk gram negatif menjadi harapan baru bagi penderita penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotik tersebut dapat bersumber dari fungi.

Penemuan antibiotik yang diisolasi dari fungi seperti penisilin tidak sengaja ditemukan oleh Sir Alexander Fleming pada tahun 1928. Antibiotik lain seperti sefalosporin yang digunakan sebagai antibiotik secara luas saat ini telah mengalami resistensi. Hal tersebut tentu menjadi masalah kesehatan baru yang memerlukan penanggulangan (Valsan dkk., 2017). Penelitian terkini terkait penemuan aktivitas antibakteri yang diisolasi dari fungi dilakukan oleh Wibowo (2017). Penelitian tersebut menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari fungi yang diisolasi dari tanah berasal dari Shah Alam Malaysia terhadap *B. subtilis* dan *E. coli*. Penelitian lain juga dilakukan oleh Anupama dkk (2017) yang melaporkan adanya aktivitas antibakteri dari *Candida sp.* yang diisolasi dari tanah terhadap bakteri *Staphylococcus sp.* dan *Bacillus sp.* yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat pada media agar menggunakan metode difusi cakram. Salah satu ekosistem tempat tumbuhnya fungi penghasil antibiotik adalah tanah muara.

Muara dicirikan dengan gradien salinitas dalam sistem pesisir semi tertutup yang menghasilkan evolusi sekelompok organisme yang unik dan mampu beradaptasi menggunakan gradien salinitas sebagai keunggulan kompetitif dengan kemampuan osmoregulator yang baik (Elliott dan Whitfield, 2011). Dalam ekosistem muara, fungi dapat berperan dalam penguraian bahan organik organisme mati. Fungi menyerap sebagian hasil penguraian tersebut dan melepaskan bahan-bahan sederhana seperti metabolit sekunder untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan.

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

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fungi yang diisolasi dari tanah muara Pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo. Adapun bakteri uji yang digunakan adalah *Pseudomonas aeruginosa* sebagai. Parameter aktivitas antibakteri yang digunakan persentase hambat ekstrak etil asetat fungi tanah menggunakan metode mikrodilusi.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan ulasan di atas maka permasalahan yang dapat dirumuskan dalam penelitian ini antara lain:

1. Apakah fungi tanah hasil isolasi dari tanah muara mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa*?
2. Berapa persentase hambat ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ?

1.3 Tujuan Penelitian

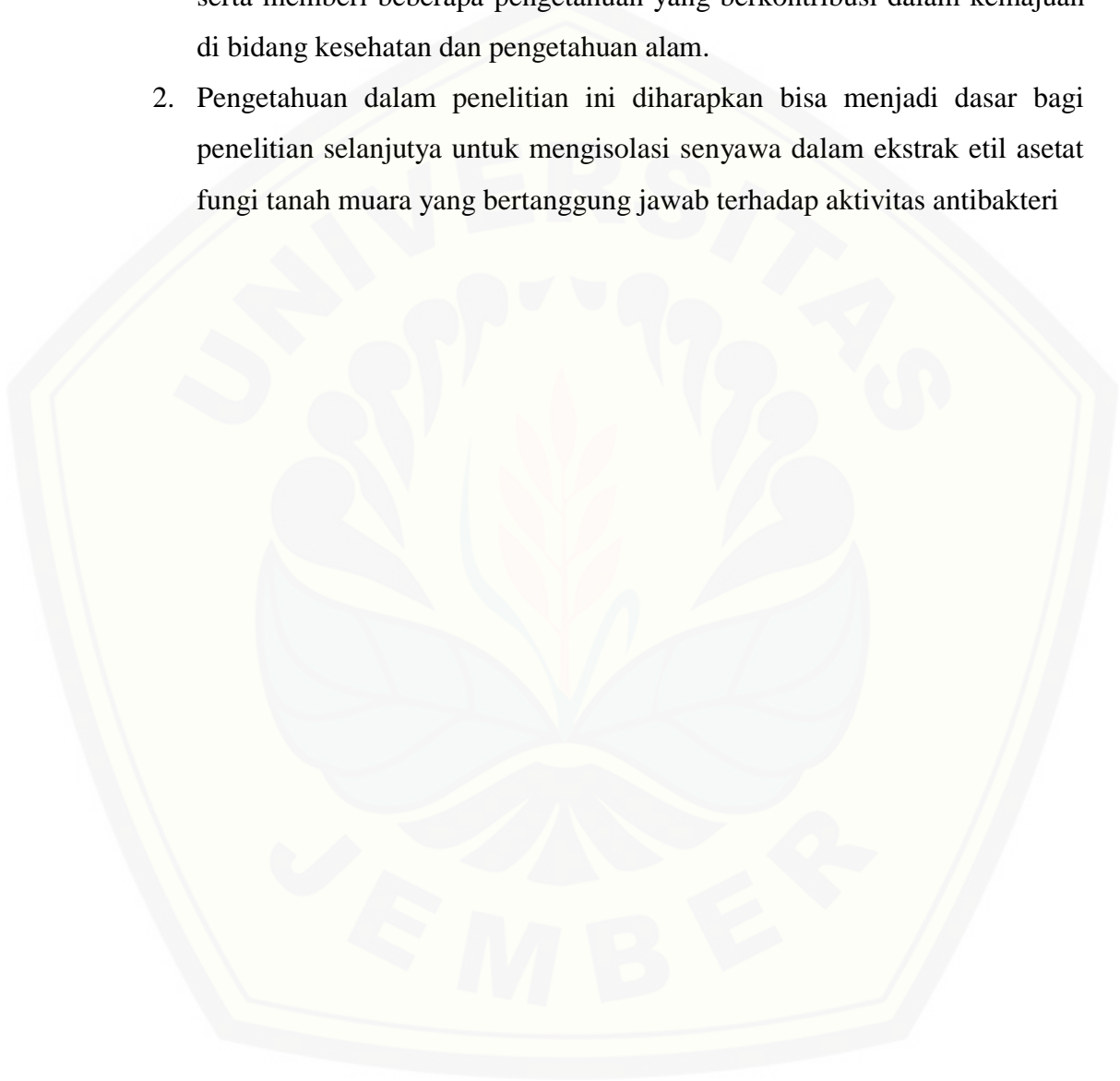
Berdasarkan rumusan masalah yang ada penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri fungi tanah hasil isolasi tanah muara dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.
2. Mengetahui persentase hambat ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang ingin didapatkan dari penelitian ini antara lain:

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi baru terkait potensi aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah terhadap *P.aeruginosa* serta memberi beberapa pengetahuan yang berkontribusi dalam kemajuan di bidang kesehatan dan pengetahuan alam.
2. Pengetahuan dalam penelitian ini diharapkan bisa menjadi dasar bagi penelitian selanjutnya untuk mengisolasi senyawa dalam ekstrak etil asetat fungi tanah muara yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Penyakit Infeksi

Mikroorganisme juga dikenal sebagai kuman merupakan organisme hidup yang sangat kecil tidak bisa dilihat tanpa mikroskop. Kuman dapat ditemukan di berbagai tempat, sebagian hidup di lingkungan, sebagian hidup pada hewan dan lainnya pada manusia. Kuman-kuman ini memenuhi beberapa fungsi penting dan keberadaannya dalam tubuh manusia diperlukan untuk kesehatan (Browline dkk., 2006). Beberapa kuman dapat menyebabkan penyakit infeksi seperti bakteri, virus, jamur, dan parasit. Penyakit infeksi berkembang ketika kuman-kuman yang yang biasanya tidak menghuni tubuh manusia memperoleh akses, melipatgandakan diri dan menyerang jaringan manusia yang kemudian mengakibatkan tanda-tanda dan gejala-gejala seperti kemerahan, panas, bengkak, dan demam. Secara global, infeksi menyebabkan lebih seperlima dari semua kematian dan seperempat dari semua penyakit, secara tidak proporsional mempengaruhi masyarakat miskin dan negara-negara berkembang termasuk Indonesia. (Kemenkes, 2016)

2.2 Antibiotik

2.2.1 Mekanisme Antibiotik

Antibiotik adalah suatu zat yang digunakan untuk melawan infeksi bakteri. Antibiotik dibentuk oleh mikroorganisme sebagai salah satu bentuk upaya bertahan dalam ekosistem (Saga dan Yamaguchi, 2008). Secara garis besar, antibiotik digolongkan menjadi dua jenis yaitu antibiotik yang dapat membunuh patogen atau bakterisida dan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan patogen atau bateriostatik (Hamburg, 2013). Di Indonesia antibiotik banyak digunakan tidak hanya untuk pengobatan infeksi akut dan kronis, tetapi juga digunakan sebagai profilaksis. Antibiotik bekerja berdasarkan beberapa mekanisme diantaranya: (1) merusak membran sel dengan mengganggu permeabilitas membran selektif yang menyebabkan ion hilang dan gradien ion

seluler terdistorsi, sehingga organisme mengalami kerusakan sel dan kematian, (2) menghambat sintesis senyawa biologis metabolik, (3) menghambat sintesis asam nukleat, (4) menghambat sintesis protein, dan (5) merusak dinding sel bakteri melalui penghambatan sintesis dinding sel, degradasi struktur dan fungsi dinding sel, serta pembentukan cincin β -lactam (Kirmusaoğlu dkk., 2019).

2.2.2 Resistensi Antibiotik

Resistensi didefinisikan tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri seiring pemberian antibiotik dalam dosis tertentu atau dengan kadar hambat minimalnya. Kondisi resistensi ini terjadi ketika bakteri menjadi kebal sehingga obat atau zat yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri kehilangan efektivitasnya (Kirmusaoğlu dkk., 2019). Resistensi antibiotik dibagi menjadi tiga kategori utama: resistensi intrinsik, adaptif dan resistensi yang didapat. Resistensi intrinsik terjadi akibat permeabilitas dinding sel bakteri yang rendah sehingga membatasi penyerapan antibiotik. Resistensi adaptif terjadi sebagai akibat dari pemicu lingkungan misalnya perubahan konsentrasi nutrisi atau tingkat sub-inhibitor antibiotik, sedang resistensi yang didapat terjadi akibat mutasi kromosomal atau akibat transfer gen. MDR merupakan resistensi yang terjadi terhadap dua atau lebih obat, sedangkan *Cross Resistance* merupakan resistensi terhadap suatu obat dan diikuti oleh obat lain yang belum pernah dipaparkan (Nikaido, 2009).

2.3 Fungi Tanah

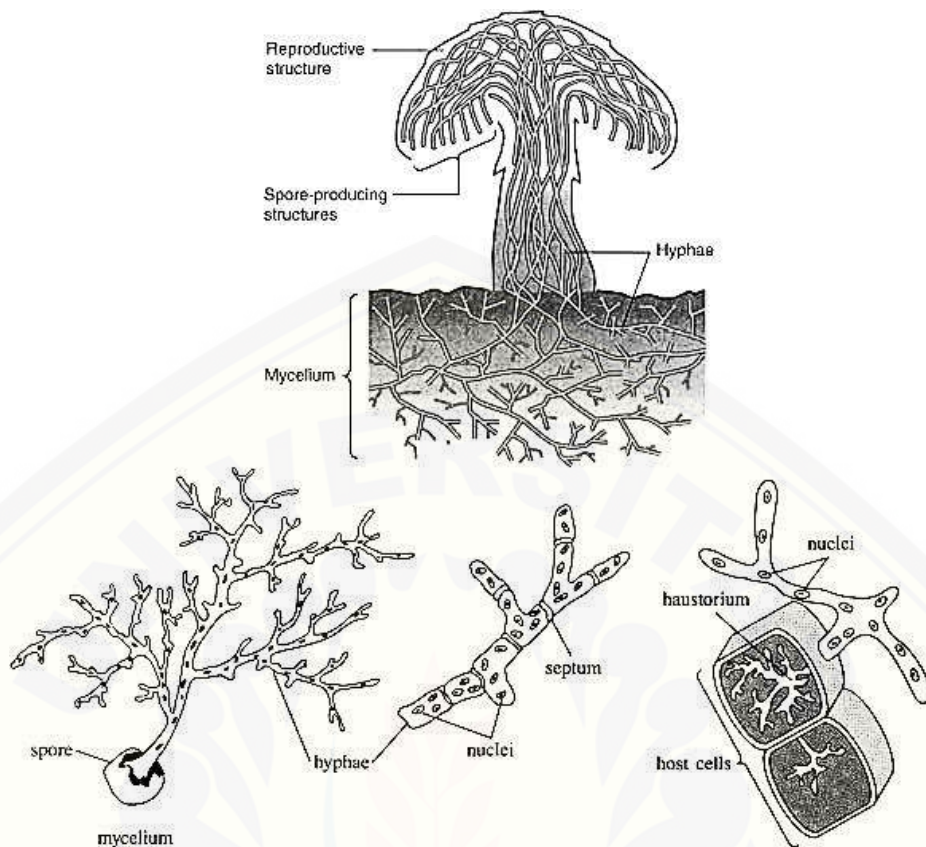
Fungi adalah kelompok organisme eukariotik. Sel fungi dienkapsulasi oleh matriks ekstraseluler dan dinding sel sebagai pelindung dari tekanan osmotik lingkungan serta mempertahankan bentuk sel. Dinding sel fungi merupakan lapisan fleksibel yang terdiri dari glikoprotein dan polisakarida. (Samanta, 2015). Beberapa komponen dinding sel fungi ditunjukkan oleh Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komponen dinding sel fungi

Kategori dinding sel	Golongan Taksonomi	Jenis Fungi
<i>Cellulose-glycogen</i>	Acrasiales	Pseudoplasmodia
<i>Cellulose-glucan</i>	Oomycetes	<i>Biflagellate zoospores</i>
<i>Cellulose-chitin</i>	Hypochytridiomycetes	<i>Anteriorly uniflagellate zoospores</i>
<i>Chitosan-chitin</i>	Zygomycetes	<i>Zygosporos</i>
<i>Chitin-glucan</i>	Chytridiomycetes	<i>Posteriorly uniflagellate zoospores</i>
	Ascomycetes	<i>Septate hyphae, ascospores, basidiospores</i>
	Deuteromycetes	<i>Septate hyphae</i>
<i>Mannan-glucan</i>	Saccharomycetes	<i>Yeast cell, ascospore</i>
	Cryptococcaceae	<i>Yeast cell</i>
<i>Mannan-chitin</i>	Sporobolomycetaceae	<i>Yeast cell, ballistospores</i>
	Rhodotorulaceae	<i>Yeast (carotenoid pigment)</i>
<i>Polygalacturosamine-galactan</i>	Trichomycetes	<i>Heterogenos group</i>

(Sumber: Leung dkk., 2006)

Tanah mengandung CO₂ dan nitrogen yang berfungsi sebagai reservoir bagi fungi. Fungi juga dapat mengubah kualitas tanah melalui dekomposisi bahan organik, daur ulang nutrisi dan kontrol biologis (Stefanis dkk., 2013). Fungi tanah dapat mengubah bahan organik mati menjadi karbon dioksida dan asam organik yang sangat penting dalam pertahanan nutrisi dalam tanah. Fungi mampu mendegradasi selulosa, protein, dan lignin, tahan terhadap kerusakan serta dapat menghancurkan kayu keras yang ada didalam tanah. Produk samping asam organik yang dihasilkan fungi membuat tanah menjadi tahan terhadap degradasi. Fungi membutuhkan nutrisi (karbon, nitrogen, vitamin, elemen mineral, serta ketersediaan enzim) dan kondisi lingkungan seperti nilai pH serta suhu yang sesuai sekaligus oksigen untuk tumbuh dan bereproduksi (Haro dan Benito, 2019).

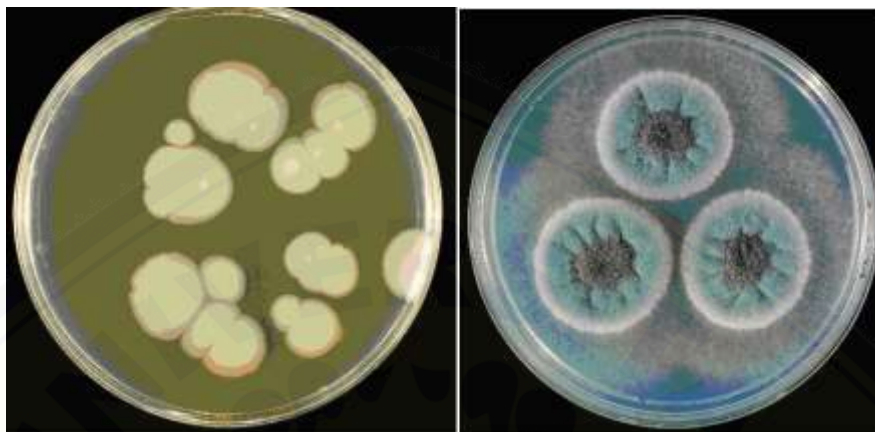


Gambar 2. 1 Struktur Fungi (Islam dkk., 2017)

Fungi dapat menghasilkan berbagai produk alami, salah satunya metabolit sekunder. Produksi metabolit sekunder memerlukan energi dan sejumlah besar karbon serta nitrogen. Metabolit sekunder diklasifikasikan menjadi beberapa kelompok, diantaranya peptida nonribosom dan senyawa yang berasal dari asam amino, poliketida dan senyawa yang berasal dari asam lemak, terpen, serta alkaloid indol. Antibiotik yang dihasilkan dari fungi banyak digunakan dalam kemoterapi seperti penisilin, sefalosprin, asam fusidat yang memiliki aktivitas antijamur dan antibakteri (Dobashi dkk., 1998).

Berdasarkan tipe sel, fungi dibagi menjadi tiga jenis yaitu khamir (*yeast*), kapang (*mold*), dan fungi dimorfisme. Khamir merupakan jenis fungi mikroskopik uniseluler yang berkembang biak dengan pelepasan sel tunas dari sel induk, sedangkan kapang adalah fungi multiseluler, berfilamen, non motil, dan terdiri dari thallus. Thallus tersusun dari filamen yang bercabang membentuk hifa. Khamir biasanya terbentuk ketika fungi hidup sebagai patogen dan kapang

terbentuk ketika fungi hidup sebagai saprofit. Pada kondisi tertentu fase khamir dapat berubah menjadi fase kapang, dan fungi yang dapat hidup dalam dua morfologi tersebut dinamakan fungi dimorfisme (Campbell dkk., 2003).



Gambar 2. 2 Khamir (Kiri), Kapang (Kanan) (Disalco dan Reiss, 2018)

2.3.1 Penelitian terkait Fungi Tanah

Metabolit sekunder yang dihasilkan oleh fungi tanah telah diteliti memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri. Bukti terkait aktivitas antibakteri metabolit fungi ditunjukkan oleh beberapa penelitian terkini. Zhai Ming dkk (2016) menunjukkan 6 hasil isolasi dari fungi tanah dengan spesies sama dan umur yang berbeda dinyatakan aktif terhadap *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium perfringens*, *Micrococcus tetragenus*, *Staphylococcus aureus* serta *Escherichia coli*. Pada tahun yang sama Abneuf dkk (2016) juga menyatakan 5 ekstrak dari 27 ekstrak hasil fermentasi fungi tanah Pulau Deception dan Teluk Wilhelmina dinyatakan aktif terhadap *P.aeruginosa* dan *E.coli*. Anupama (2017) menyatakan 6 fungi dengan spesias berbeda yang diisolasi dari tanah di India aktif terhadap *Staphylococcus sp.* dan *Bacillus sp.* Wibowo dkk (2017) juga melaporkan bahwa 3 isolat fungi dari total 5 isolat yang diisolasi dari tanah Shah Alam Malaysia aktif terhadap *Bacillus subtilis* dan *E.coli*.

2.4 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah

2.4.1 Isolasi

Isolasi fungi merupakan pemisahan atau pemindahan fungi tertentu dari mikroorganisme lainnya sehingga diperoleh kultur atau biakan murni. Salah satu teknik isolasi adalah transfer langsung dengan memindahkan fungi pada media kultur menggunakan jarum inokulasi ke dalam media kultur yang baru (Chandrasekar dkk., 2014). Media kultur memungkinkan fungi untuk mengekspresikan kemampuan metabolit sekundernya. Berdasarkan komposisinya media kultur dibagi menjadi dua yaitu alami dan sintesis. Beberapa jenis media kultur alami yang banyak digunakan untuk pertumbuhan fungi seperti agar kentang atau *Potato Dextrose Agar* (PDA), ekstrak malt, dan media air laut. PDA merupakan media yang direkomendasikan untuk mendukung pertumbuhan fungi karena mengandung pati kentang dan dekstrosa serta digunakan untuk pertumbuhan jamur sejak awal abad ke-20. Pati kentang dalam PDA dapat dipecah menjadi gula oleh fungi yang berfungsi sebagai sumber karbon dan energi. Kentang menyediakan unsur nitrogen, enzim, vitamin dan mineral yang memungkinkan pertumbuhan fungi secara efisien (Swapna dan Lalchand, 2016). Kondisi pH PDA yang rendah sekitar 3,5 dengan asam tartarat steril dapat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga meminimalisir terjadinya kontaminasi pada media kultur fungi. PDA adalah media sederhana yang telah terbukti bekerja dengan baik untuk menghasilkan metabolit aktif baru (Murray dkk., 2016).

2.4.2 Fermentasi

Fermentasi fungi adalah suatu proses yang dapat menghasilkan bioproduk melalui kultur massa fungi berupa metabolit primer, metabolit sekunder, enzim dan sel fungi utuh. Fermentasi dapat dilakukan dengan tiga macam metode yaitu *batch fermentation*, *fed-batch fermentation*, dan *continuous fermentation*. *Batch fermentation* disebut sebagai fermentasi sistem tertutup yang dilakukan dengan menginokulasi larutan *nutrient* fermentor dengan mikroorganisme secara bersamaan tanpa penambahan substrat selama fermentasi berlangsung dan pengambilan produk dilakukan ketika proses fermentasi selesai (Burke dkk.,

2013). Penambahan oksigen (untuk mikroorganisme aerob), agen antiform, dan asam atau basa dilakukan untuk mengontrol pH. Komposisi media kultur, konsentrasi metabolit berubah secara konstan akibat metabolisme sel. Ketika nutrisi semakin menipis dan produk samping terbentuk, pertumbuhan melambat, dan kultur memasuki fase pertumbuhan stasioner (Kavanagh, 2005). *Fed-batch fermentation* merupakan sistem fermentasi dengan penambahan substrat secara bertahap seiring berlangsungnya fermentasi. Substrat ditambahkan dalam konsentrasi kecil pada awal fermentasi dan dilakukan terus-menerus selama fase produksi (Moulton, 2014). *Continuous fermentation* adalah metode fermentasi dengan menambahkan *substrat* ke dalam bioreaktor dan pengambilan produk secara terus menerus ketika konsentrasi produk maksimal atau substrat pembatas mencapai konsentrasi yang hampir konstan. Dari ketiga metode fermentasi *batch fermentation* memiliki keuntungan yaitu pengoperasiannya mudah serta risiko kontaminasi rendah (Lindskog, 2018).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan langkah penting dalam sebagian besar analisis kimia yang mencakup proses penarikan suatu senyawa dari campuran tertentu menggunakan pelarut sehingga analit yang diinginkan terpisah dengan matriks sampel. Pilihan pelarut mempertimbangkan kelarutan analit target, biaya, keamanan, dan masalah lingkungan. Ekstraksi dibagi menjadi dua jenis yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Ketika sampel yang digunakan adalah padatan dan fase yang diperlukan untuk analisis adalah cairan, prosesnya disebut ekstraksi padat-cair (Poole, 2003).

Ekstraksi padat-cair diterapkan berdasarkan penggabungan padatan dengan pelarut yang dapat melarutkan analit melalui agitasi, partisi analit ke dalam fase cair berdasarkan sifat fisika kimia senyawa yang kemudian dapat dipisahkan melalui filtrasi. Tujuan ekstraksi padat-cair yaitu mengekstraksi sebanyak mungkin zat terlarut menggunakan pelarut yang terbatas untuk memperoleh ekstrak yang pekat (Houck dan Siegel, 2015). Ekstraksi cair-cair dikenal juga sebagai partisi adalah jenis metode ekstraksi yang digunakan untuk

mengisolasi komponen campuran berdasarkan kelarutan menggunakan corong pisah. Ekstraksi ini melibatkan distribusi komponen sampel antara campuran dua fase cair tidak saling campur seringkali berupa fase air dan fase organik (Singh, 2006). Ekstraksi cair-cair dapat dilakukan dengan penambahan pelarut pengeksrak ke dalam campuran awal dengan bantuan pengocokan untuk mempercepat waktu kesetimbangan konsentrasi zat yang akan terekstraksi pada kedua lapisan. Tujuan dilakukannya ekstraksi cair-cair yaitu mendapatkan suatu analit dari campuran fase cair dengan pelarut fase cair lainnya (Rezaee dkk., 2006). Pada konsentrasi dan tekanan tetap analit akan terdistribudi dalam jumlah konstan diantara dua pelarut yang tidak saling campur. Molekul-molekul bersifat netral yang berikatan secara kovalen mudah terkstraksi dalam pelarut organik serta dapat berinteraksi dengan pelarut non polar atau semipolar seperti heksana, diklorometana, dan etil asetat. Ekstraksi cair-cair dapat digunakan untuk senyawa yang tidak tahan dan dapat rusak seiring pemanasan karena proses ekstraksi cair-cair tidak melibatkan proses pemanasan dalam tahapannya (Sanson dkk., 2011).

2.6 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

2.7.1 Klasifikasi

Kingdom: Bacteria
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gamma Proteobacteria
Ordo : Pseudomonadales
Famili : *Pseudomonadaceae*
Genus : *Pseudomonas*
Species : *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 2. 3 *Pseudomonas aeruginosa* (Kaiser, 2018)

2.7.2 Deskripsi

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen oportunistik gram negatif aerob obligat berbentuk batang, asporogen, dan monoflagela yang dapat ditemukan di alam, tanah, dan air. *P.aeruginosa* bersifat motil, membentuk koloni besar dan halus dengan permukaan rata meninggi (*fried egg apperance*), beukuran $0,6 \times 2 \mu\text{m}$, tumbuh secara aerobik atau anaerob menggunakan nitrat sebagai akseptor elektron anorganik (Wu dkk., 2005). Bakteri ini tumbuh baik pada suhu 25°C hingga 37°C , dan kemampuan tumbuh pada suhu 42°C dapat membedakan pseudomonas lain dalam kelompok flouresen. *P.aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa, namun dapat bertahan hidup dengan mengoksidasi glukosa dan xilosa (Weihui dkk., 2015). Selain itu, *P.aeruginosa* juga memiliki flagel polar tunggal yang terdiri dari flagelin (FliC) yang memiliki fungsi seperti adhesi, motilitas, dan pembentukan biofilm. Sebagian besar bakteri pathogen ini menghasilkan satu atau lebih pigmen seperti *pyocyanin* (biru-hijau), *pyoverdine* (kuning-hijau dan flouresen), serta *pyorubin* (merah-coklat). Identifikasi secara bikimia terhadap *P.aeruginosa* dapat dilakukan berdasarkan aktivitas indophenol oksidase-positif, sitrat-positif, dan l-arginin dehidrolase-positif (Planet., 2018). *P.aeruginosa* adalah penyebab utama terjadinya infeksi nosokomial dirumah sakit terutama di ICU. *Pyocyanin* yang dihasilkan berkontribusi pada persistensi *P.aeruginosa* pada

paru-paru pasien fibrosis kistik serta dapat mengganggu respirasi sel, pertumbuhan sel epidermis, homeostatis kalsium dan pelepasan prostasiklin dari paru-paru sel endotel. Akumulasi dinukleotida intraseluler pada infeksi sub akut dan kronik mendorong pertumbuhan biofilm dengan membentuk matriks polisakarida ekstraseluler yang memungkinkan bakteri ini dapat bertahan dalam saluran nafas dan terhindar dari mekanisme pembersihan oleh sistem kekebalan tubuh (Lory dkk., 2009).

2.7 Metode Uji Antibakteri Mikrodilusi

Terdapat beberapa metode untuk mengetahui potensi penghambatan sampel terhadap bakteri, diantaranya yaitu metode difusi, KLT bioautografi, dilusi, ATP *bioluminescence*, dan *Flow cytofluorometric*. Penelitian ini dilakukan menggunakan metode dilusi cair dengan volume rendah atau mikrodilusi (Balouiri dkk., 2016).

Metode dilusi memberikan hasil kuantitatif dan menunjukkan jumlah konsentrasi tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Terdapat dua jenis metode dilusi yaitu dilusi padat dan dilusi cair (makrodilusi dan mikrodilusi). Metode dilusi cair melibatkan dua kali lipat pengenceran (seperti 1, 2, 4, 8, dan 16 µg/mL) agen antibakteri dalam media cair dan diinokulasi dengan suspensi bakteri uji terstandarisasi 0,5 McFarland dengan volume minimal 2 mL (makrodilusi) atau menggunakan *microplate 96 well* dengan volume lebih rendah. *Microplate 96 well* selanjutnya diinkubasi dalam kondisi sesuai tergantung bakteri uji. Keuntungan dari metode mikrodilusi adalah diperolehnya data kuantitatif yang menunjukkan seberapa rentan suatu isolat, sistem pengujiannya mudah dipelajari dan dievaluasi serta standarisasi dalam uji coba antar laboratorium lebih mudah (Sandle, 2016). Adapun beberapa kontrol positif menurut *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* yang dapat digunakan pada uji antibakteri pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode mikrodilusi diantaranya gentamisin, seftazidim, tobramisin, dan piperasilin-tazobaktam (CLSI, 2017).

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratories* yang terdiri dari pembiakan dan isolasi fungi tanah rawa pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengumpulan sampel dilakukan di Pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo pada Agustus 2019. Pembiakan dan isolasi fungi tanah serta uji aktivitas anti bakteri dilakukan di Laboratorium DUDRG (*Drug Utilisation & Discovery Research Group*), Laboratorium Kimia Analisis, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember dan Laboratorium RSGM (Rumah Sakit Gigi dan Mulut) Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember mulai bulan September 2019 hingga Januari 2020.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak fungi tanah hasil fermentasi.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase hambat dalam uji aktivitas antibakteri fungi tanah terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan mikrodilusi.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah :

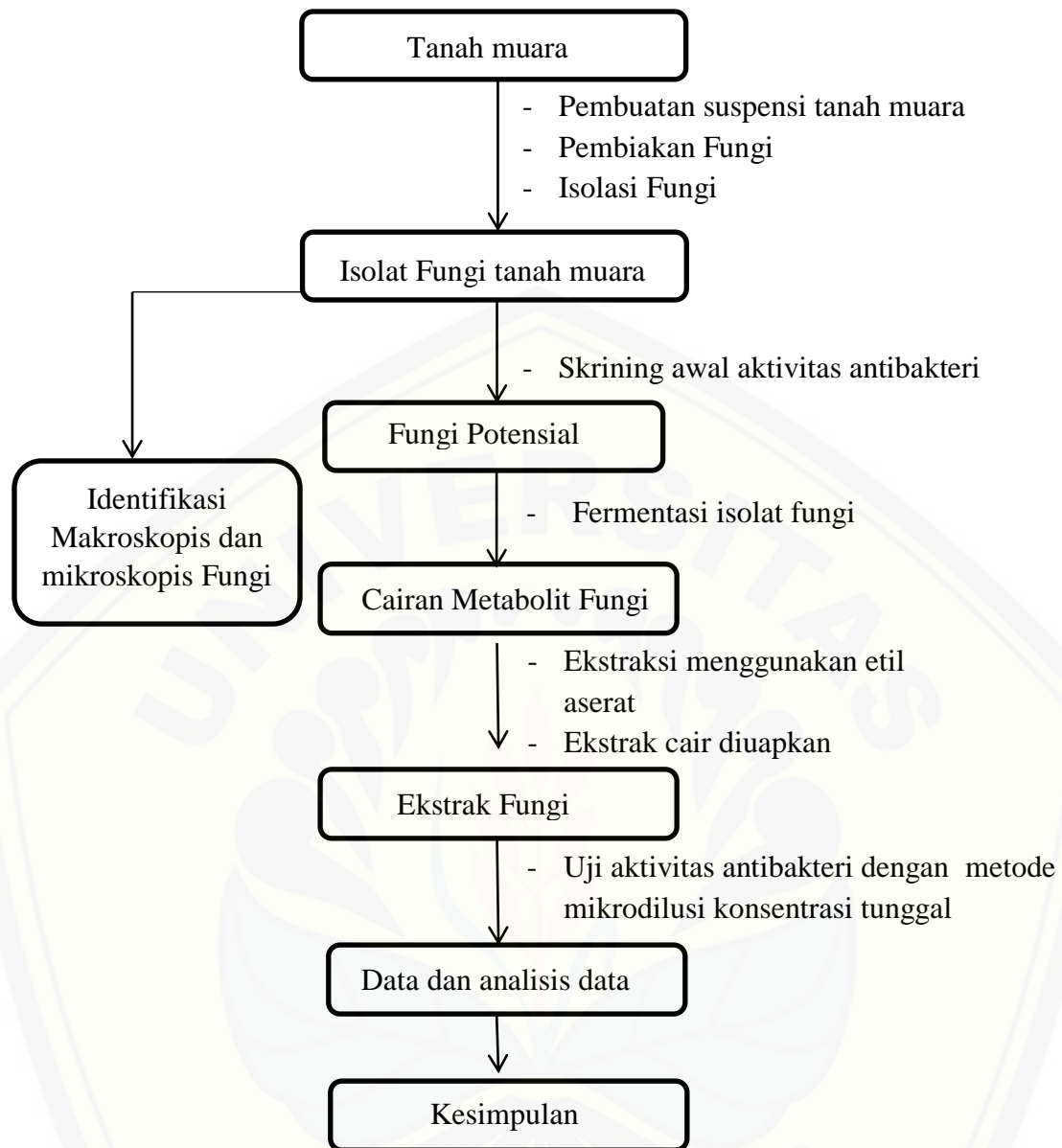
1. Pembuatan media biakan fungi tanah

2. Pembiakan dan isolasi sampel fungi tanah rawa
3. Pembiakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
4. Suhu inkubasi bakteri 37°C selama 18 jam
5. Persentase hambat menggunakan metode mikrodilusi
6. Prosedur penelitian

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini di rancang menggunakan desain post tes kelompok kontrol dengan melakukan pengujian aktivitas antibakteri sampel fungi tanah. Rancangan penelitian ini terbagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dari dua kelompok tersebut dilakukan pengukuran diameter zona hambat yang dihasilkan.

Penelitian ini diawali dengan pembiakan fungi tanah dari pelabuhan Besuki dalam media PDA. Komposisi media PDA yang digunakan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Pamungkas (2019). Selanjutnya, hasil pembiakan fungi tanah diisolasi hingga diperoleh isolat fungi. Setelah isolasi fungi, dilakukan pengontakan isolat fungi terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang selanjutnya diukur diameter zona hambat yang terbentuk. Fungi dengan nilai diameter zona hambat terbesar kemudian diidentifikasi untuk mengetahui identitas fungi sebenarnya. Fungi sisa hasil isolasi di fermentasi untuk selanjutnya diekstraksi dan dilakukan pengambilan fraksi serta diuji kembali hambatnya terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode mikrodilusi.



Gambar 3. 1 Skema Rancangan Penelitian

3.5 Definisi Operasional

1. Tanah muara merupakan tanah ketika air laut pasang tergenang, jika surut tidak tergenang.
2. Sampel tanah yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah muara Pelabuhan Besuki Kabupaten Situbondo dekat dengan bakau. Pengambilan sampel tanah atas (± 5 cm dari permukaan tanah), tengah (± 10 cm dari

permukaan tanah), dan bawah (± 15 cm dari permukaan tanah) dilakukan sekaligus menggunakan 1 pipa paralon serta di simpan dalam *Freezer* sebagai upaya memperlambat pertumbuhan fungi.

3. Skrining awal merupakan uji kontak langsung antara isolat fungi tanah dengan bakteri untuk mengetahui fungi potensial.
4. Pengujian antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah menggunakan metode mikrodilusi *microplate 96 well* dengan konsentrasi ekstrak 100 μ L.
5. Persen penghambatan ditentukan berdasarkan data hasil pengujian kekeruhan pada uji antibakteri yang terbaca oleh *microplate reader*.

3.6 Alat dan Bahan

3.5.1 Alat

Erlenmeyer (SCHOTT DURAN), gelas ukur (DURAN), cawan petri (DURAN), mangkok, jarum ose, pinset, *yellow tip*, *blue tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung sentrifus (BIOLOGIX), vial, spatula logam, *beaker glass* (BOROSIL), *spreader*, pipet tetes, jangka sorong (TRICLE BRAND), *Laminar Air Flow* (THERMO CIENTIFIC 1300 SERIES A2), spektrofotometer UV-Vis (*Genesys 10S*), mikroskop, autoklaf (B-ONE), *centrifuge*, inkubator, *shaker incubator* (B-ONE) *microplate reader* (CORONA SH-100), neraca analitik (OHAUS), *hot plate* (HEIDOLPH), *vortex* (GENE-2), mikropipet (SOCOREX), *microplate flat Bottom 96 well*.

3.5.2 Bahan

Tanah muara yang diperoleh dari Pelabuhan Besuki, Kabupaten Situbondo, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA), *Mueller Hinton Agar* (MERCK), *Mueller Hinton Broth* (HIMEDIA), bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, aquades steril, NaCl, aqua demineralisata (HYDROBATT), air laut pantai Pasir Putih Situbondo, NaCl 0,9%, etanol 70%, etil asetat *pa*, DMSO, BaCl₂, H₂SO₄, dan gentamisin sebagai kontrol positif.

3.7 Prosedur Kerja

3.6.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan disterilisasi terlebih dahulu. Alat dibungkus dengan kertas dua rangkap kemudian di sterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.2 Penyiapan Media

a. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk Pembiakan Fungi

Pembuatan media PDA menggunakan erlenmeyer dengan menimbang 1,17 gram PDA disuspensikan dengan 30 mL air laut yang sudah disaring. Dilanjutkan pelarutan media pada *hoteplate* hingga melarut sempurna. Setelah media larut, disterilisasi menggunakan autoklaf sesuai prosedur yang telah dijelaskan sebelumnya. Media PDA steril dituangkan ke dalam cawan petri steril (ketebalan ± 6 mm) dalam kondisi aseptik dan didinginkan pada suhu ruang menggunakan LAF serta lingkarkan *plastic wrap*.

b. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) untuk Peremajaan Bakteri

Ditimbang 3,4 gram MHA dan ditambahkan *hydrobatt demineralized water* hingga 150 mL dalam erlenmeyer. Campuran diaduk hingga homogen dan dipanaskan di atas *hote plate* suhu 100°C hingga jernih dan larut. Media disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit suhu 121°C. Media steril dituang pada cawan petri dalam kondisi aseptik menggunakan LAF dan didinginkan hingga padat kemudian rekatkan parafilm untuk penyimpanan.

c. Pembuatan Media *Potato Dextrose Broth* (PDB) untuk Fermentasi Fungi

PDB ditimbang sebanyak 3,6 gram dilarutkan dengan *hydrobatt demineralized water* 150 mL dalam erlenmeyer. Campuran diaduk dan dilarutkan di atas *hote plate* hingga jernih. Media disterilisasi menggunakan autoklaf suhu 121°C selama 15 menit menggunakan autoklaf. Media yang sudah steril dituang dalam cawan petri pada kondisi aseptik menggunakan LAF.

d. Pembuatan Media *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) untuk Uji Mikrodilusi

Media MHB dibuat dengan menimbang 1 gram MHB dilarutkan dalam 50 mL aqua demineralisata menggunakan erlenmeyer dan diaduk hingga larut. Selanjutnya media MHB di sterilisasi menggunakan autoklaf 121°C selama 15 menit. Media steril kemudian ditambahkan Mg^{2+} dan $CaCl_2$ steril hingga konsentrasi keduanya berturut-turut 10-12,5 mg/L dan 20-25 mg/L (CLSI, 2012). Larutan induk Mg^{2+} dibuat dengan penimbangan Mg^{2+} sebanyak 0,4 g dalam 10 mL aqua demineralisata hingga diperoleh konsentrasi 10mg/L. Larutan induk $CaCl_2$ dibuat dengan melarutkan 0,25 g dalam 10 mL aqua demineralisata hingga didapatna konsentrasi 10 mg/L. Kemudian dilakukan penambahan larutan induk Mg^{2+} dan $CaCl_2$ kedalam 50 mL media MHB steril masing-masing 56 μ L untuk Mg^{2+} dan 110 μ L untuk $CaCl_2$ sehingga diperoleh konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+} /L dan 22,5 mg $CaCl_2$ /L

3.6.3 Persiapan Sampel Tanah

Sampel tanah yang diperoleh dimasukkan *tube* dan ditambahkan aquadest steril di homogenkan dengan *vortex*. Suspensi tanah tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 15 menit hingga membentuk dua lapisan. Dalam kondisi aseptik lapisan jernih bagian atas suspensi diambil menggunakan mikropipet 100 μ L dan dituang pada media PDA yang telah dibuat sebelumnya, disebar menggunakan *spreader* hingga merata. Cawan petri berisi campuran keduanya ditutup dan diisolasi dengan parafilm untuk selanjutnya dibiarkan tumbuh pada suhu $28\pm 2^\circ\text{C}$ selama 7 hari.

3.6.4 Pemurnian Fungi Tanah

Pemurnian fungi tanah dilakukan dengan mengkultur ulang isolat fungi yang telah di isolasi. Fungi diambil dengan ose dan dipindahkan ke media pertumbuhan baru. Pengambilan fungi kultur didasarkan pada perbedaan morfologi secara visual setelah pertumbuhan fungi. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan dan morfologi fungi dalam media baru setiap

hari sekaligus untuk mengamati ada tidaknya kontaminasi dalam proses pemurnian.

3.6.5 Skrining Awal Aktivitas Antibakteri Fungi Tanah

Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan guna mengetahui kemampuan sampel fungi tanah untuk menghambat pertumbuhan bakteri yang diperoleh dari uji kontak langsung fungi tanah dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Langkah awal membuat suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang sebelumnya telah diinkubasi selama 18-24 jam dalam media MHA dengan penambahan NaCl steril hingga 10 mL. Suspensi dibuat dengan mengambil dua ose bakteri, dihomogenkan dengan *vortex*. Absorbansi suspensi bakteri diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan tingkat kekeruhan dan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 hingga didapatkan absorbansi dengan rentang 0,08-0,13. Setelah absorbansi memenuhi rentang dilakukan pemipetan 100 μ L suspensi bakteri dan di sebar pada media MHA dengan *spreader*.

Isolat fungi pada media PDA dicetak menggunakan sumuran diambil dengan ose kemudian diletakkan pada media yang telah ditumbuhi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri uji yang telah dikontak dengan fungi tanah selanjutnya diinkubasi selama 18 jam pada suhu 35 \pm 2 $^{\circ}$ C menggunakan inkubator. Dilakukan pengukuran nilai diameter zona bening yang terbentuk di sekitar fungi sebagai untuk menunjukkan fungi tanah potensial sebagai antibakteri.

3.6.6 Fermentasi Isolat Fungi Tanah

Fermentasi dilakukan untuk memperoleh metabolit primer dan sekunder fungi tanah potensial atau fungi yang memiliki nilai diameter zona hambat terbesar. Fermentasi dilakukan dengan memasukkan 5 potong bagian kultur fungi yang dicetak dengan sumuran berdiameter 1 cm ke dalam media PDB 150 mL. Campuran keduanya di letakkan pada *shaker incubator* hingga fungi mencapai fase stationer pada hari ke-14.

3.6.7 Ekstraksi Fungi Tanah

Fungi yang telah difermentasi selanjutnya diekstraksi untuk memperoleh metabolit sekunder hasil fermentasi. Sebelumnya dilakukan pemisahan terhadap fungi dan media fermentasi dengan cara disaring. Proses ekstraksi fungi menggunakan penambahan etil asetat sebab etil asetat mampu menarik metabolit sekunder tanpa tercampur media. Larutan media fermentasi ditambahkan etil asetat 1:1 yang dilakukan 2-3 kali partisi. Ekstrak yang terlarut diuapkan dalam lemari asam hingga pelarut menguap sepenuhnya kemudian dilakukan penimbangan bobot ekstrak setelah penguapan sebagai hasil akhir untuk selanjutnya disimpan.

3.6.8 Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah

Pengujian aktivitas antibakteri fungi tanah dilakukan dengan metode mikrodilusi yang mengacu pada protokol standar CLSI M100-S25 (CLSI, 2017). Terdapat beberapa tahap yang perlu dilakukan, yaitu:

a. Peremajaan Biakan Bakteri

Peremajaan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* murni menggunakan media MHA. Pada kondisi aseptik dalam LAF biakan bakteri diambil menggunakan ose kemudian digoreskan sinambung pada media MHA. Selanjutnya, media yang telah digoreskan bakteri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menggunakan inkubator.

b. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

Standar Mc Farlan 0,5 dibuat dengan mencampurkan BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dengan H₂SO₄ sebanyak 9,95 mL sehingga setara dengan 1 x 10⁸ CFU/mL. Campuran keduanya di homogenkan dengan bantuan *vortex*. Selanjutnya, absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 625 nm hingga memenuhi rentang absorbansi 0,08 – 0,13 (CLSI, 2012).

c. Pembuatan Biakan Aktif

Hasil Peremajaan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dibiakkan pada 10 mL media CAMHB untuk metode mikrodilusi hingga didapat suspensi bakteri dan di homogenkan dengan bantuan *vortex*. Selanjutnya, dilakukan pengukuran absorbansi suspensi bakteri tersebut menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk menentukan kekeruhan, dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 hingga didapatkan suspensi bakteri yang memenuhi rentang absorbansi 0,018-0,13. Kekeruhan pada absorbansi tersebut menunjukkan suspensi mengandung 1×10^8 CFU/ mL koloni bakteri (CLSI, 2012). Suspensi yang memenuhi rentang di pipet 100 μ L dan disebar pada media MHA hingga merata.

d. Pembuatan Larutan Kontrol

1) Kontrol positif

Kontrol positif menggunakan 1 konsentrasi gentamisin 1 μ g/ mL yang diperoleh berdasarkan pengenceran larutan gentamisin sulfat injeksi 40 mg/ mL menggunakan media CSMHB.

2) Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 1% dalam media CAMHB.

e. Pembuatan Larutan Uji

Preparasi ekstrak dilakukan dengan menimbang 40 mg ekstrak etil asetat fungi tanah kemudian dilakukan penambahan DMSO 100 μ L. Larutan ekstrak selanjutnya diencerkan hingga didapat konsentrasi 100 μ g/ mL. Larutan ekstrak tersebut diencerkan kembali 100 kali menggunakan media CAMHB.

Preparasi kontrol positif menggunakan gentamisin dibuat dengan mengencerkan gentamisin sulfat injeksi 40 mg/ mL dengan media CAMHB hingga didapat konsentrasi gentamisin 100 μ L. Selanjutnya dilakukan pengenceran kembali terhadap larutan tersebut menggunakan media CAMHB hingga mencapai konsentrasi 1 μ g/ mL. Preparasi DMSO 1% dalam media

CAMHB sebagai kontrol negatif dilakukan dengan pemipetan 100 μL DMSO 100% kemudian ditambahkan media CAMHB sebanyak 9900 μL .

f. Uji Antibakteri dengan Metode Mikrodilusi

Penentuan aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah dilakukan dengan metode mikrodilusi dengan desain *microplate* ditunjukkan pada Gambar 3.1.

Suspensi bakteri dalam media CAMHB (1×10^8 CFU/mL) diencerkan 100 kali menggunakan media CAMHB hingga konsentrasi bakteri menjadi 1×10^6 CFU/mL. Setiap sumuran berisi 50 μL suspensi bakteri dalam media CAMHB. Selanjutnya dilakukan penambahan larutan kontrol positif, kontrol negatif, dan larutan uji masing-masing sebanyak 50 μL . Konsentrasi akhir bakteri dalam tiap sumuran 5×10^4 CFU.



Uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah terdiri dari campuran 50 μL larutan ekstrak dalam DMSO 1% dan 50 μL bakteri (5×10^4 CFU/mL) dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak merupakan campuran 50 μL larutan ekstrak etil asetat konsentrasi 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dalam DMSO 1% dan 50 μL media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak merupakan campuran 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol DMSO 1% yaitu campuran 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μL media CAMHB. Kontrol positif merupakan 50 μL campuran gentamisin konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 50 μL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin adalah campuran 50 μL gentamisin konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan 50 μL media CAMHB. Campuran media CAMHB 50 μL dan bakteri 50 μL merupakan kontrol negatif gentamisin, sedangkan media CAMHB 100 μL merupakan kontrol media. Semua perlakuan triplo. Semua prosedur uji aktivitas antibakteri dilakukan dalam kondisi aseptis dalam LAF.

Microplate

	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* ekstrak etil asetat dengan metode mikrodilusi

Keterangan:

	Ekstrak etil asetat fungi tanah atas dalam DMSO 1 % 50 μ l + bakteri dalam CAMHB 50 μ l (kelompok perlakuan)
	Ekstrak etil asetat fungi tanah bawah dalam DMSO 1 % 50 μ l + media CAMHB 50 μ l (kontrol ekstrak)
	Media CAMHB 100 μ l (kontrol media)
	Media CAMHB 50 μ l + bakteri dalam media CAMHB 50 μ l (kontrol negatif 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)
	Gentamisin 50 μ l + bakteri dalam CAMHB 50 μ l (kontrol positif)
	Gentamisin 50 μ l + media CAMHB (kontrol gentamisin)

3.6.9 Analisis Data

Persentase pertumbuhan bakteri diitung berdasarkan rumus persamaan berikut:

$$\text{Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri} = \left(1 - \frac{(\text{Abs } R - \text{Abs } S)}{(\text{Abs } P - \text{Abs } Q)}\right) \times 100\%$$

(Queve dkk., 2008)

Keterangan:

Abs : Absorbansi

P : Kontrol positif ekstrak etil asetat fungi tanah/gentamisin

Q : Kontrol DMSO 1% atau media CAMHB

R : Larutan uji ekstrak etil asetat fungi tanah/gentamisin

S : Kontrol ekstrak etil asetat fungi tanah/gentamisin

Data hasil percobaan uji aktivitas antibakteri berupa persentase penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dianalisis dengan ANOVA hanya jika data yang diperoleh tergolong normal dan homogen. Jika data tidak normal atau homogen dapat dilakukan teknik transformasi data untuk memenuhi persyaratan uji parametric terkait normal atau homogenitas datanya. Uji *One Way* ANOVA digunakan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan bermakna pada masing-masing kelompok uji. Selanjutnya, dilakukan uji *Least Significant Difference* (LSD) untuk menunjukkan kelompok mana saja yang mempunyai perbedaan bermakna dengan $p < 0,05$ dan tingkat kepercayaan 95%. Jika data yang diperoleh tidak normal dan tidak homogeny meskipun sudah dilakukan transformasi data dapat digunakan uji Kruskal Wallis dengan perbedaan signifikan $< 0,05$ (Sandjaka, 2014).

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dan pembahasan penelitian, kesimpulan yang dapat diambil yaitu :

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

5.2 Saran

Adapun saran untuk penelitian ini yaitu:

1. Perlu dilakukan uji identifikasi fungi lebih lanjut seperti uji filogenik menggunakan metode PCR untuk menentukan spesies fungi khamir
2. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan uji antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara dengan metode mikrodilusi untuk menentukan nilai IC_{50} .
3. Perlu dilakukan penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri lain.
4. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk isolasi senyawa yang berperan sebagai antibakteri.
5. Perlu dilakukan penelitian aktivitas biologis lain dari ekstrak etil asetat fungi tanah muara yang didapat dari Pelabuhan Besuki.

DAFTAR PUSTAKA

- Abneuf, M. A., A. Krishnan, M. G. Aravena, K.-L. Pang, P. Convey, N. . Fauzi, M. R. Idid, dan S. A. Alias. 2016. Antimicrobial activity of microfungi from maritime of antarctic soil. *Czech Polar Report*. 6(2):141–154.
- Anupama, B., C. Sonia, dan K. Kamalpreet. 2017. Production of antibacterial agent from fungi isolated from park soil sample by fermentation under optimized condition. *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences*. 8(1):70–77.
- Ashliha, I. nur. 2014. Karakterisasi khamir dari pulau poteran madura. *Alami, Nue Hidayatul*. 3(2):2237–3520.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. April 2016.
- Browline, J., C. Pecham, J. Waage, C. Lyall, J. Tait, B. Matthew, dan N. Angus. 2006. *Infectious Diseases: Preparing for the Future*. London: Office of Science and Innovation. *Executive Summary*.
- Burke, D. ., P. . Cotter, R. . Ross, dan C. Hill. 2013. *Microbial Production of Bacteriocins for Use in Foods*. Dalam *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes, and Nutraceuticals*. Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- Calvo, A. M., R. A. Wilson, J. W. B. P., dan N. P. Keller. 2002. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Review*. 66(3):447.
- Campbell, N. ., J. B. Reece, dan L. . Mitchell. 2003. *Biologi*. Edisi 5. Jakarta: Erlangga.
- Chandrashaker, M. ., K. S. Pai, dan N. . Raju. 2014. Fungal diversity of rhizosphere soils in different agricultural fields of nanjangud taluk pf mysore district, karnataka, india. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 3(5):559–566.
- CLSI. 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard*. Edisi Ninth Edit.
- CLSI. 2017. *Performance Standarts for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Edisi 27th. Wayne: CLSI supplement M100-S20.

- Communities, T. C. of T. E. 2002. Commission directive 2002/70/ec of 26 July 2002 : establishing requirements determination of the levels of dioxins and dioxin-like pebs in feedingstuffs. *Official Journal of the European Communities*. 15–21.
- Disalco, A. dan E. Reiss. 2018. *Introduction to Micology*. Dalam *Micology*. USA: Microbiology and Immunology On-line.
- Dobashi, K., N. Matsyda, M. Hamada, H. Naganawa, T. Takita, dan T. Takeuchi. 1998. Novel antifungal antibiotics octacosamicins a and b taxonomy, fermentation and isolation, physicochemical properties and biological activities. *J. Antibiotics*. 41:1525–1532.
- Elliott, M. dan A. K. Whitfield. 2011. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 94:306–314.
- Entwistle, E. M. 2016. Anthropogenic nitrogen deposition and decomposer fungi: altered composition and function fosters greater soil carbon storage. *Natural Resources and Environment*
- Fass, R. J. dan J. Bernishan. 1979. Effect of divalent cation cncentrations on the antibiotic susceptibility pf nonfermenters other than pseudomonas aeruginosa. *Antimicrobial Agents AndChemotherapy*. 16(4):434–438.
- Fengxue, X., Z. D. Dong, Welliang, Dai, Y. Jiang, W. Yan, Z. Lv, Y. Fang, dan M. Jiang. 2019. *Biosynthetic Technology and Bioprocess Engineering*. Dalam *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier.
- Hamburg, A. derWissenschaften in. 2013. *Antibiotics Research: Problem and Prespective*. German
- Haro, R. dan B. Benito. 2019. The role of soil fugi in k+ plant nutrition. *International Journal of Molecular Sciences*2. 20
- Houck, M. M. dan J. A. Siegel. 2015. *Separation Method*. Dalam *Fundamental of Forensic Science*. USA: Elsevier.
- Islam, M. R., G. Tudryn, R. Bucinell, L. Schadler, dan R. C. Picu. 2017. Morpology and mechanics of fungal mycelium. *Scientific Reports*. 7
- Jain, P. dan R. . Pundir. 2011. Effect of fermentation medium, ph and temperature variations on antibacterial soil dungal metabolite production. *Journal of Agricultural Technology*. 7(2):247–269.
- Jumiyati, S. H. Bintari, dan I. Mubarak. 2012. Isolasi dan identifikasi khamir secara morfologi di tanah kebun wisata pendidikan universitas negeri semarang. *Biosantifika*. 4(1)

- Kaiser, G. E. 2018. Microbiology Laboratory Manual. faculty.ccbcmd.edu
- Karou, D., A. Savadogo, A. Canini, S. Yamaego, S. Montesao, J. Simpure, dan A. S. Traore. 2005. Antibacterial activity of alkaloids from sida acuta. *African Journal of Biotechnology*. 4(12):195–200.
- Kavanagh, K. 2005. *Fungal Fermentation Systems and Products*. Dalam Fungi: Biology and Applications. John Wiley & Sons.
- Kemenkes, R. 2016. *Indonesian Health Profile*. Jakarta.
- Kırmusaoğlu, S., N. Gareayaghi, dan B. S. Kocazeybek. 2019. *Introductory Chapter: The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance*. Dalam Licensee IntechOpen
- Kramer, T., C. Schroder, M. Behnke, S. Aghdassi, C. Geffer, P. Gastmeirer, dan C. Remschmidt. 2019. Decrease of methicillin resistance in staphylococcus aureus in nosocomial infections in germany-a prospective analysis over 10 years. *The British Infection Association*
- Leung, M. Y. ., C. Liu, C.-M. Koon, dan K. . Fung. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunology Letters*. 105(2):101–114.
- Lindskog, E. K. 2018. *The Upstream Process: Principal Modes of Operation*. Dalam Bipharmaceutical Processing. Development, Desain, and Implementation of Manufacturing Processes.
- Lory, S., M. Merighi, dan M. Hyodo. 2009. Multiple activities of c-di-gmp in pseudomonas aeruginosa. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 53:51–52.
- Lyczak, J., C. Cannon, dan G. Pier. 2000. Pseudomonas aeruginosa infection: lesson from a versatile opportunist. *Microbial Infect*. 2:1051–1060.
- Moulton, G. 2014. *Fed-Batch Fermentation*. Edisi 1st. Woodhead.
- Mu'azzam, K. A. A., M. . Taufiq, N. I. Azlina, S. Noorahzira, dan I. Darah. 2015. Screening of antibacterial activity of endophytic fungi isolated from different leaf age of curcuma mangga using different growth medis. *International Journal of Research In Medical and Health Sciences*. 4(9)
- Mujeeb, F., B. P., dan N. Oathak. 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial acivity, and determination of bioactive components from leaves of aegle marmelos. *BioMed Research International*. 1–11.
- Murray, P. R., K. S. Rosenthal, dan M. A. Pfaller. 2016. *Medical Microbiology*. Edisi 8th. Philadelphia: Elsevier.

- Mustaqof, A., Wiharto, dan E. Suryani. 2015. Sistem pakar untuk mendiagnosis penyakit infeksi menggunakan forward chaining. *Jurnal ITSMART*. 4(1)
- Nagwa, E. A., H. A. Kassem, M. A. Hamed, A. M. El-Feky, M. A. A. Elnaggar, K. Mahmoud, dan M. A. Ali. 2018. Isolation and characterization of the bioactive metabolites from the soil derived fungus *trichoderma viride*. *Journal of Fungi Biology*. 9(1):70–80.
- Nikaido, H. 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev Biochem*. 78:119–146.
- Nitasari, R. A. 2019. *Penelusuran Dan Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Staphylococcus Aureus*
- Nursidika, P., S. Opstari, dan R. Nurul. 2014. Aktivitas antimikrob fraksi ekstrak etanol buah pinang (areca catechu l) pada bakteri methicillin resistant staphylococcus aureus. 2:94–99.
- Pamungkas, F. B. . 2019. *Penelusuran Dan Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Pseudomonas Aeruginosa*
- Paul J. Planet. 2018. *Pseudomonas aeruginosa: etiologic agents of infectious diseases, section a: bacteria, part 3*
- Pepper, I. L. dan T. Gentry. 2015. *Earth Environment*. Dalam *Environmental Microbiology*. Elsevier.
- Poole, C. 2003. New trends in solid-phase extraction. *TrAC Trend Anal. Chem*. 22:362–372.
- Queve, C. L., R. W. Plano, T. Pantuso, dan B. C. Bannett. 2008. Effect of extracts from italian medicinal plants on planktonik growth, biofilm, formation and adherence of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Journal OfEthnopharmacology*. 118(3):418–428.
- Rahardjo, A. P., A. Fauzantoro, dan M. Gozan. 2017. Fractination and characterization of semi polar and polar compounds from leaf extract *<i>nicotiana tabaccun l.</i>* reflux ethanol extraction results. *Chemical Engineering Departement*
- Rezaee, M., Y. Assadi, M. Hosseini, E. Aghae, F. Ahmadi, dan S. Berijani. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*. 1116(1–2):1–9.
- Saga, T. dan K. Yamaguchi. 2008. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Journal of the Japan Medical Association*. 137(No.3):513–517.

- Samanta, I. 2015. *General Characteristics of Fungi*. Dalam Veterinary Microbiology
- Sandjaka, A. 2014. *Aplikasi SPSS Untuk Analisis Data Penelitian Kesehatan*. Yogyakarta: Nuha Medika.
- Sandle, T. 2016. *Antibiotics and Preservative*. Dalam Pharmaceutical Microbiology. Elsevier.
- Sanson, A. L., S. C. R. Silva, M. C. . Martins, A. . Paiva, P. . Maia, dan I. Martins. 2011. Liquid-liquid extraction combined with high performance liquid chromatography-diode array-ultra-violet for simulataneous determination of antineoplastic drugs in plasma. *Brazillian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 47(2)
- SB, L. 2014. The antimicrobial paradox. how miracle drugs are destroying the miracle. *N Engl J Med. York Plenum Press*. 328:1729.
- Sepcic, K., P. Zalar, dan N. Gunde-Cimerman. 2011. Low water activity induces the production of bioactive metabolites in halophilic and halotolerant fungi. *Marine Drugs*. 9:43–58.
- Singh, R. 2006. *Liquid-Liquid Extraction*. Dalam Membrane Science and Technology. Elsevier.
- Stefanis, C., A. Alexopoulos, C. Voidarou, S. Vavias, dan E. Bezirtzoglou. 2013. Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities. *. Folia Microbiol., (Praha)*. 58.(1):61–68.
- Sundari, I. 2010. *IDENTIFIKASI SENYAWA DALAM EKSTRAK ETANOL BIJI BUAH MERAH (Pandanus Conoideus Lamk.)*. Surakarta
- Swapna, P. K. dan P. . Lalchand. 2016. Fungal biodiversity of a library and cellulotyc activity of some fungi. *Indian J Pharm Sci*. 78(6):849–854.
- Taslim, E. T. dan T. T. Maskoen. 2016. Pola kuman terbanyak sebagai agen penyebab infeksi di intensive unit pada beberapa rumah sakit di indonesia. *Anesthesia & Critical Care*. 34(1):56–62.
- Timm, M., L. Saaby, L. Moesby, dan E. W. Hansen. 2013. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology*. 65(5):887–894.
- Valsan, P. V., B. Veeraraghavan, R. Jayaraman, R. Varghese, A. Neeravi, Y. Jayaraman, K. Thomas, dan S. M. Mehendele. 2017. Increasing incidence of penicillin-and cefotaxime resistant streptococcus pneumoniae causing meningitis in india: time for revision of treatment guideline. *Indian J Med Microbio*. 35(2):228–236.

- Volk, W. dan M. Wheeker. 1971. *Basic Microbiology*. Edisi Sixthh Edi. New York: Harper & Row Publisher.
- Weihui, W., J. Yongxin, B. Fang, dan J. Shouguang. 2015. *Pseudomonas Aeruginosa*. USA.
- WHO. 2015. *Indonesia: Who Statistical Profile. World Health Organization on Behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*
- Wibowo, M., E. Julianti, dan R. Muhammad. 2017. Isolation and antibacterial of soil-derived fungi from taman botani negara shah alam malaysia. *Acta Pharmaceutica Indonesia*. 42(1)
- Wu, M., T. Guina, dan M. Brittnacher. 2005. The pseudomonas aeruginosa proteome during anaerobic growth. *J Bacteriol*. 187:8185–8190.
- Zaman, S., N. Hossain, dan S. Yasir Arafat. 2017. Management of newborn infection: knowledge and attitude among health care providers of selected sub-district hospitals in bangladesh. *IJPPH*. 1:127–132.
- Zhai, M.-M., F.-M. Qi, J. Li, C.-X. Jiang, Y. Hou, Y.-P. Shi, D.-L. Di, J.-W. Zhang, dan Q.-X. Wu. 2016. Isolation of secondary metabolites from the soil-derived fungus *clonostachys rosea* yrs-06, a biological control agent, and evaluation of antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64:2298–2306.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Perhitungan Pembuatan Media**1. Pembuatan Media PDA**

Pembuatan 39 gram media membutuhkan 1 L *aquadest*.

$$\begin{aligned} \text{Berat media PDA yang digunakan untuk } 100 \text{ mL } \textit{aquadest} &= \frac{39 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} \\ &= 3,9 \text{ gram} \end{aligned}$$

2. Pembuatan Media PDB

Pembuatan 24 gram media membutuhkan 1 L *aquadest*

$$\begin{aligned} \text{Berat media PDB yang digunakan untuk } 150 \text{ mL } \textit{aquadest} &= \frac{24 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 150 \text{ mL} \\ &= 3,6 \text{ gram} \end{aligned}$$

3. Pembuatan Media MHA

Pembuatan 34 gram media membutuhkan 1 L *aquadest*

$$\begin{aligned} \text{Berat media MHA yang digunakan untuk } 100 \text{ mL } \textit{aquadest} &= \frac{34 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \text{ mL} \\ &= 3,4 \text{ gram} \end{aligned}$$

Lampiran 2. Lampiran Data Rendemen Ekstrak Fungi Tanah**1. Rendemen Ekstrak Fungi Tanah Atas****a. IS-PB-A1**

$$\text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} = 12,042 \text{ gram}$$

$$\text{Berat wadah} = 11,754 \text{ gram}$$

$$\text{Berat ekstrak fungi tanah} = 0,259 \text{ gram}$$

$$\text{Rendemen ekstrak fungi tanah} = \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,259 \text{ gram}}{182 \text{ ml}} \times 100\%$$

$$= 0,142 \%$$

b. IS-PB-A2

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 12,207 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 12,061 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,147 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,147 \text{ gram}}{183 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,08 \%
 \end{aligned}$$

c. IS-PB-A3

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 11,886 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 11,747 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,139 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,139 \text{ gram}}{182 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,764 \%
 \end{aligned}$$

2. Rendemen Ekstrak Fungi Tanah Tengah

a. IS-PB-T1

$$\begin{aligned}
 \text{Berat wadah + ekstrak fungi tanah} &= 10,614 \text{ gram} \\
 \text{Berat wadah} &= 10,340 \text{ gram} \\
 \text{Berat ekstrak fungi tanah} &= 0,274 \text{ gram} \\
 \text{Rendemen ekstrak fungi tanah} &= \frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\% \\
 &= \frac{0,274 \text{ gram}}{182 \text{ ml}} \times 100\% \\
 &= 0,151 \%
 \end{aligned}$$

b. IS-PB-T2

Berat wadah + ekstrak fungi tanah	= 10,569 gram
Berat wadah	= 10,560 gram
Berat ekstrak fungi tanah	= 0,009 gram
Rendemen ekstrak fungi tanah	= $\frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\%$
	= $\frac{0,009 \text{ gram}}{182 \text{ ml}} \times 100\%$
	= 0,005 %

3. Rendemen Ekstrak Fungi Tanah Bawah

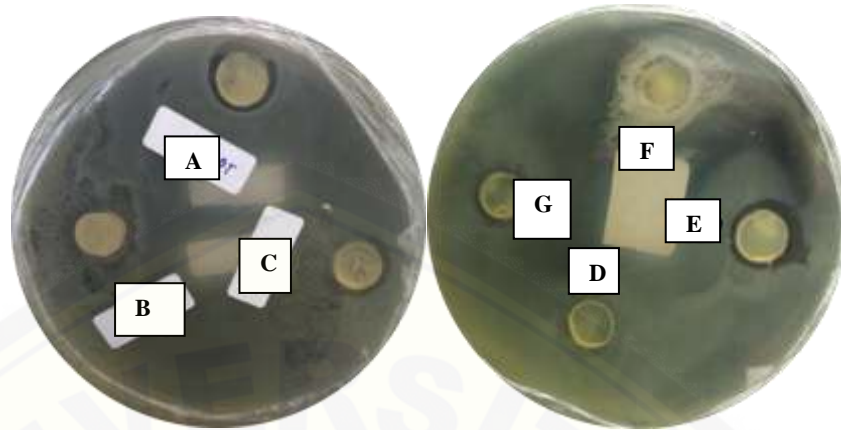
a. IS-PB-B1

Berat wadah + ekstrak fungi tanah	= 10,415 gram
Berat wadah	= 10,323 gram
Berat ekstrak fungi tanah	= 0,092 gram
Rendemen ekstrak fungi tanah	= $\frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\%$
	= $\frac{0,092 \text{ gram}}{181 \text{ ml}} \times 100\%$
	= 0,051 %

b. IS-PB-B2

Berat wadah + ekstrak fungi tanah	= 10,486 gram
Berat wadah	= 10,420 gram
Berat ekstrak fungi tanah	= 0,066 gram
Rendemen ekstrak fungi tanah	= $\frac{\text{Berat ekstrak kering}}{\text{Volume media fermentasi}} \times 100\%$
	= $\frac{0,066 \text{ gram}}{182 \text{ ml}} \times 100\%$
	= 0,037 %

Lampiran 3. Hasil Uji Antagonis Ekstrak Etil asetat Fungi Tanah



Hasil uji antagonis sampel fungi terhadap *P.aeruginosa* (A) IS-PB-A1, (B) IS-PB-A2, (C) IS-PB-A3, (D) IS-PB-T1, (E) IS-PB-T2, (F) IS-PB-B1, (G) IS-PB-B2

Lampiran 4. Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

1. Pembuatan larutan induk $MgCl_2$

Berat molekul $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ = 203,3027 g/mol

Berat molekul $MgCl_2$ = 95,211 g/mol

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

Dibutuhkan larutan induk $MgCl_2$ dengan konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /ml.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } MgCl_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{BM MgCl_2}{BM Mg^{2+}} \times 10 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{95,211 \text{ g/mol}}{24,305 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/ml} \\ &= 39,123 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } MgCl_2 \cdot 6H_2O \text{ dibutuhkan} &= \frac{BM MgCl_2 \cdot 6H_2O}{BM MgCl_2} \times 39,123 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{203,3027 \text{ g/mol}}{95,211 \text{ g/mol}} \times 39,123 \text{ mg/ml} \\ &= 83,539 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

Larutan induk $MgCl_2$ dibuat dengan menimbang 835,39 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ dilarutkan dalam 10 ml aquadest.

2. Pembuatan larutan induk CaCl_2

$$\text{Berat molekul } \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} = 147,01 \text{ g/mol}$$

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

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

Dibutuhkan larutan induk CaCl_2 dengan konsentrasi 10 mg Ca^{2+} /ml.

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{CaCl}_2 \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{CaCl}_2}{\text{BM } \text{Ca}^{2+}} \times 10 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{110,98 \text{ g/mol}}{40,078 \text{ g/mol}} \times 10 \text{ mg/ml} \\ &= 27,691 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Jumlah } \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ dibutuhkan} &= \frac{\text{BM } \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}}{\text{BM } \text{CaCl}_2} \times 27,691 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{147,01 \text{ g/mol}}{110,98 \text{ g/mol}} \times 27,691 \text{ mg/ml} \\ &= 36,681 \text{ mg/ml} \end{aligned}$$

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

3. Perhitungan MgCl_2 yang ditambahkan dalam media

Dibutuhkan konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+} /L dalam media MHB. Penambahan Mg^{2+} dilakukan dengan menggunakan larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /ml. Media yang digunakan adalah sebanyak 150 ml, maka dibutuhkan Mg^{2+} sebanyak:

$$\frac{150 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 11,25 \text{ mg } \text{Mg}^{2+} = 1,69 \text{ Mg}^{2+}$$

Jumlah larutan induk MgCl_2 yang ditambahkan:

$$\frac{1,69 \text{ mg } \text{Mg}^{2+}}{10 \text{ mg } \text{Mg}^{2+}} \times 1 \text{ ml} = 0,169 \text{ ml}$$

Larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /ml ditambahkan sebanyak 0,169 ml ke dalam media MHB 150 ml.

4. Perhitungan CaCl_2 yang ditambahkan

Dibutuhkan konsentrasi 22,5 mg Ca^{2+} /L dalam media MHB. Penambahan Ca^{2+} dilakukan dengan menggunakan larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Ca^{2+} /ml. Media yang digunakan adalah sebanyak 150 ml, maka dibutuhkan Ca^{2+} sebanyak:

$$\frac{150 \text{ ml}}{1000 \text{ ml}} \times 22,5 \text{ mgCa}^{2+} = 3,38 \text{ Ca}^{2+}$$

Jumlah larutan induk yang ditambahkan:

$$\frac{3,38 \text{ mg Ca}^{2+}}{10 \text{ mg Ca}^{2+}} \times 1 \text{ ml} = 0,338 \text{ ml}$$

Larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /ml ditambahkan sebanyak 0,338 ml ke dalam media MHB 150 ml.

Lampiran 4. Perhitungan Konsentrasi Larutan Uji Ekstrak Etil Asetat Hasil Fermentasi Fungi Tanah Muara untuk Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi

Konsentrasi ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara untuk uji aktivitas antibakteri yaitu konsentrasi tunggal sebesar 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Berikut ini tabel hasil penimbangan ekstrak

Kode Fungi	Hasil Penimbangan Ekstrak (mg)	DMSO 100 % yang ditambahkan (μL)	Konsentrasi ($\mu\text{g/mL}$)
IS-PB-A1	1,042	104,2	10000
IS-PB-A2	1,012	101,2	10000
IS-PB-A3	1,023	102,3	10000
IS-PB-T1	1,008	100,8	10000
IS-PB-T2	1,020	102,0	10000
IS-PB-B1	1,040	104,0	10000
IS-PB-B2	1,023	102,3	10000

Selanjutnya ekstrak tersebut diencerkan 100x dengan menggunakan media CAMHB sehingga konsentrasi DMSO dalam larutan ekstrak menjadi 1% dan konsentrasi ekstrak menjadi 100 $\mu\text{g/mL}$ sesuai yang tertera pada tabel di bawah ini.

Kode Fungi	Jumlah yang dipipet (μL)	Media CAMHB yang ditambahkan (μL)	Konsentrasi akhir ekstrak ($\mu\text{g/mL}$)
IS-PB-A1	30	2970	100
IS-PB-A2	30	2970	100
IS-PB-A3	30	2970	100
IS-PB-T1	30	2970	100
IS-PB-T2	30	2970	100
IS-PB-B1	30	2970	100
IS-PB-B2	30	2970	100

Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi Gentamisin untuk Uji Antibakteri

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

Pembuatan larutan induk gentamisin 100 $\mu\text{g/mL}$:

$$\begin{aligned}
 33,185 \text{ mg/mL} \times \text{volume yang dibutuhkan} &= 100 \mu\text{g/mL} \times 10 \text{ mL} \\
 \text{Volume yang dibutuhkan} &= 30,1 \mu\text{L ad } 10 \text{ mL}
 \end{aligned}$$

Pengenceran larutan induk gentamisin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$:

$$100 \mu\text{g}/\text{mL} \times \text{volume yang dibutuhkan} = 1 \mu\text{g}/\text{mL} \times 10 \text{ mL}$$

$$\text{Volume yang dibutuhkan} = 100 \mu\text{L ad } 10 \text{ mL}$$



Lampiran 6. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi *Single Concentration*

1. Hasil absorbansi kelompok ekstrak etil asetat fungi tanah konsentrasi 100 µg/mL

Nama Sampel	Pegujian Kelompok Ekstrak			Kontrol Ekstrak		
	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3
IS-PB-A1	0,688	0,715	0,720	0,352	0,360	0,367
IS-PB-A2	0,674	0,691	0,701	0,571	0,571	0,571
IS-PB-A3	0,675	0,699	0,713	0,524	0,533	0,566
IS-PB-T1	0,638	0,646	0,654	0,435	0,443	0,498
IS-PB-T2	0,754	0,74	0,787	0,236	0,237	0,299
IS-PB-B1	0,659	0,659	0,686	0,511	0,527	0,621
IS-PB-B2	0,911	0,945	0,955	0,485	0,565	0,581

2. Hasil absorbansi gentamisin

Konsentrasi gentamisin (µg/mL)	Konrol Positif			Kontrol Gentamisin		
	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3
1	0,104	0,135	0,141	0,100	0,123	0,123

3. Hasil absorbansi kelompok kontrol

	Kontrol media CAMHB			Kontrol negatif gentamisin			Kontrol DMSO 1%			Kontrol negatif ekstrak		
	Triplo			Triplo			Triplo			Triplo		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Absorbansi	0,103	0,121	0,128	0,825	0,844	0,871	0,098	0,138	0,169	0,840	0,876	0,910

Lampiran 7. Lampiran. Perhitungan Uji Antibakteri

Berikut adalah contoh perhitungan persentase penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah dengan rumus:

$$\text{Persentase penghambatan pertumbuhan bakteri} = \left(1 - \frac{(\text{Abs R} - \text{Abs S})}{(\text{Abs P} - \text{Abs Q})}\right) \times 100\%$$

a. Selisih absorbansi kelompok ekstrak dengan kontrol ekstrak

Nama Sampel	Selisih absorbansi kelompok ekstrak (R) dengan kelompok kontrol ekstrak (S)						Hasil R-S		
	Triplo						Triplo		
	1	2	3	1	2	3			
IS-PB-A1	0,688-0,352	0,715-0,360	0,720-0,367	0,336	0,355	0,353			
IS-PB-A2	0,674-0,571	0,691-0,578	0,701-0,578	0,103	0,113	0,123			
IS-PB-A3	0,675-0,524	0,699-0,533	0,713-0,566	0,151	0,166	0,147			
IS-PB-T1	0,638-0,435	0,646-0,443	0,654-0,621	0,203	0,203	0,156			
IS-PB-T2	0,754-0,236	0,774-0,237	0,787-0,299	0,518	0,537	0,488			
IS-PB-B1	0,659-0,511	0,659-0,527	0,686-0,498	0,148	0,132	0,065			
IS-B-B2	0,911-0,485	0,945-0,565	0,955-0,581	0,426	0,380	0,374			

b. Selisih absorbansi kontrol negatif ekstrak dengan kontrol DMSO 1%

	Selisih absorbansi kontrol negatif ekstrak (P) dengan kontrol DMSO 1% (Q)			Hasil P-Q		
	Triplu			Triplu		
	1	2	3	1	2	3
Absorbansi	0,840-0,098	0,876-0,138	0,910-0,169	0,742	0,738	0,741

c. Persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah terhadap *P.aeruginosa* konsentrasi 100 μ g/mL

Nama Sampel	% Penghambatan bakteri <i>P.aeruginosa</i>			Rata-rata % Penghambatan bakteri <i>P.aeruginosa</i>	SD	CV
	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3			
IS-PB-A1	54,6	52,0	52,3	53,0	1,4	2,7
IS-PB-A2	86,1	84,7	83,4	84,7	1,4	1,6
IS-PB-A3	79,6	77,6	80,1	79,1	1,4	1,7
IS-PB-T1	72,6	72,6	78,9	74,7	3,7	4,9
IS-PB-T2	30,0	27,5	34,1	30,5	3,3	10,9
IS-PB-B1	80,0	82,2	91,2	84,5	5,9	7,0
IS-PB-B2	42,5	48,7	49,5	46,9	3,8	8,2

Lampiran 8. Analisis Data Hasil Analisis Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Fungi Tanah

Tests of Normality

Ekstrak	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk	
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df
LN_Persenhambat T2	.217	3	.	.988	3
B2	.350	3	.	.829	3
A1	.346	3	.	.837	3
A3	.315	3	.	.891	3
B1	.309	3	.	.900	3
A2	.177	3	.	1.000	3
T1	.374	3	.	.776	3

Tests of Normality

Ekstrak	Shapiro-Wilk ^a
	Sig.
LN_Persenhambat T2	.790
B2	.186
A1	.206
A3	.358
B1	.384
A2	.968
T1	.059

a. Lilliefors Significance Correction

Oneway**Descriptives**

LN_Persenhambat

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean
					Lower Bound
T2	3	3.41489	.108208	.062474	3.14609
B2	3	3.84572	.083722	.048337	3.63774
A1	3	3.96942	.026664	.015394	3.90319
A3	3	4.37062	.016794	.009696	4.32890
B1	3	4.43401	.067919	.039213	4.26529
A2	3	4.43942	.015933	.009199	4.39985
T1	3	4.31239	.048337	.027907	4.19232
Total	21	4.11236	.370083	.080759	3.94390

Descriptives

LN_Persenhambat

	95% Confidence Interval for Mean	Minimum	Maximum
	Upper Bound		
T2	3.68370	3.314	3.529
B2	4.05369	3.750	3.902
A1	4.03566	3.951	4.000
A3	4.41234	4.352	4.383
B1	4.60273	4.382	4.511
A2	4.47900	4.424	4.456
T1	4.43247	4.283	4.368
Total	4.28081	3.314	4.511

Test of Homogeneity of Variances

LN_Persenhambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.826	6	14	.051

ANOVA

LN_Persenhambat

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.685	6	.448	116.404	.000
Within Groups	.054	14	.004		
Total	2.739	20			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: LN_Persenhambat

LSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
T2	B2	-.430825*	.050629	.000	-.53941	-.32224
	A1	-.554531*	.050629	.000	-.66312	-.44594
	A3	-.955726*	.050629	.000	-1.06431	-.84714
	B1	-1.019120*	.050629	.000	-1.12771	-.91053
	A2	-1.024531*	.050629	.000	-1.13312	-.91594
	T1	-.897500*	.050629	.000	-1.00609	-.78891
B2	T2	.430825*	.050629	.000	.32224	.53941
	A1	-.123706*	.050629	.028	-.23229	-.01512
	A3	-.524901*	.050629	.000	-.63349	-.41631
	B1	-.588295*	.050629	.000	-.69688	-.47971

	A2	-.593706*	.050629	.000	-.70229	-.48512
	T1	-.466675*	.050629	.000	-.57526	-.35809
A1	T2	.554531*	.050629	.000	.44594	.66312
	B2	.123706*	.050629	.028	.01512	.23229
	A3	-.401194*	.050629	.000	-.50978	-.29261
	B1	-.464589*	.050629	.000	-.57318	-.35600
	A2	-.470000*	.050629	.000	-.57859	-.36141
	T1	-.342969*	.050629	.000	-.45156	-.23438
A3	T2	.955726*	.050629	.000	.84714	1.06431
	B2	.524901*	.050629	.000	.41631	.63349
	A1	.401194*	.050629	.000	.29261	.50978
	B1	-.063395	.050629	.231	-.17198	.04519
	A2	-.068805	.050629	.196	-.17739	.03978
	T1	.058225	.050629	.269	-.05036	.16681
B1	T2	1.019120*	.050629	.000	.91053	1.12771
	B2	.588295*	.050629	.000	.47971	.69688
	A1	.464589*	.050629	.000	.35600	.57318
	A3	.063395	.050629	.231	-.04519	.17198
	A2	-.005411	.050629	.916	-.11400	.10318
	T1	.121620*	.050629	.031	.01303	.23021
A2	T2	1.024531*	.050629	.000	.91594	1.13312
	B2	.593706*	.050629	.000	.48512	.70229
	A1	.470000*	.050629	.000	.36141	.57859
	A3	.068805	.050629	.196	-.03978	.17739
	B1	.005411	.050629	.916	-.10318	.11400
	T1	.127031*	.050629	.025	.01844	.23562
T1	T2	.897500*	.050629	.000	.78891	1.00609
	B2	.466675*	.050629	.000	.35809	.57526
	A1	.342969*	.050629	.000	.23438	.45156
	A3	-.058225	.050629	.269	-.16681	.05036
	B1	-.121620*	.050629	.031	-.23021	-.01303
	A2	-.127031*	.050629	.025	-.23562	-.01844

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



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS FARMASI

Jalan Kalimantan Nomor 37 - Kampus Bumi Tegalboto Kotak Pos 159 Jember 68121
Telepon 0331-324736 Fax: 0331-324736
Laman www.farmasi.unj.ac.id

SURAT PERSETUJUAN REVISI

Kami selaku Dosen Penguji Tugas Akhir/Skripsi mahasiswa sebagai tersebut di bawah ini :


Nama : Mariatu Kabthiyah
NIM : 16210101008
Bagian : Kimia
Judul Skripsi : penelusuran dan isolasi fungi Tanah
Muara petabuhan Besuh serta skrining Aktivitas
Anti bakteri terhadap Pseudomonas aeruginosa

Menerangkan dengan sebenarnya bahwa mahasiswa yang bersangkutan telah melakukan konsultasi dan merevisi naskah skripsi sesuai saran dan masukan penguji.

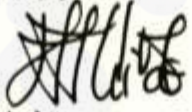
Demikian untuk diketahui dan dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 18 Maret 2020

Dosen Penguji I


(Dwi Koko Pratoko, S.Farm, M.Sc., Apt.
NIP. 198504282009121004

Dosen Penguji II


(Nia Kristiningrum, S.Farm, M.Farm, Apt.
NIP. 198204062006042001



SURAT PERNYATAAN PUBLIKASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ari S. Nugraha, S.F., EdD.Sc., M.Sc.-Res., Ph.D., Apt

NIP : 197807212003121001

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya tulis ilmiah berikut ini merupakan hasil penelitian bersama dengan mahasiswa dan akan dipublikasikan di jurnal selain e-jurnal Pustaka Kesehatan Universitas Jember,

Judul Artikel Ilmiah : Pendauran dan Bedah Fungsi Tanah Muara Pelabuhan
Besuki serta Skoring Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Nama Mahasiswa : Marfatul Kabthirroh

NIM : 16210101008

Nama Jurnal : Pharmaceutical Sciences and Research (PSR)

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

Jember 10 Maret 2020

METERAI
TEMPEL

1704DAEF477188039

6000

Ari S. Nugraha, S.F., EdD.Sc., M.Sc.-Res., Ph.D., Apt

NIP. 197807212003121001