



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
SUNGAI DESA KILENSARI KECAMATAN PANARUKAN
SERTA SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP**
Pseudomonas aeruginosa

SKRIPSI

Oleh:

Amrina Rosyada Fajriyanti

NIM 162210101026

**BAGIAN KIMIA FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**



**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA
SUNGAI DESA KILENSARI KECAMATAN PANARUKAN
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:

Amrina Rosyada Fajriyanti

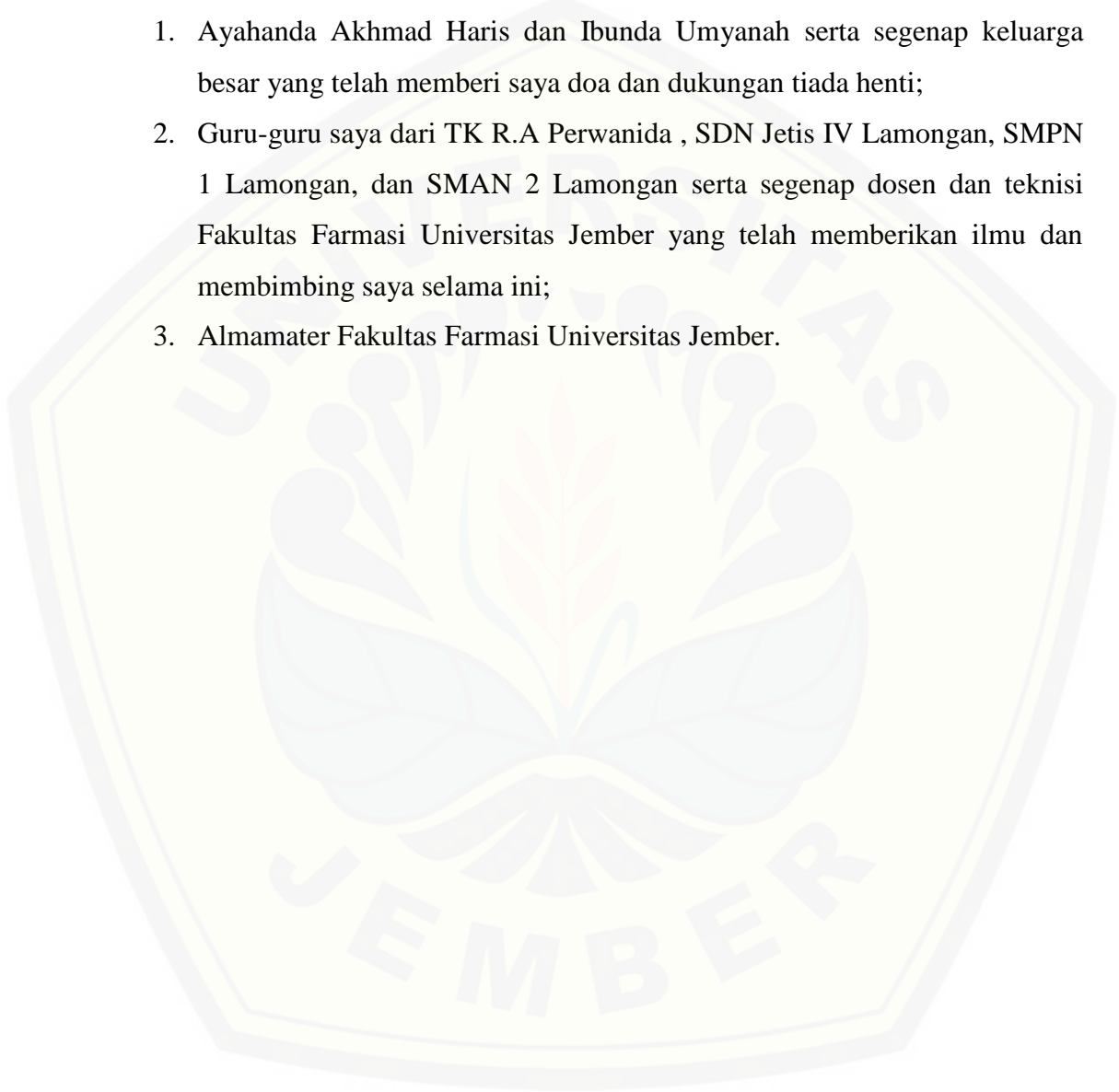
NIM 162210101026

**BAGIAN KIMIA FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS JEMBER
2020**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk :

1. Ayahanda Akhmad Haris dan Ibunda Umyanah serta segenap keluarga besar yang telah memberi saya doa dan dukungan tiada henti;
2. Guru-guru saya dari TK R.A Perwanida , SDN Jetis IV Lamongan, SMPN 1 Lamongan, dan SMAN 2 Lamongan 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

“Kesuksesan adalah kumulatif, kumpulan dari kebaikan, usaha dan doa yang telah dilakukan”

-Arofaa



PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Amrina Rosyada Fajriyanti

NIM : 162210101026

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Desa Kilensari Kecamatan Panarukan Situbondo 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, 26 Februari 2020

Yang menyatakan,



Amrina Rosyada F

NIM 162210101026

SKRIPSI

**PENELUSURAN DAN ISOLASI FUNGI TANAH MUARA SUNGAI
DESA KILENSARI KECAMATAN PANARUKAN SERTA
SKRINING AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Pseudomonas aeruginosa***

Oleh:

Amrina Rosyada Fajriyanti

NIM 162210101026

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 Desa Kilensari Kecamatan Panarukan serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa*" karya Amrina Rosyada Fajriyanti telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Rabu, 26 Februari 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



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

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

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



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

RINGKASAN

Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Desa Kilensari Kecamatan Panarukan serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* : Amrina Rosyada Fajriyanti : 162210101026; 2020; 83 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember.

Berbagai kasus infeksi sangat membahayakan dan menjadi ancaman apabila terjadi resistensi antibakteri. Di Indonesia, kasus infeksi oleh bakteri menjadi sepuluh besar kasus yang mengakibatkan kematian dengan persentase 9.5 %. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat untuk mengatasi masalah infeksi dapat menyebabkan resistensi antibakteri sehingga pengobatan tersebut tidak lagi manjur. 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 di Desa Kilensari Kecamatan Panarukan serta skrining aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil yang diperoleh dari tahap isolasi yaitu 6 isolat fungi tanah yang diberi kode nama IS-PN-A1, IS-PN-A2, IS-PN-T1, IS-PN-T2, IS-PN-B1 dan IS-PN-B2. Dari isolat yang didapatkan dilakukan skrining awal uji aktivitas antibakteri dengan cara mengkontakkan secara langsung isolat dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. 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* tahun 2015.

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fungi tanah muara sungai Desa Kilensari Kecamatan Panarukan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Persen penghambatan yang diperoleh yaitu fungi tanah muara dengan nama isolat IS-PN-A1 menghasilkan persen penghambatan sebesar $74,8 \pm 2,4$ % ; IS-PN-A2 $33,2 \pm 7,0$ % ; IS-PN-T1 $70,2 \pm 4,8$ % ; IS-PN-T2 $53,1 \pm 3,6$ % ; IS-PN-B1 $29,7 \pm 4,0$ % ; IS-PN-B2 $45,8 \pm 2,1$ %.

PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Desa Kilensari Kecamatan Panarukan 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 Lesty Wulandari, S.Si., Apt., M.Farm selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
3. Bapak Eka Deddy Irawan, S.Si., M.Sc., Apt. 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. Ibu Lesty Wulandari S.Si., Apt., M.Farm dan Ibu Nia Kristiningrum S.Farm., Apt., M.Farm 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 Akhmad Haris, Ibunda Umyanah, terimakasih atas doa yang selalu menyertai setiap langkah penulis dalam menempuh studi di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
8. Sahabatku, Fina Nailur Rohmah, yang selalu memberi motivasi dan senantiasa mendengarkan keluh kesah penulis;
9. Saudaraku, Zuhrotun Nisa Al-Ahmad, yang telah menemani hari-hari penulis di perantauan.
10. Teman seperjuangan “DUDRG”, khususnya SOIL FUNGI GROUP Afrian, Ferina, Kibthi, Ziyah, Adinda, Nafa, Garde, Gita yang telah memberi semangat, canda tawa, dan motivasi kepada penulis;
11. Teman seperjuangan, Besty Mutiara Ramadhani dan Nurhayati, yang selalu membersamai perjuangan penulis dalam menempuh studi;
12. Teman seperjuangan, Rifdah Bunga Kwintana yang menjadi tempat penulis bercerita;
13. Teman- Teman, Kakak-Kakak, dan Adik-adik 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. Srikandi Kastrad, Besty Mutiara Ramadhani dan Merita Triana, yang telah berbagi pikiran-pikiran kritisnya.
15. Teman- Teman “KISMIS”, Ayik, Ajik, Sabda, Fania, Lilla, Intan, Besty, Nunu, Vinda, Rifdah, Ziyah, Ulyek, Ferina, Nisul, yang telah menemani malam-malam penuh diskusi dan canda tawa yang membahagiakan.
16. Teman- teman seperantauan, Eva, Vivi, Adita, Putri, Nunu, yang telah saling menguatkan untuk hidup di perantauan.
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. Peneliti sangat mengharapkan kritik dan saran dari pembaca agar skripsi ini menjadi lebih baik.

Jember, 26 Februari 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN.....	vi
HALAMAN PENGESAHAN.....	viii
RINGKASAN	ix
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Antibiotik	5
2.2 Fungi Tanah.....	7
2.3 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.4 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah.....	13
2.4.1. Isolasi Fungi Tanah.....	13
2.4.2. Fermentasi Fungi Tanah	14
2.5 Ekstraksi Fungi Tanah.....	14

2.6	Metode Pengujian.....	15
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN.....		17
3.1	Jenis Penelitian.....	17
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	17
3.3	Variabel Penelitian	17
3.3.1	Variabel Bebas	17
3.3.2	Variabel Terikat	17
3.3.3	Variabel Terkendali.....	17
3.4	Definisi Operasional.....	18
3.5	Rancangan Penelitian	19
3.5.1.	Rancangan Penelitian.....	19
3.5.2.	Skema Penelitian.....	20
3.6	Alat dan Bahan	21
3.6.1.	Alat.....	21
3.6.2.	Bahan	21
3.7	Prosedur Kerja.....	21
3.7.1.	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	21
3.7.2.	Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Agar</i> (PDA).....	22
3.7.3.	Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA).....	22
3.7.4.	Pembuatan Media <i>Potato Dextrose Broth</i> (PDB).....	22
3.7.5.	Preparasi Sampel Tanah.....	22
3.7.7.	Isolasi dan Pemurnian Fungi Tanah.....	23
3.7.8.	Skrining Awal Aktivitas Antibakteri	23
3.7.9.	Fermentasi.....	24
3.7.10.	Ekstraksi	24
3.7.11.	Uji Aktivitas Antibakteri.....	25

3.7.12. Analisis Data	29
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	31
4.1 Pembiakan Fungi Tanah.....	31
4.2 Isolasi dan Pemurnian Fungi Tanah	32
4.3 Skrining Aktivitas Antibakteri	35
4.4 Fermentasi dan Ekstraksi Isolat Fungi	37
4.4.1 Fermentasi.....	37
4.4.2 Ekstraksi.....	38
4.5. Uji Aktivitas Antibakteri.....	40
BAB. 5 PENUTUP	45
5.1. Kesimpulan.....	45
5.2. Saran.....	45
DAFTAR PUSTAKA.....	46
LAMPIRAN.....	51

DAFTAR TABEL

Tabel 4. 1 Hasil skrining aktivitas antibakteri masing-masing isolat fungi tanah	36
Tabel 4. 2 Volume hasil fermentasi dan hasil penimbangan ekstrak tiap isolat	39
Tabel 4. 3 Persen penghambatan gentamisin terhadap bakteri <i>P. aeruginosa</i>	41
Tabel 4. 4 Persen penghambatan DMSO 1 % terhadap bakteri <i>P. aeruginosa</i>	42
Tabel 4. 5 Persen penghambatan ekstrak fungi tanah muara terhadap bakteri <i>P. aeruginosa</i>	42

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Mekanisme aksi antibiotik (Kapoor dkk., 2017)..... 6

Gambar 2. 2 Penggunaan antibiotik secara global pada tahun 2000 dan 2010 (Boeckel dkk., 2014) 6

Gambar 2.3 Hifa pada *Pythiogeton ramosum* (Watanabe, 2010).....8

Gambar 2. 4 Khamir dilihat pada mikroskop (Sabdaningsih, 2016) 8

Gambar 2. 5 Bentuk filamen dari kapang (mold) (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011) 9

Gambar 2. 6 *Candida albicans* sebagai *unicellular* (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011) 9

Gambar 2. 7 *Candida albicans* membentuk filamen atau hifa (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011) 10

Gambar 2. 8 (A) Khamir (*yeast*) dan (B) Kapang (*mold*) (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011)..... 10

Gambar 2. 9 *Pseudomonas aeruginosa* (CDC, 2017)..... 12

Gambar 3.1 Skema Penelitian..... 20

Gambar 4.1 Biakan fungi tanah muara sungai sampel bagian atas (A), tengah (B), bawah (C) yang dibiakkan selama 7 hari 32

Gambar 4.1 Biakan fungi tanah muara sungai sampel bagian atas (A), tengah (B), bawah (C) yang dibiakkan selama 7 hari 32

Gambar 4.2 IS-PN A1 (A) dan IS-PN A2 (B) setelah satu kali proses pemurnian 33

Gambar 4.3 IS-PN-T1 (A) dan IS-PN-T2 (B) satu kali proses pemurnian..... 33

Gambar 4.4 IS-PN-A1 (A) dan IS-PN-A2 (B) satu kali proses pemurnian..... 34

Gambar 4.5 Hasil mikroskopis IS-PN-A1 (A), IS-PN-A2 (B), IS-PN-T1 (C), IS-PN-T2 (D), IS-PN-B1 (E), IS-PN-B2(F) dengan perbesaran 400x 35

Gambar 4.6 Hasil uji kontak IS-PN A1, IS-PN-A2 (A) dan hasil uji kontak sampel IS-PN-T1, IS-PN-T2, IS-PN-B1, IS-PN-B2 37

Gambar 4.7 Hasil Fermentasi IS-PN-A1 dan IS-PN-A2 selama 14 hari 38

Gambar 4.8 Hasil ekstraksi IS-PN A1, IS-PN-A2, PN-T1, IS-PN-T2, IS-PN-B1, IS-PN-B2 menggunakan etil asetat. 40



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antimicrobial Resistance (AMR) selama beberapa dekade ini menjadi masalah serius dalam dunia kesehatan dan menjadi isu global khususnya pada menurunnya efektifitas pengobatan infeksi yang disebabkan oleh mikroba seperti jamur, bakteri dan virus. WHO mengestimasi sebanyak 700.000 orang akan meninggal setiap tahunnya (WHO, 2014). Sedangkan pada tahun 2050 diperkirakan sekitar 10 juta orang terancam meninggal disebabkan oleh resistensi antimikroba (O'Neill, 2016). Kasus-kasus resistensi antimikroba khususnya pada resistensi antibakteri terjadi dikarenakan penggunaan antibiotik yang tidak sesuai pada kasus infeksi.

Di negara-negara berkembang termasuk Indonesia, kasus infeksi menjadi kasus yang membahayakan dan mengancam apabila terjadi resistensi antibakteri. Di Indonesia, kasus infeksi oleh bakteri menjadi sepuluh besar kasus yang mengakibatkan kematian dengan persentase 9.5 % (WHO, 2015). Kementerian Kesehatan Republik Indonesia dalam laporan data dan profil kesehatan Indonesia tahun 2018 melaporkan angka kejadian kasus infeksi yang tinggi mencapai angka total sebanyak 1.249.958 kasus (Hardhana dkk., 2018). WHO juga dalam laporannya yang berjudul *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance* menunjukkan bahwa Asia Tenggara memiliki angka tertinggi dalam kasus kejadian resistensi mikroba. (WHO, 2014).

Resistensi antimikroba khususnya pada antibakteri menimbulkan berbagai dampak yang membahayakan seperti penyakit yang berkepanjangan, meningkatnya mortalitas pasien penderita infeksi, meningkatnya biaya kesehatan juga dampak sosial yang lebih luas. Pengembangan antibakteri baru untuk menunjang antibakteri yang menjadi tidak efektif, membawa urgensi untuk memenuhi kebutuhan pengobatan yang manjur terhadap penyakit infeksi. Selama 30 tahun ini, penemuan antibiotik baru terus dikembangkan. Oleh karena itu WHO telah merumuskan rencana secara global untuk

mengatasi permasalahan resistensi dimana salah satunya adalah memastikan investasi berkelanjutan. Dalam hal ini yang dimaksudkan adalah pengembangan obat baru untuk mengatasi permasalahan resistensi termasuk investigasi terhadap kekayaan alam sebagai sumber untuk pengembangan antibiotik baru (WHO, 2015).

Pengembangan agen antibakteri yang bersumber dari kekayaan alam salah satunya dapat didapatkan di dalam tanah (Taylor dkk., 2009). Tanah menjadi tempat yang baik untuk mikroba penghasil agen antibakteri dikarenakan persaingan nutrisi dan wilayah yang kuat (Karwehl dan Stadler, 2016) sehingga banyak ditemukan sebagai agen antibakteri. Skrining antibiotik dari mikroorganisme tanah telah dilakukan sejak 60 tahun yang lalu dan menunjukkan persentase yang tinggi terhadap metabolit sekunder yang dihasilkan fungi tanah. Terdapat sekitar 23.000 metabolit sekunder, 42 % dihasilkan dari *Actinobacteria*, 42% dari fungi dan 16% dari bakteri lainnya (Srividya dkk., 2008). Penisilin merupakan awal mula ditemukannya fungi yang dapat menghasilkan metabolit sekunder yang berguna sebagai antibiotik (Driche dkk., 2015).

Fungi yang menghasilkan aktivitas antibakteri dapat diisolasi dari tanah seperti penelitian terhadap fungi tanah yang diisolasi dari tanah hutan Kubah National Park Malaysia yang menunjukkan potensi antibakteri menjanjikan sebagai sumber antibiotik baru (Wibowo dkk., 2017). Selain itu tanah muara juga menjadi sumber fungi yang dapat diisolasi seperti pada penelitian terhadap sedimen muara sungai telah menghasilkan beberapa isolat fungi yang berpotensi sebagai sumber antibiotik (Khandavilli dkk., 2016). Muara sungai merupakan ekosistem yang masih dipengaruhi oleh ekosistem laut seperti pasang surut, gelombang, dan aliran air tawar serta sedimen muara sungai. Dengan adanya potensi sumber antibiotik baru dari fungi tanah muara sungai akan mengatasi bakteri yang berkembang menjadi resisten.

Berdasarkan penelitian sebelumnya maka diperlukan eksplorasi yang lebih luas terhadap kekayaan fungi tanah muara sungai yang bertujuan untuk mengetahui adanya potensi aktivitas antibakteri. Sampel tanah yang digunakan untuk mengambil fungi tanah dalam penelitian ini yaitu tanah muara sungai di Desa Kilensari Kecamatan

Panarukan Kabupaten Situbondo. Kawasan ini dipilih karena sebelumnya telah dilakukan penyusuran potensi fungi tanah di beberapa tempat seperti kawasan Sidoarjo Situbondo, Madura dan Banyuwangi (Pamungkas, 2019). Hasil yang didapatkan dari penyusuran yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan daerah Situbondo mempunyai potensi fungi tanah yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga dilakukan penyusuran yang lebih luas lagi di kawasan Situbondo. *Microdilution method* digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri karena merupakan metode yang dapat mengukur secara kuantitatif nilai konsentrasi ekstrak etil asetat fungi tanah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* selain itu juga sensitif dan cepat. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dipilih karena merupakan bakteri yang termasuk dalam 12 bakteri yang mengancam resistensi dan menjadi prioritas secara global untuk ditemukannya sumber antibiotik baru.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah fungi tanah muara sungai memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ?
2. Berapakah nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara sungai terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai pada penelitian antara lain :

1. Untuk mengetahui aktivitas antibakteri fungi tanah muara sungai terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Untuk mengetahui nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

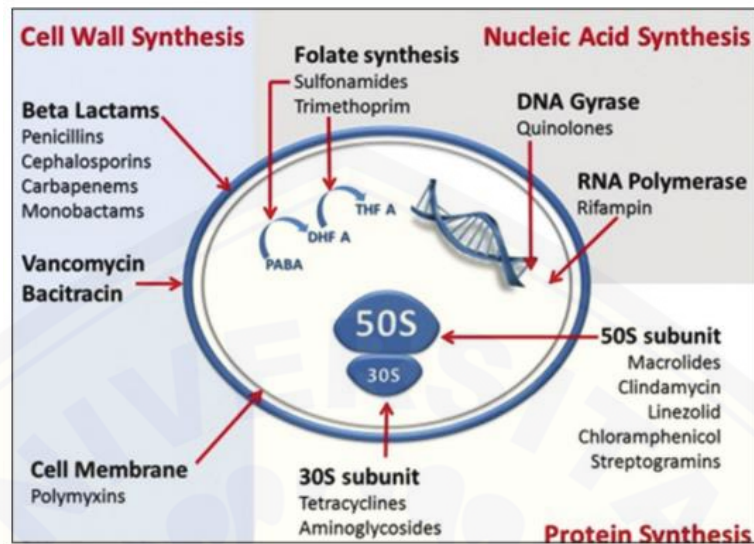
Manfaat yang ingin didapatkan dari penelitian ini antara lain :

1. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara sungai terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* serta memberikan sumbangan pengetahuan bagi kemajuan di bidang kesehatan dan ilmu pengetahuan.
2. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan dasar dalam penelitian selanjutnya untuk mengisolasi senyawa metabolit sekunder yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri dari ekstrak etil asetat fungi tanah.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

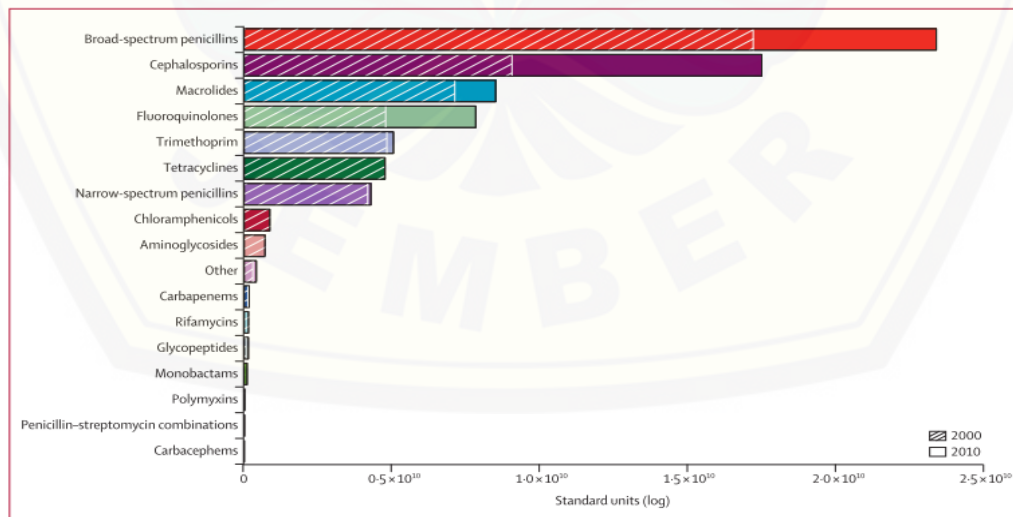
2.1 Antibiotik

Antibiotik merupakan suatu agen antimikroba yang digunakan untuk mengatasi infeksi akibat bakteri. Secara alami, banyak sumber antibiotik di dapatkan dari fungi contohnya seperti penisilin, atau beberapa antibiotik dihasilkan dari bakteri yang diisolasi dari tanah seperti streptomisin dan tetrasiklin (Clardy dkk., 2010). Secara umum, antibiotik mempunyai dua mekanisme dalam aksi-nya sebagai antibakteri yaitu bakterisidal dan bakteriostatik. Bakterisidal yaitu kemampuan untuk mengganggu pembentukan dinding sel bakteri atau komponen dalam sel nya sedangkan bakteriostatik yaitu kemampuan untuk menghentikan bakteri untuk berkembang biak. Gambar 2.1 menunjukkan mekanisme secara umum berbagai golongan antibiotik. Golongan antibiotik yang termasuk dalam bakterisidal yaitu beta-laktam seperti penisilin, karbapenem dan sefalosporin mekanisme yang terjadi pada golongan ini yaitu PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) berinteraksi dengan cincin β -laktam sehingga tidak dapat melakukan sintesis peptidoglikan yang baru. Gangguan pada lapisan peptidoglikan menyebabkan lisis pada bakteri. juga golongan glikopeptida seperti vankomisin dan basitrasin dengan mekanisme yang terjadi yaitu penghambatan ikatan subunit *D-alanyl* dengan PBP sehingga menghambat sintesis dinding sel. Antibiotik bakteriostatik mempunyai beberapa mekanisme seperti penghambatan biosintesis protein yang ter-target pada sub unit 30s dan 50s pada ribosom bakteri mekanisme lainnya yang termasuk dalam bakteriostatik yaitu penghambatan pada replikasi DNA dan metabolisme asam folat (Kapoor dkk., 2017).



Gambar 2. 1 Mekanisme aksi antibiotik (Kapoor dkk., 2017)

Menurut WHO pada tahun 2016 beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri menjadi penyakit yang menduduki peringkat sepuluh besar penyebab kematian di seluruh dunia. Pengembangan resistensi merupakan evolusi normal untuk mikroorganisme tetapi kondisi tersebut akan dipercepat oleh penggunaan antibakteri yang tidak sesuai (WHO, 2015).



Gambar 2. 2 Penggunaan antibiotik secara global pada tahun 2000 dan 2010 (Boeckel dkk., 2014)

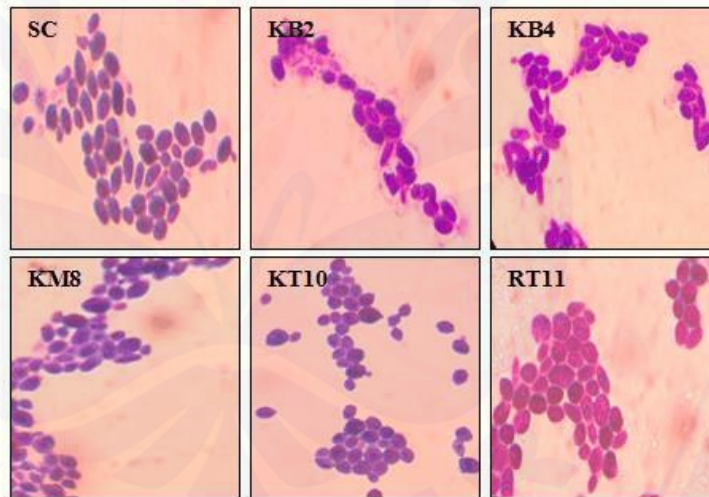
Gambar 2.2 menunjukkan Jurnal *The Lancet Infectious Disease* yang menggambarkan penggunaan jenis antibiotik di 71 negara bahwa antara tahun 2000 dan 2010 konsumsi antibiotik meningkat sebanyak 36 %, kenaikan ini terjadi terutama di negara-negara berkembang. Terdapat perbedaan kecenderungan penggunaan golongan antibiotik yang digunakan setiap negara di dunia. Meningkatnya konsumsi glikopeptida, karbapenem, polimiksin dan monobaktam terjadi di negara berpenghasilan tinggi sedangkan jenis sefalosporin dan fluorokuinolon terjadi peningkatan penggunaan di negara berkembang. Perubahan pola akan sesuai dengan perubahan epidemiologi resistensi antibiotik dan peningkatan kejadian infeksi di negara berkembang (Boeckel dkk., 2014).

2.2 Fungi Tanah

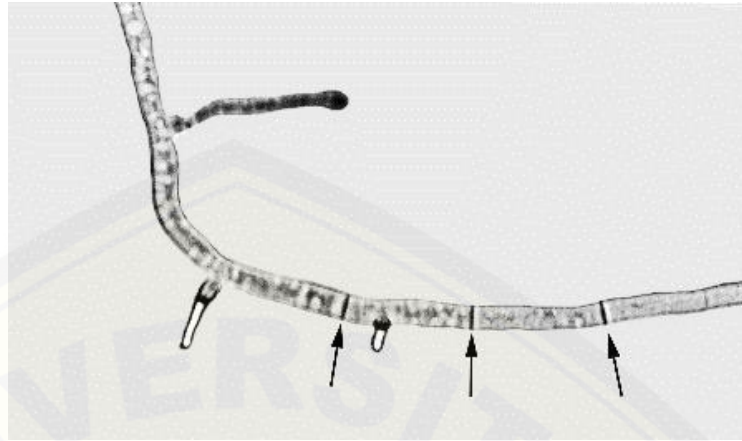
Fungi merupakan mikroorganisme eukariotik yang tidak dapat membuat makanan atau nutrisinya sendiri sehingga bersifat heterotrof, nutrisi yang dibutuhkan fungi berupa senyawa organik seperti nitrogen, karbon dan fosfat. Fungi secara umum dapat diklasifikasikan menjadi 8 kelompok yang didasarkan pada karakteristik jamur antara lain *slime mold*, *flagellate fungi*, *Sugar Fungi*, *Higher fungi* dan *Fungi imperfecti*. Fungi tumbuh dengan membentuk filamen ramping atau hifa baik *septate* atau *non septate* dan umumnya multinukleat. Hifa terdiri dari dinding sel yang mengelilingi membran sitoplasma yang bergabung dan tumbuh ke permukaan dengan membentuk bagian kompak dan massa hifa yang bercabang seperti benang disebut miselium. Bentuk panjang serta bercabang pada Gambar 2.3 menunjukkan adanya hifa fungi *Pythiogeton ramosum* dilihat secara mikroskopis (Watanabe, 2010).



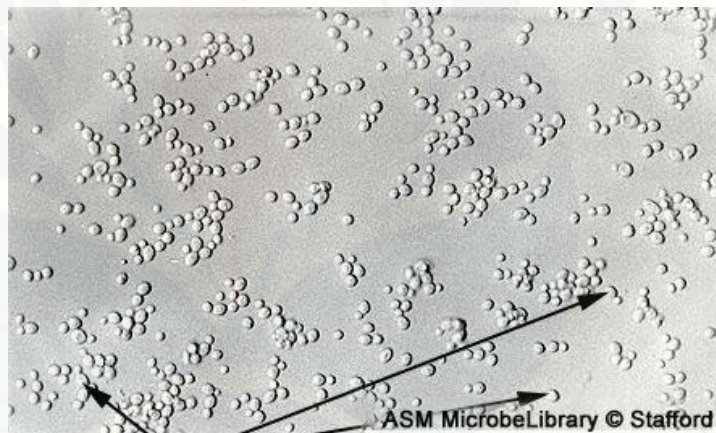
Gambar 2. 3 Hifa pada *Pythiogeton ramosum* (Watanabe, 2010)



Gambar 2. 4 Khamir dilihat pada mikroskop (Sabdaningsih, 2016)

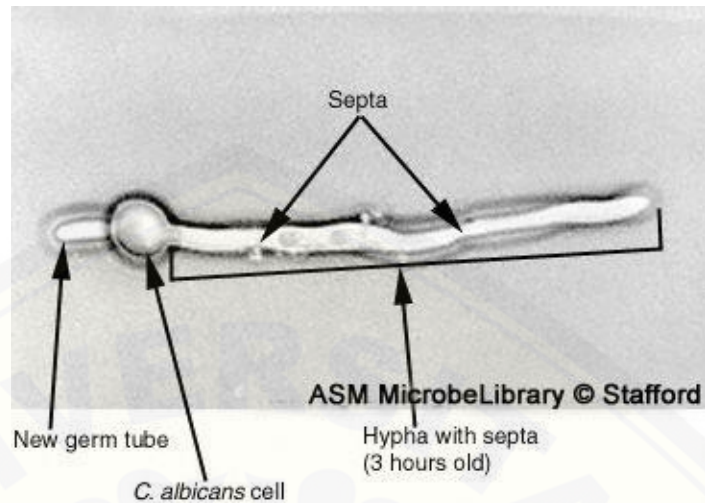


Gambar 2. 5 Bentuk filamen dari kapang (*mold*) (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011)



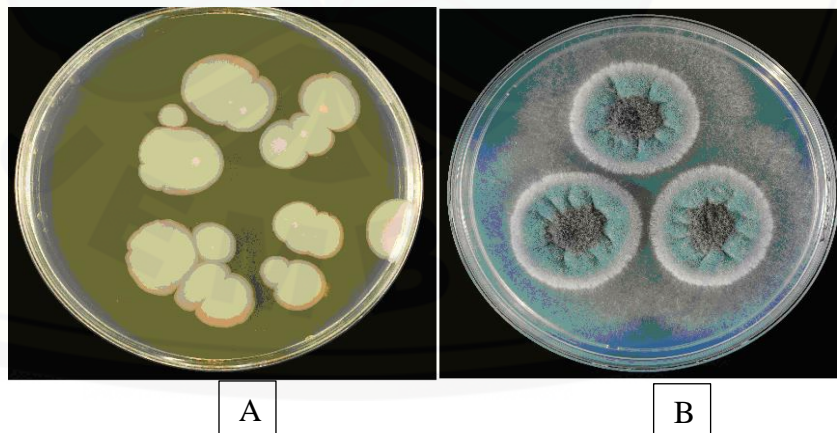
Budding yeast cells

Gambar 2. 6 *Candida albicans* sebagai *unicellular* (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011)



Gambar 2. 7 *Candida albicans* membentuk filamen atau hifa (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011)

Berdasarkan morfologinya yang dapat dilihat secara makroskopis berupa karakteristik koloni seperti tekstur, warna dan bentuk. Fungi dibedakan menjadi 2 yaitu kapang (*mold*) dan Khamir (*yeast*) yang ditunjukkan pada Gambar 2.8 dimana khamir memiliki bentuk koloni berwarna putih kekuningan, permukaannya halus dan teksturnya seperti lendir sedangkan kapang memiliki bentuk koloni berwarna hijau biasanya juga hitam, permukaannya cenderung tebal dan teksturnya lebih kasar.



Gambar 2. 8 (A) Khamir (*yeast*) dan (B) Kapang (*mold*) (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011)

Secara mikroskopis kapang dan khamir dapat dilihat seperti pada Gambar 2.3-2.7. Kapang merupakan jenis fungi yang memiliki miselium serta spora. Sedangkan khamir merupakan *uniceluller* yang tidak berflagella dan tidak berfilamen namun dalam kondisi tertentu dapat membentuk filamen atau hifa, khamir dapat membentuk pseudohifa dalam kondisi transisi. Gambar 2.4 menunjukkan khamir yang merupakan mikroorganisme eukariotik *uniceluller* yang secara mikroskopis dapat dilihat berupa sel bulat atau berbentuk oval seperti telur dengan inti ditengahnya (Sabdaningsih, 2016) . Pada Gambar 2.6 menunjukkan khamir seperti *Candida albicans* dapat sebagai *unicelluler* yang tidak berfilamen yang tumbuh dalam media PDB (*Potato Dextrose Broth*) sedangkan pada gambar 7 dapat membentuk filamen pada kondisi germinasi (Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, 2011).

Seperti sebagian besar bakteri, fungi mendapatkan nutrisi secara heterotof dan absortif dimana dalam berbagai lingkungan bakteri dan mikrofungi berkaitan erat dalam sebuah persaingan. Pertumbuhan fungi di sebagian besar ekosistem alami, mempunyai peran penting yaitu membantu mengambil nutrisi dari tanah dan dekomposisi akar tanaman (Michael J. Carlile, Graham W. Gooday, 2001). Mikroorganisme fungi banyak terdapat pada ekosistem yang dinamis seperti ekosistem mangrove dan juga muara sungai yang dapat dilihat secara fisiologis, gen, serta kekayaan filogenetiknya. (Edward F. Delong, Ke ying Wu, 1994). Ekosistem muara sungai masih dipengaruhi oleh kondisi laut seperti pasang surut gelombang, masuknya *saline water* dan adanya aliran air tawar dari sungai serta sedimen sungai.

Dalam sebuah penelitian ditemukan 15 fungi yang diisolasi dari sedimen muara sungai Bhairavapalem, India. Yang menghasilkan 7 isolat yang dipilih kemudian di karakterisasi. Analisis filogenetik yang dilakukan pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa 7 isolat termasuk dalam 4 spesies dan 2 genus (Khandavilli dkk., 2016).

2.3 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Klasifikasi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut :

Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Famili	: Pseudomonaceae
Genus	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>



Gambar 2. 9 *Pseudomonas aeruginosa* (CDC, 2017)

Gambar 2.9 menunjukkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang merupakan bakteri aerobik obligat gram-negatif, berbentuk batang, dan bermonoflagellata polar sehingga mempunyai sifat motil. Tampak seperti mutiara dan berbau khas anggur atau tortilla. *Pseudomonas aeruginosa* mampu tumbuh dengan baik di suhu 25 °C - 37°C. Bakteri ini juga mampu tumbuh pada suhu 42 °C yang menjadi pembeda dari banyak spesies *Pseudomonas* lainnya. Pigmen dapat dihasilkan dari *Pseudomonas aeruginosa* diantaranya *pyocyanin* menghasilkan warna biru-hijau, *pyoverdine* menghasilkan warna kuning-hijau dan berfluorosensi serta *pyorubin* menghasilkan warna merah-coklat (Wu dkk., 2015).

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri penyebab penyakit infeksi saluran kemih (ISK), pneumonia dan termasuk dalam kategori *Critical* dalam 4

kategori yang dibuat WHO (Harbarth dkk., 2017). Terlebih lagi, diketahui bahwa sekarang ini bakteri *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap antibiotik karbapenem dan merupakan bakteri yang menyumbang tingginya kasus MDR (*Multi Drug Resistance*). Patogenesis dari bakteri ini dengan mengkodekan banyak faktor virulensi yang memungkinkannya menyebabkan berbagai infeksi pada manusia (Wu dkk., 2015). Lipopolisakarida (LPS) dari *P. aeruginosa* mempunyai tingkat ketoksikan yang cukup rendah dibandingkan dengan bakteri gram negatif lainnya sehingga memfasilitasi perkembangan infeksi kronis dengan menurunkan respon inflamasi (Lore dkk., 2009).

P. aeruginosa mempunyai tiga mekanisme resistensi terhadap antibiotik yaitu resistensi gen, pompa efluks dan impermeabilitas membran. Semua bakteri gram negatif memiliki membran luar yang secara alami mencegah molekul hidrofilik yang masuk. Untuk dapat menembus kanal protein. Beberapa antibiotik hidrofilik seperti β -laktam, aminoglikosida, tetrasiklin, beberapa fluorokuinolon dan kuinolon dapat menembus dinding sel dari *P. aeruginosa*. Disfungsi kanal protein yang spesifik dapat menyebabkan penurunan kerentanan *P. aeruginosa* dalam melawan antibakteri tertentu (Wu dkk., 2015).

2.4 Isolasi dan Fermentasi Fungi Tanah

2.4.1. Isolasi Fungi Tanah

Isolasi fungi tanah merupakan suatu proses untuk mengidentifikasi adanya jamur sehingga dapat terpisahkan dari mikroorganisme lainnya yang ada di tanah. Koloni Fungi yang tumbuh setelah diinokulasi dipindahkan ke media baru berdasarkan bentuk atau warna yang berbeda (Dise, 2018). Pemilihan media sangat berpengaruh terhadap proses pertumbuhan jamur. Isolasi jamur akan berhasil dicapai dengan menggunakan media selektif yang dapat menghambat pertumbuhan organisme antagonisnya. Secara umum media mengandung sumber karbon, nitrogen dan vitamin yang dibutuhkan jamur untuk tumbuh dengan baik. Glukosa

merupakan sumber karbon yang paling banyak dipakai. Fruktosa dan manosa adalah gula yang paling banyak digunakan dalam media pertumbuhan fungi. *Potato Dextrose Agar* (PDA) merupakan salah satu media yang cocok untuk pertumbuhan fungi dalam spektrum luas. Menggunakan PDA sebagai media mempunyai keuntungan yaitu dapat meminimalisir tumbuhnya bakteri sehingga dapat menghindari adanya kontaminasi dan fungi dapat tumbuh dengan baik.

2.4.2. Fermentasi Fungi Tanah

Fermentasi fungi tanah merupakan suatu proses perubahan energi dalam keadaan anaerobik untuk mendapatkan metabolit primer dan sekunder. Fermentasi dilakukan pada isolat fungi tanah yang berpotensi mempunyai aktivitas antibakteri setelah dilakukan skrining awal. Pemilihan media yang digunakan dalam fermentasi sangat penting untuk proses fungi dalam memetabolisme metabolit. PDB (*Potato Dextrose Broth*) merupakan media yang secara umum digunakan untuk fermentasi fungi (Acumedia, 2016). Sebanyak 20 % ekstrak kentang dan 2 % glukosa terkandung dalam *Potato Dextrose Broth*, ekstrak kentang tersebut menjadi sumber karbohidrat, vitamin, mineral, protein, asam lemak, dan nutrisi lain yang dibutuhkan oleh mikroorganisme. *Dextrose* menjadi sumber karbohidrat sederhana yang dapat memicu pertumbuhan dengan memberikan nutrisi tambahan yang dibutuhkan sehingga gabungan komponen ini mampu memberikan kebutuhan makanan untuk fungi agar tetap mampu bertahan hidup. Dalam kondisi PH rendah media ini akan menghambat pertumbuhan bakteri sehingga mencegah adanya kontaminasi (Jain, P. and Pundir, 2011).

2.5 Ekstraksi Fungi Tanah

Ekstraksi merupakan suatu teknik pemisahan dengan menarik suatu senyawa yang diinginkan menggunakan suatu pelarut yang sesuai. Pada proses ekstraksi terdapat proses yang mempengaruhi diantaranya sifat pelarut, tujuan ekstraksi dan

skala ekstraksi. Terdapat dua jenis ekstraksi yaitu ekstraksi padat-cair dan ekstraksi cair-cair. Ekstraksi padat-cair merupakan tahap pertama dalam memisahkan senyawa dari bahan alam. Beberapa teknik yang termasuk dalam ekstraksi padat-cair adalah destilasi, Soxhletasi, perkolasi dan maserasi. Prinsip dari ekstraksi padat-cair ini didasarkan pada kemampuan dan daya larut analit dalam pelarut tertentu. Dalam proses ekstraksi ini pelarut akan berpenetrasi ke matriks padat bahan alam kemudian senyawa terlarut akan berdifusi keluar sel (Zhang dkk., 2018).

Ekstraksi cair-cair merupakan metode ekstraksi yang didasarkan pada fenomena distribusi atau partisi dari suatu analit diantara dua pelarut yang tidak saling campur dengan menggunakan corong pisah. Fase yang tidak tercampur memungkinkan untuk transfer zat terlarut secara selektif dari satu fase ke fase lainnya kemudian membiarkan kedua fase terpisah. Kedua cairan yang tidak bercampur harus mampu dengan cepat memisah setelah dicampur bersama. Prinsip dasar dari ekstraksi cair-cair adalah perbedaan kelarutan suatu senyawa dalam dua pelarut yang berbeda dengan tujuan mendapatkan suatu senyawa analit dari campuran berfasa cair dengan pelarut lain yang juga berfasa cair. Satu fase yang mengandung komponen yang akan dipisahkan akan menjadi fase air dan fase lainnya menjadi fase yang menggunakan pelarut organik yang memiliki sifat non polar atau semi polar seperti etil asetat, heksan atau diklorometan (Law dan Todd, 2008). Analit-analit yang terekstraksi dalam pelarut organik adalah molekul netral yang dapat berinteraksi dengan pelarut organik.

2.6 Metode Pengujian

Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dalam melihat aktivitas antibakteri pada bahan alam diantaranya yaitu *Disk-Diffusion test*, *Broth Macrodilution methods* dan *Microdilution method*. (Zgoda dan Porter, 2001). Selain itu juga terdapat metode lain seperti *Flow cytofluorometric* dan *bioluminescent* tetapi metode ini jarang digunakan karena membutuhkan alat yang spesifik dan diperlukan evaluasi terhadap reproduibilitas dan standarisasinya. Metode difusi merupakan metode dengan prosedur dimana *agar plates* di inokulasi dengan mikroorganisme yang akan di uji

secara terstandar. Kemudian *paper disc* berdiameter 6 mm yang mengandung senyawa agen antibakteri dengan konsentrasi tertentu diletakkan di permukaan agar kemudian ditempatkan pada kondisi yang sesuai. Dalam metode ini, agen antimikroba akan berdifusi ke agar dan menghambat germinasi dan pertumbuhan mikroorganisme yang telah di inokulasi kemudian bermanifestasi dengan adanya diameter zona hambat. Metode dilusi merupakan metode yang cocok untuk mengukur aktivitas antibakteri secara kuantitatif. Baik Mikrodilusi maupun makrodilusi mempunyai 2 jenis yaitu *agar dilution* dan *Broth dilution*. Pada metode makrodilusi *Broth dilution* volume yang dibutuhkan dalam setiap *tubes* minimal 2 mL sedangkan pada mikrodilusi menggunakan *96-well microtitration plate* dimana volumenya lebih kecil. Setiap *tube* atau *96-well microtitration plate* di inokulasi dengan suspensi mikroba yang telah distandarkan dengan 0,5 Mc farland. Standart Mc Farland merupakan nilai kekeruhan yang digunakan sebagai referensi untuk menyesuaikan kekeruhan suspensi bakteri sehingga jumlah bakteri akan berada dalam rentang yang diberikan untuk membakukan pengujian antimikroba. Metode pengujian mikrodilusi ini menghasilkan hasil yang akurat. Sedangkan pada metode makrodilusi terdapat beberapa kelemahan seperti membutuhkan volume agen antibakteri dan reagen yang banyak, adanya resiko kesalahan dalam penyiapan larutan uji dan uji makrodilusi termasuk uji yang dilakukan secara manual. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi hasil dari metode ini yaitu pemilihan media, waktu inkubasi dan penyiapan inokulum (Balouiri dkk., 2016)

BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelusuran dan isolasi fungi dari tanah muara sungai di Desa Kilensari Kecamatan Panarukan serta uji aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ini merupakan jenis penelitian *true experimental laboratories*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium DUDRG, Laboratorium Kimia, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember mulai bulan September 2019 hingga Januari 2020.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak hasil fermentasi fungi tanah muara sungai.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai dari konsentrasi yang dapat menghambat aktivitas antibakteri fungi tanah muara sungai pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel Terkendali pada penelitian ini adalah :

1. Pembuatan media pembiakan fungi tanah
2. Pembiakan dan isolasi fungi tanah sungai
3. Pembuatan biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
4. Suhu inkubasi biakan bakteri
5. Metode penghitungan nilai konsentrasi penghambatan
6. Prosedur penelitian

3.4 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tanah muara Sungai yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanah yang ketika air laut pasang akan tergenang dan saat surut tidak tergenang serta dekat dengan perakaran bakau. Tanah muara sungai diambil dari muara sungai desa Kilensari Kecamatan Panarukan dengan menggunakan pipa paralon untuk mendapatkan tanah muara bagian atas, tengah dan bawah serta disimpan dalam *Freezer*.
2. Isolasi merupakan proses memurnikan fungi tanah yang tumbuh dalam media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang baru berdasarkan perbedaan morfologi secara makroskopis berupa warna atau bentuk koloni.
3. Skrining awal merupakan proses untuk mengetahui isolat fungi tanah potensial. Skrining awal dilakukan dengan cara mengontakkan isolat fungi tanah muara dengan bakteri uji. Munculnya zona bening di sekitar isolat menunjukkan bahwa isolat tersebut potensial dalam memberikan aktivitas antibakteri.
4. Fermentasi merupakan proses perbanyakan biomassa dari fungi tanah dengan menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dalam *Incubator Shaker* dengan kecepatan putaran 125 rotasi per menit selama 14 hari.
5. Konsentrasi penghambatan merupakan aktivitas penghambatan fungi tanah terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara kuantitatif yang dapat diukur dari pengujian antibakteri menggunakan metode mikodilusi dalam *plate* 96 sumuran yang berisi 100 μ L tiap sumuran dan pengukuran tingkat kekeruhan hasil uji antibakteri menggunakan *microplate reader* dan ditentukan persen penghambatannya. Cara menghitung persen penghambatan sebagai berikut :

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

Keterangan :

Abs : absorbansi

A : kontrol negatif ekstrak/gentamisin

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

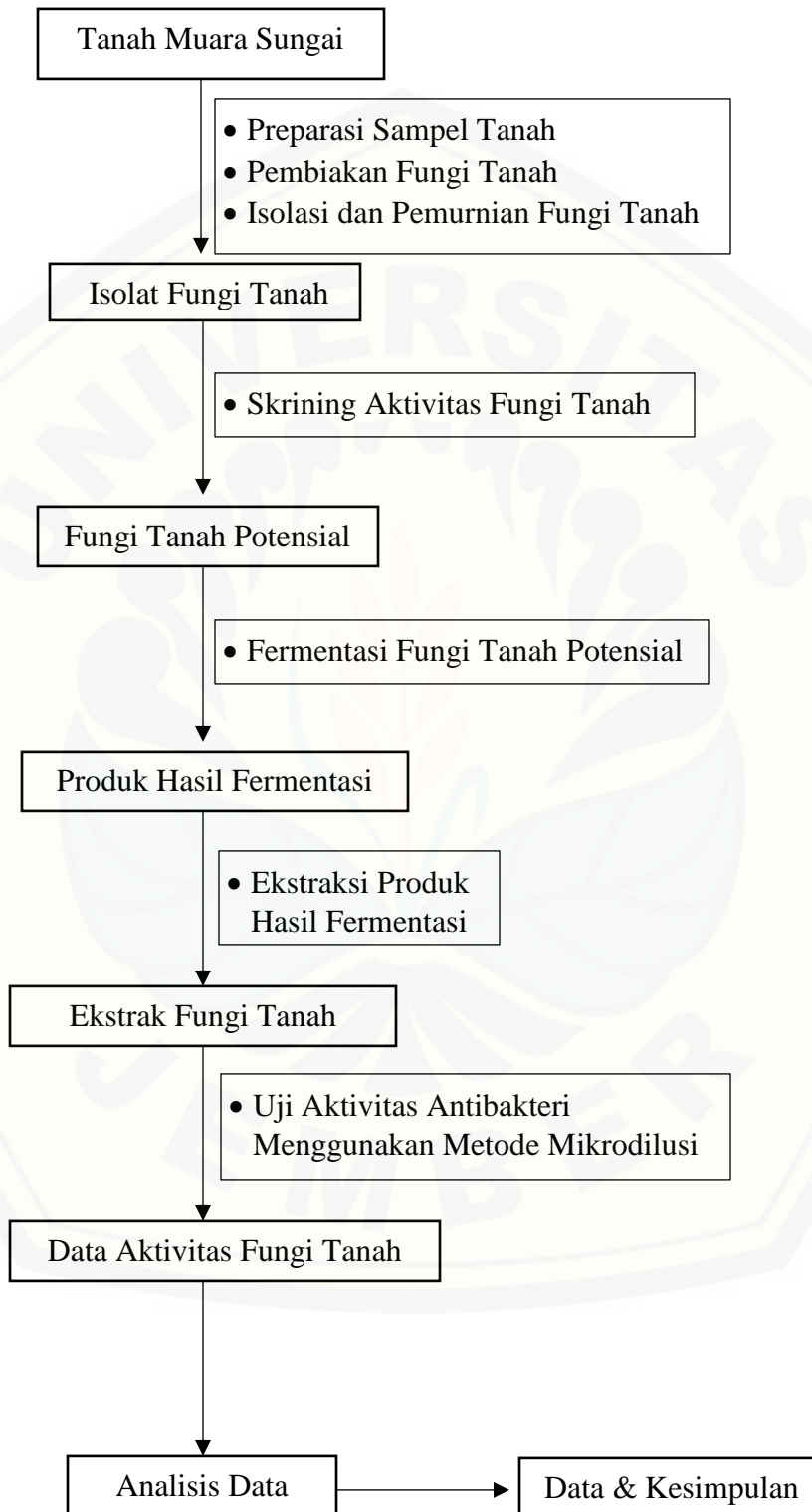
3.5 Rancangan Penelitian

3.5.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *the post test only control group design* dimana dalam penelitian ini dibagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan. Dari dua kelompok tersebut akan dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa* dan nantinya akan diukur nilai persen penghambatan aktivitas bakteri.

Tahapan pertama yang dilakukan dalam penelitian ini adalah pembiakan fungi tanah muara sungai yang didapatkan dari muara sungai di Desa Kilensari Kecamatan Panarukan. Pembiakan fungi tanah dilakukan dalam media *Potato Dextrose Agar* dengan menggunakan pelarut air laut (Pamungkas, 2019). Media tersebut merupakan media yang optimum untuk pertumbuhan jamur karena pada penelitian sebelumnya telah dilakukan optimasi pada beberapa media untuk menentukan media yang terbaik. Fungi tanah muara sungai yang tumbuh kemudian diisolasi berdasarkan morfologinya hingga mendapatkan fungi tanah yang murni. Setelah didapatkan isolat fungi tanah yang murni dilakukan skrining awal aktivitas antibakteri melalui kontak langsung fungi tanah dengan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* kemudian diamati zona hambat yang terbentuk. Fungi tanah yang memiliki zona hambat akan dilakukan proses fermentasi lalu di ekstraksi yang nantinya akan diuji aktivitas antibakterinya dengan metode mikrodilusi untuk melihat nilai persen penghambatan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

3.5.2. Skema Penelitian



Gambar 3.1 Skema Penelitian

3.6 Alat dan Bahan

3.6.1. Alat

Laminar Air Flow, Inkubator, Neraca Analitik (Ekhous), Autoklaf, *Hot plate* (UC-152), *vortex* (GENE-2), mikropipet (SOCOREX), *shaker incubator* (B-ONE), *hot plate* (HEIDOLPH), Spektrofotometer UV-Vis, mikroskop, *microplate flat bottom 96 wells* (IWAKI), *microplate reader* (CORONA SH-1000) serta perlengkapan lain yaitu : Erlenmeyer, gelas ukur, cawan petri, *petri dish*, *spreader*, jarum ose, sumuran, *yellow tip*, *blue tip*, pipet tetes, jangka sorong, vial, mangkok ekstrak, rak tabung reaksi, corong pisah .

3.6.2. Bahan

Tanah muara sungai yang diperoleh dari Desa Kilensari Kecamatan Panarukan Kabupaten Situbondo Jawa timur, Air Laut dari pantai pasir putih Situbondo, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Merck), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (HIMEDIA), DMSO (Emsure), CaCl_2 (Sigma), MgCl_2 (Brataco), etil asetat teknis, etanol 70%, gentamisin sulfat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

3.7 Prosedur Kerja

3.7.1. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Untuk memulai sterilisasi alat dan bahan, autoklaf yang terlebih dahulu diisi dengan air secukupnya di didihkan terlebih dahulu setelah mendidih alat dan bahan dimasukkan autoklaf dan ditutup rapat. Tunggu sampai penunjuk suhu hingga 121°C kemudian buka katup udara maka suhu akan turun sampai 0 lalu tutup katup kembali sehingga suhu kembali naik sampai 121°C . Suhu peminasaan ini dijaga antara 121°C - 126°C selama 15 menit.

3.7.2. Pembuatan Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)

Untuk 1000 mL PDA yang dibuat, ditimbang sejumlah 39 gram PDA. Digunakan air laut untuk melarutkan PDA yang sebelumnya air laut tersebut disaring terlebih dahulu. Setelah dilarutkan menggunakan air laut kemudian media dipanaskan di atas *hot plate* dengan suhu 150 °C untuk melarutkan media sepenuhnya hingga mendidih dan jernih. Kemudian di sterilisasi sesuai dengan prosedur sterilisasi sebelumnya. Tuangkan pada *petri dish* dan rekatkan menggunakan *plastic wrap* yang dilingkarkan pada *petri dish*.

3.7.3. Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Untuk 1000 mL MHA yang dibuat ditimbang sejumlah 34 gram MHA. Digunakan hidrobat sebagai pelarut untuk melarutkan MHA. Setelah itu media dipanaskan di atas *hotplate* dengan suhu sekitar 150 °C untuk melarutkan sepenuhnya hingga mendidih dan jernih. Kemudian media di sterilisasi sesuai dengan prosedur sterilisasi sebelumnya. Tuangkan media pada *petri dish disposable* dan rekatkan menggunakan *plastic wrap* yang dilingkarkan pada *petri dish disposable*.

3.7.4. Pembuatan Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)

Pembuatan media PDB diawali dengan menimbang 4,8 gram PDB dimasukkan dalam erlenmeyer dan dilarutkan 200 mL menggunakan hidrobat dan dimasukkan dalam erlenmeyer. Campuran kemudian diaduk sampai larut dan media tampak jernih. Kemudian media disterilkan sesuai dengan prosedur sterilisasi sebelumnya.

3.7.5. Preparasi Sampel Tanah

Pipa sepanjang kurang lebih 40 cm digunakan untuk membuat lubang pada tanah sehingga tanah terambil di dalam pipa tersebut. Sampel tanah sungai yang didapat ditimbang 10 gram kemudian dimasukkan ke *tube* dan ditambahkan aquadest steril melalui spuit injeksi. Sampel kemudian di homogenkan dengan cara

di vortex yang setelah itu di sentrifugasi dengan kecepatan 500 rpm selama 10 menit.

3.7.6. Pemiakan Fungi Tanah

Secara aseptik cairan sampel tanah yang telah memisah diambil bagian atasnya (Supernatan) sebanyak 100 μ l menggunakan mikropipet. Sampel kemudian di pindahkan ke atas media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dan diratakan menggunakan *spreader*. Kemudian *petri dish* direkatkan menggunakan *plastic wrap* dan parafilm dengan penyimpanan dalam suhu ruang.

3.7.7. Isolasi dan Pemurnian Fungi Tanah

Isolasi fungi tanah muara sungai diawali dengan melakukan pengamatan terhadap koloni fungi yang tumbuh, diamati berdasarkan perbedaan morfologinya dari bentuk maupun warna yang tumbuh. Kemudian fungi tanah muara yang mempunyai perbedaan morfologi dipisahkan dengan cara diambil menggunakan ose lalu masing-masing dipindahkan ke media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang baru. Pemurnian fungi tanah diawali dengan melakukan pengamatan setiap hari untuk melihat ada atau tidaknya kontaminan. Tahapan ini dilakukan untuk memperoleh fungi tunggal.

3.7.8. Skrining Awal Aktivitas Antibakteri

Dilakukan skrining awal aktivitas antibakteri ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fungi tanah yang telah di kultur. Skrining awal aktivitas antibakteri ini dilakukan dengan cara mengontak langsung antara isolat fungi tanah muara dengan kultur bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa* yang terlebih dahulu dilakukan pembuatan biakan bakteri diatas media MHA yang diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ kemudian dibuat suspensi bakteri dengan mengambil 2 ose biakan bakteri yang ditambahkan sejumlah NaCl steril lalu di vortex. Kekeruhan dari suspensi bakteri diukur dengan menentukan absorbansinya dan dibandingkan dengan standar Mc Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer

UV-Vis hingga didapatkan absorbansi sebesar 0,08-1,3 setara dengan transmittan 74-84% pada panjang gelombang maksimum 625 nm. Suspensi bakteri Sebanyak 100 µl kemudian diletakkan diatas media MHA dan diratakan menggunakan *spreader*. Isolat fungi tanah diambil menggunakan sumuran lalu diletakkan dalam media MHA yang berisi bakteri uji. Media kemudian diinkubasi dengan suhu $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam. Fungi tanah potensial dipilih berdasarkan adanya zona bening yang terbentuk disekitar fungi tanah yang menunjukkan adanya penghambatan terhadap bakteri.

3.7.9. Fermentasi

Fermentasi dilakukan dengan memasukkan 5 potong sumuran berdiameter 0,9 cm yang diambil dari isolat fungi tanah kemudian dimasukkan dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebanyak 200 mL. Campuran tersebut disimpan dengan diletakkan dalam *shaker incubator* dengan suhu 28°C selama 14 hari sampai fungi tanah mencapai fase stationer.

3.7.10. Ekstraksi

Metabolit sekunder yang telah dihasilkan dari proses fermentasi kemudian diambil dengan cara di ekstraksi. Etil asetat ditambahkan dalam proses ekstraksi. Etil asetat dipilih karena dapat menarik metabolit sekunder sehingga tidak tercampur dengan media. Sebelum penambahan etil asetat dilakukan penyaringan terlebih dahulu untuk memisahkan fungi tanah dengan media hasil fermentasi. Setelah dilakukan pemisahan, media fermentasi ditambahkan etil asetat dengan perbandingan 1:1 dan dilakukan sebanyak 2-3 kali partisi. Hasil ekstraksi yang telah terlarut dengan etil asetat kemudian diuapkan dalam lemari asam hingga pelarut menguap. Hasil ekstraksi setelah penguapan kemudian ditimbang bobotnya dan disimpan.

3.7.11. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji Aktivitas Antibakteri ini dilakukan dengan mengacu pada protokol standar CLSI (CLSI, 2015):

A. Penyiapan Media

Media yang disiapkan yaitu *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang akan digunakan untuk peremajaan bakteri yang dibuat sesuai prosedur Pembuatan MHA sebelumnya. Media lain yang harus disiapkan yaitu *Cation Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB) yang akan digunakan untuk uji mikrodilusi. Pembuatan media CAMHB dilakukan dengan terlebih dahulu membuat media MHB menggunakan Erlenmeyer dengan melarutkan 1,05 gram MHB dalam 50 mL akua demineralata kemudian dikocok hingga larut. Media tersebut di sterilkan seperti prosedur sterilisasi sebelumnya. Media yang sudah steril kemudian ditambahkan dengan larutan $MgCl_2$ dan $CaCl_2$ steril hingga konsentrasi Mg^{2+} dalam media yaitu 10-12.5 mg/L dan Ca^{2+} dalam media yaitu 20-25 mg/L. Larutan induk $MgCl_2$ dibuat dengan melarutkan $MgCl_2$ sebanyak 0,8354 gram dalam 10 mL akua demineralata hingga didapat konsentrasi Mg^{2+} dalam larutan induk yaitu 10 mg/mL. Larutan induk $CaCl_2$ dibuat dengan cara melarutkan $CaCl_2$ sebanyak 0,3668 gram dalam 10 mL akua demineralata hingga didapat konsentrasi Ca^{2+} dalam larutan induk yaitu 10 mg/mL. Larutan 225 μ l larutan $MgCl_2$ dan 450 μ l larutan induk $CaCl_2$ ditambahkan pada 200 mL media MHB steril sehingga di dapatkan konsentrasi 11,25 mg Mg^{2+} /L dan 22,5 mg Ca^{2+} /L.

B. Peremajaan Biakan Bakteri

Biakan murni bakteri diremajakan pada cawan petri yang berisi media MHA dengan cara menggores media MHA menggunakan jarum ose

yang mengandung bakteri *P. aeruginosa* secara aseptis kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

C. Pembuatan Standar Mc Farland 0,5

BaCl₂ 1% sebanyak 0,05 mL dicampur dengan 9,95 mL H₂SO₄ sehingga setara dengan 1x 10⁸ CFU/mL kemudian divortex hingga homogen. Periksa densitas standar Mc Farland dengan mengukur absorbansinya pada panjang gelombang 625 nm.

D. Pembuatan Biakan Aktif

Bakteri hasil peremajaan dibiakkan secara aseptis pada 10 mL media CAMHB untuk metode mikrodilusi hingga didapatkan suspensi bakteri yang dihomogenkan dengan vortex. Kekeruhannya dibandingkan dengan standar Mc. Farland 0,5 menggunakan spektrofotometer UV-Vis hingga didapat absorbansi 0,08-0,13. kekeruhan pada absorbansi tersebut menunjukkan konsentrasi sel bakteri dalam media yaitu 1x 10⁸ CFU/mL.

E. Pembuatan Larutan Kontrol

1. Kontrol Positif

Kontrol positif menggunakan 1 konsentrasi gentamisin yaitu 1 µg/mL yang didapatkan dari pengenceran larutan gentamisin sulfat injeksi 40 mg/mL menggunakan media CAMHB.

2. Kontrol Negatif

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

F. Pembuatan Larutan Uji

Larutan uji dibuat dengan cara melarutkan 1 mg ekstrak dalam DMSO 100% sebanyak 100 µL lalu diencerkan 100 kalinya dengan media CAMHB sehingga didapatkan konsentrasi ekstrak 100 µg/mL dan DMSO

1%. Preparasi gentamisin sebagai kontrol positif mikrodilusi dilakukan dengan mengencerkan gentamisin sulfat injeksi 40 mg/mL dengan media CAMHB. Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan media CAMHB hingga mencapai konsentrasi 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Preparasi DMSO 1% dalam media CAMHB untuk metode mikrodilusi sebagai kontrol negatif ekstrak dilakukan dengan memipet 100 μL DMSO 100% lalu ditambahkan media CAMHB sebanyak 9900 μL .

G. Uji Antibakteri Ekstrak dengan Metode Mikrodilusi

Penentuan nilai hambatan antibakteri dari ekstrak fungi tanah dilakukan menggunakan metode mikrodilusi dengan desain *microplate* sebagai berikut:

Microplate 1

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

Microplate 2

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

Keterangan :

50 μ L Ekstrak fungi tanah dalam DMSO 1% + bakteri dalam CAMHB 50 μ L50 μ L Ekstrak fungi tanah dalam DMSO 1% + media CAMHB 50 μ L50 μ L Gentamisin + bakteri dalam CAMHB 50 μ L50 μ L Gentamisin + media CAMHB 50 μ L50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB + bakteri dalam CAMHB 50 μ L50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB + media CAMHB 50 μ L50 μ L Media CAMHB + bakteri dalam CAMHB 50 μ L100 μ L Media CAMHB

Suspensi bakteri (1×10^8 CFU/mL) diencerkan 100 kalinya menggunakan CAMHB lalu ditambahkan larutan uji kontrol positif atau kontrol negatif sebanyak 50 μ L. konsentrasi akhir bakteri di tiap sumuran yaitu 5×10^4 CFU. Kelompok perlakuan terdiri dari campuran 50 μ L larutan ekstrak konsentrasi 100 μ g/mL dalam DMSO 1% dan 50 μ L bakteri (5×10^5 CFU/mL) dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak merupakan campuran 50 μ L larutan ekstrak konsentrasi 100 μ g/mL dalam DMSO 1% dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol negatif ekstrak merupakan campuran 50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μ L bakteri dalam media CAMHB. Kontrol DMSO 1% yaitu campuran 50 μ L DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol positif merupakan campuran 50 μ L gentamisin konsentrasi 1 μ g/mL dan 50 μ L bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin adalah campuran 50 μ L gentamisin konsentrasi 1 μ g/mL dan 50 μ L media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari campuran media CAMHB 50 μ L dan bakteri dalam CAMHB 50 μ L, sedangkan kontrol media yaitu media CAMHB sebanyak 100 μ L. Semua prosedur uji antibakteri dilakukan di dalam LAF.

Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 18 jam pada suhu $35 \pm 2^\circ\text{C}$ pengukuran densitas dilakukan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 625 nm dengan mengukur absorbansi tiap sumuran *microplate*.

3.7.12. Analisis Data

Data hasil percobaan uji antibakteri didapatkan nilai konsentrasi penghambatan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Nilai yang diperoleh dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*. Analisis data menggunakan ANOVA dapat digunakan apabila data yang diperoleh normal dan homogen. Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk melihat ada atau tidaknya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Kemudian dilakukan uji LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan bermakna. Hasil analisis menunjukkan perbedaan bermakna ketika nilai $p < 0,05$ dengan tingkat kepercayaan

95%. Uji non parametrik seperti *Kruskall Wallis* atau *Man Whitney* dapat dilakukan ketika data yang didapat tidak normal atau tidak homogen.



BAB. 5 PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. Fungi tanah muara sungai Desa Kilensari Kecamatan Panarukan memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Fungi tanah muara dengan nama isolat IS-PN-A1 menghasilkan persen penghambatan sebesar $74,8 \pm 2,4$ % ; IS-PN-A2 $33,2 \pm 7,0$ % ; IS-PN-T1 $70,2 \pm 4,8$ % ; IS-PN-T2 $53,1 \pm 3,6$ % ; IS-PN-B1 $29,7 \pm 4,0$ % ; IS-PN-B2 $45,8 \pm 2,1$ %.

5.2. Saran

Saran untuk penelitian ini adalah :

1. Dilakukan skrining fitokimia untuk mengetahui senyawa apa yang berperan dalam aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Perlu dilakukan identifikasi spesies fungi.
3. Perlu dilakukan isolasi untuk memperoleh isolat senyawa murni yang bertanggung jawab dalam aktivitas antibakteri ekstrak fungi tanah muara Desa Kilensari Kecamatan Panarukan.

DAFTAR PUSTAKA

- Acumedia. 2016. *Potato Dextrose Broth (7585)*. Neogen Corporation.
- Balouiri, M., M. Sadiki, dan S. K. Ibsouda. 2016. Methods For In Vitro Evaluating Antimicrobial Activity : a review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2):71–79.
- Berk, Z. 2018. Liquid-liquid Extraction Latest Developments in the Analysis of Heterocyclic Amines in Cooked Foods
- Boeckel, T. P. Van, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B. T. Grenfell, S. A. Levin, dan R. Laxminarayan. 2014. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *The Lancet Infectious Diseases*. 3099(14):1–9.
- Cazar, M. E., L. Astudillo, dan L. D. P. Naturales. 2005. Antimicrobial Butyrolactone Derivatives from The Ecuadorian Soil Fungus *Aspergillus Terreus thorn . var terreus*. 1067–1075.
- CDC. 2017. *Pseudomonas Aeruginosa*. <https://phil.cdc.gov/default.aspx>
- Clardy, J., M. Fischbach, dan C. Currie. 2010. The Natural History of Antibiotics. *National Institutes of Health*. 19(11):1–8.
- CLSI. 2015. M07-a10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; approved standard—tenth edition. (January)
- Deshmukh, R., A. Mathew, dan H. J. Purohit. 2014. Characterization of Antibacterial Activity of Bikaverin from *Fusarium sp . hkf15*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 117(4):443–448.
- Dise, N. B. 2018. Isolation and Identification of Soil Fungi Isolates from Forest Soil for Flooded Soil Recovery. *IOP Conference Series : Material Science and Engineering*
- Driche, E. H., S. Belghit, dan C. Bijani. 2015. A new *streptomyces* strain Isolated from Saharan Soil Produces di- (2-ethylhexyl) Phthalate , a Metabolite Active Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. 5503:1341–1350.

- Edward F. Delong, Ke ying Wu, B. B. P. & Raffael V. M. Jovine. 1994. High Abundance of Archaea in Antarctic Marine Picoplankton. *Nature (London, United Kingdom)*. 371
- Gandjar, I., R. A. Samson, A. Oetari, dan I. Santoso. 2002. Pengenalan Kapang Tropik Umum. *Yayasan Obor Indonesia*. 2013.
- Harbarth, S., G. Kahlmeter, J. Kluytmans, M. Mendelson, G. S. Hospital, C. Town, S. Africa, C. Pulcini, N. Singh, U. Theuretzbacher, C. U. S. Food, S. Spring, L. Grayson, C. Houchens, D. L. Monnet, M. Ouellette, J. B. Patel, N. Zealand, E. Carrara, A. Savoldi, D. Kattula, dan F. Burkert. 2017. *Global Priority List of Antibiotic Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development*. Geneva
- Hardhana, B., T. Siswanti, F. Sibuea, W. Widiyanti, M. I. Susanti, S. Pangribowo, R. Aprianda, S. Indah, R. Mardiana, E. S. Sakti, T. Wahyudi, H. A. Habibi, D. M. Sari, B. B. Sigit, H. Maslinda, dan R. Maula. 2018. *Data Dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia*. Indonesia
- 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.
- Kapoor, G., S. Saigal, dan A. Elongavan. 2017. Action and Resistance Mechanisms of Antibiotics : A Guide for Clinicians Basic Anatomy of Bacterial Cell. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 33(3)
- Karwehl, S. dan M. Stadler. 2016. Exploitation of Fungal Biodiversity for Discovery of Novel Antibiotics
- Khandavilli, R., R. Meena, dan S. Bd. 2016. Fungal Phylogenetic Diversity in Estuarine Sediments of Gautami. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*. 6(4):268–276.
- Kirkwood, Z. I., B. C. Millar, D. G. Downey, dan J. E. Moore. 2018. Antimicrobial Effect of Dimethyl Sulfoxide and n, n - Dimethylformamide on Mycobacterium

- Abscessus : Implications for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018–2020.
- Law, J. D. dan T. A. Todd. 2008. *Liquid-Liquid Extraction Equipment*. United States: Idaho National Laboratory.
- Lore, N. I., M. R. Leone, T. Ierano, C. Cigana, L. Curcuro, A. Silipo, F. Cozzolino, R. Lanzetta, A. Molinaro, M. L. Bernardini, dan A. Bragonzi. 2009. Pseudomonas aeruginosa Exploits Lipid and Muropeptides Modification as A Strategy to Lower Innate Immunity During Cystic Fibrosis Lung Infection. *PLoS One*. 4(12)
- 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.
- Michael J. Carlile, Graham W. Gooday, S. C. W. 2001. *The Fungi, Second Edition*. San Diego, California: Academic Press.
- O'Neill, J. 2016. Tackling drug-resistant infections globally: Final Report and Recommendations the review on. (May)
- Pamungkas, F. B. P. 2019. Penelusuran Dan Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap Pseudomonas Aeruginosa. Universitas Jember.
- 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.
- 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.

- Reiss, Errol ; Shadomy, H ; Lyon, G. 2011. *Fundamental Medical Mycology*
- Sabdaningsih, A. 2016. Bioprospecting of Fungi Associated with Cladiella Sp. as Antibacterial-MDR against Acinetobacter Baumannii from Panjang Island Vicinity. 2016
- Sara Ramírez, R., J. D. Arias M., J. C. Bedoya, E. A. Rueda L., C. Y. Sánchez, dan S. D. Granada G. 2015. Metabolitos producidos por microorganismos antagonistas son capaces de inhibir in vitro los principales patógenos del aguacate. *Agronomia Colombiana*. 33(1):58–63.
- Sousa, A. M., I. Machado, A. Nicolau, dan M. O. Pereira. 2013. Improvements on Colony Morphology Identification Towards Bacterial Profiling. 95:327–335.
- Srividya, A. R., G. S. Saritha, dan B. Suresh. 2008. Study of the Soil Isolates for Antimicrobial Activity. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 70(6):812–815.
- Takahashi, J. A., M. C. M. De Castro, G. G. Souza, E. M. F. Lucas, A. A. P. Bracarense, L. M. Abreu, dan I. E. Marriel. 2008. Isolation and Screening of Fungal Species Isolated from Brazilian Cerrado Soil for Antibacterial Activity Against Escherichia coli , Staphylococcus aureus , Salmonella typhimurium. 198–204.
- Taylor, J. W. 1995. Phylogeny and PCR Identification of the Human Pathogenic Fungus Penicillium marneffeii. 33(1):85–89.
- Taylor, P., I. L. Pepper, C. P. Gerba, D. T. Newby, dan C. W. Rice. 2009. Critical Reviews in Environmental Science and Technology Soil : A Public Health Threat or Savior ? (November 2014):37–41.
- Thakur, D., A. Yadav, B. K. Gogoi, dan T. C. Bora. 2007. Isolation and Screening of Streptomyces in Soil of Protected Forest Areas from the States of Assam and Tripura , India , for Antimicrobial Metabolites. 242–249.
- Ukhty, N. 2015. Kapang Endofit Laut dari Tumbuhan Pesisir Terong Pungo (Solanum sp.) dan Potensinya sebagai Antibakteri 1. *Jurnal Perikanan Tropis*. 2(April):91–102.

- Watanabe, T. 2010. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi*. Edisi Third Edit. United States: CRC Press.
- WHO. 2014. *Antimicrobial Resistance*. Geneva
- WHO. 2015. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. Geneva. 2015
- Wibowo, M. S., E. Julianti, dan M. D. Radzali. 2017. Isolation and Antibacterial Activity of Soil-Derived Fungi from Taman Botani Negara, Shah Alam, Malaysia. (1):18–24.
- Wu, W., Y. Jin, F. Bai, dan S. Jin. 2015. *Pseudomonas Aeruginosa*. Elsevier Ltd. *Molecular Medical Microbiology, Three-Volume Set*.
- Zgoda, J. R. dan J. R. Porter. 2001. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Abstract. 39(3):221–225.
- Zhang, Q. W., L. G. Lin, dan W. C. Ye. 2018. Techniques for Extraction and Isolation of Natural Products : a Comprehensive Review. *Chinese Medicine*. 1–26.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Dokumentasi Penelitian



Sampel tanah muara sungai bagian atas, tengah dan bawah.



Pipa dengan panjang 40 cm untuk mengambil sampel tanah



Proses ekstraksi menggunakan etil asetat

Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Media

- **Media *Potato Dextrose Agar* (PDA)**

Pembuatan media PDA dibuat dalam 250 mL air laut. Dalam pembuatan 1 L media dibutuhkan 39 gram PDA.

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

$$X = 9,75 \text{ gram}$$

- **Media *Potato Dextrose Broth* (PDB)**

Pembuatan media PDB dibuat dalam 250 mL hidrobat. Dalam pembuatan 1 L media dibutuhkan 24 gram PDB.

$$\frac{24 \text{ gram}}{1000 \text{ mL}} = \frac{x}{250 \text{ mL}}$$

$$X = 6 \text{ gram}$$

- **Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)**

Pembuatan media MHA dibuat dalam 250 mL hidrobat. Dalam pembuatan 1 L media dibutuhkan 34 gram MHA.

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

$$X = 8,5 \text{ gram}$$

- **Media *Mueller Hinton Broth* (MHB)**

Pembuatan media MHB dibuat dalam 200 mL hidrobat. Dalam pembuatan 50 mL media dibutuhkan 1,05 gram MHA.

$$\frac{1,05 \text{ gram}}{50 \text{ mL}} = \frac{x}{200 \text{ mL}}$$

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

Lampiran 3. Perhitungan Pembuatan Media CAMHB

- **Pembuatan larutan induk MgCl₂**

Bahan = MgCl₂.6H₂O (BM=203,3027 g/mol)

BM MgCl₂ = 95,211 g/mol

BM Mg²⁺ = 24,305 g/mol

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

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

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

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

- **Penambahan MgCl₂ dalam media MHB**

Dibutuhkan konsentrasi 11

,25 mg Mg²⁺/L dalam media MHB. Penambahan dilakukan dengan menggunakan larutan induk MgCl₂ konsentrasi 10 mg Mg²⁺/mL. media yang digunakan adalah sebanyak 200 mL maka dibutuhkan Mg²⁺ sebanyak :

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

Jumlah larutan induk MgCl₂ yang ditambahkan :

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

Larutan induk MgCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL ditambahkan sebanyak 0,225 mL ke dalam media MHB 200 mL.

- **Pembuatan larutan induk CaCl_2**

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

BM CaCl_2 = 110,98 g/mol

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

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

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

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

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

- **Penambahan CaCl_2 dalam media MHB**

Dibutuhkan konsentrasi 22,5 mg Ca^{2+}/L dalam media MHB. Penambahan dilakukan dengan menggunakan larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+}/mL . media yang digunakan adalah sebanyak 200 mL maka dibutuhkan Ca^{2+} sebanyak :

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

Jumlah larutan induk CaCl_2 yang ditambahkan :

$$\frac{2,25 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times 1 \text{ mL} = 0,45 \text{ mL}$$

Larutan induk CaCl_2 konsentrasi 10 mg Mg^{2+} /mL ditambahkan sebanyak 0,45 mL ke dalam media MHB 200 mL.



Lampiran 4. Pembuatan Larutan Uji

- **Pembuatan larutan induk gentamisin**

Bahan = larutan injeksi gentamisin sulfat konsentrasi 40 mg/mL

BM gentamisin sulfat = 575,675 g/mol

BM gentamisin = 477,596 g/mol

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

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

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

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

- **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 $\mu\text{g/mL}$.

- **Pembuatan Larutan Uji DMSO 1%**

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

X = 0,1 mL

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

- **Pembuatan 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

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

Hasil penimbangan ekstrak

Kode isolat	Berat ekstrak yang ditimbang (mg)	DMSO yang ditambahkan (µl)
IS-PN-A1	1,060	106
IS-PN-A2	1,060	106
IS-PN-T1	1,032	103,2
IS-PN-T2	1,044	104,4
IS-PN-B1	1,030	103
IS-PN-B2	1,035	103,5

Lampiran 5. Hasil Uji Mikrodilusi**Data absorbansi kontrol negatif dan kontrol media untuk ekstrak**

Kontrol negatif (DMSO 1% + suspensi bakteri)			Kontrol Media (DMSO 1% + Media CAMHB)		
Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep3
1,004	1,01	1,022	0,075	0,078	0,089
Rata-rata			0,080		

Hasil uji aktivitas kontrol positif ekstrak

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

Keterangan :

Abs : absorbansi

A : kontrol negatif ekstrak/gentamisin

B : kontrol DMSO 1% atau media CAMHB

C : larutan uji ekstrak/gentamisin

D : kontrol ekstrak/gentamisin

Replikasi 1

Kode nama isolat	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	Persen Penghambatan (%)
IS-PN-A1	0,672	0,412			72,1
IS-PN-A2	0,962	0,269			25,6
IS-PN-T1	0,766	0,470			68,2
IS-PN-T2	0,726	0,328	1,012	0,080	57,3
IS-PN-B1	0,777	0,165			34,3
IS-PN-B2	0,735	0,209			43,5

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

Replikasi 2

Kode nama isolat	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	Persen Penghambatan (%)
IS-PN-A1	0,653	0,437			76,8
IS-PN-A2	0,899	0,293			34,9
IS-PN-T1	0,804	0,493			66,6
IS-PN-T2	0,756	0,295	1,012	0,080	50,5
IS-PN-B1	0,839	0,161			27,2
IS-PN-B2	0,762	0,261			46,2

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

Replikasi 3

Konsentrasi	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	Persen Penghambatan (%)
IS-PN-A1	0,689	0,460			75,4
IS-PN-A2	0,952	0,386			39,2
IS-PN-T1	0,721	0,494			75,6
IS-PN-T2	0,721	0,270	1,012	0,080	51,6
IS-PN-B1	0,847	0,172			27,5
IS-PN-B2	0,805	0,318			47,7

Data absorbansi kontrol negatif dan kontrol media untuk gentamisin dan DMSO**1 %**

Kontrol negatif (Media CAMHB + suspensi bakteri)			Kontrol Media (Media CAMHB)		
Rep 1	Rep 2	Rep 3	Rep 1	Rep 2	Rep 3
1,007	1,014	1,028	0,076	0,078	0,079
Rata-rata		1,016	0,077		

Hasil uji aktivitas kontrol positif gentamisin

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

Keterangan :

Abs : absorbansi

A : kontrol negatif ekstrak/gentamisin

B : kontrol DMSO 1% atau media CAMHB

C : larutan uji ekstrak/gentamisin

D : kontrol ekstrak/gentamisin

Konsentrasi	Replikasi	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	Persen Penghambatan (%)
1 µg/mL	1	0,084	0,080	1,016	0,077	99,6
	2	0,084	0,081			99,7
	3	0,085	0,083			99,8

Hasil uji aktivitas kontrol DMSO 1 %

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

Keterangan :

Abs : absorbansi

A : kontrol negatif ekstrak/gentamisin

B : kontrol DMSO 1% atau media CAMHB

C : larutan uji ekstrak/gentamisin

D : kontrol ekstrak/gentamisin

Konsentrasi	Replikasi	Uji	Kontrol uji	Kontrol negatif	Kontrol media	Persen Penghambatan (%)
1 $\mu\text{g/mL}$	1	1,004	0,075	1,016	0,077	1,0
	2	1,010	0,078			0,7
	3	1,022	0,089			0,6

Lampiran 6. Analisis Statistik Tabel Uji Normalitas

Tests of Normality			
		Shapiro-Wilk ^a	
Ekstrak		df	Sig.
Persenpenghambatan	atas	6	,100
	tengah	6	,529
	bawah	6	,181

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

Persenpenghambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
21,044	2	15	,000

Analisis non-parametrik Mann-Whitney Test

1. Kelompok Sampel Atas dan Bawah

Ranks				
	Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Persenpenghambatan	Atas	6	7,50	45,00
	Bawah	6	5,50	33,00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Persenpenghamb atan
Mann-Whitney U	12,000
Wilcoxon W	33,000
Z	-,961
Asymp. Sig. (2-tailed)	,337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,394 ^b

2. Kelompok Sampel Atas dan Tengah

Ranks				
	Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Persenpenghambatan	Atas	6	6,17	37,00
	tengah	6	6,83	41,00
	Total	12		

Test Statistics ^a	
	Persenpenghamb atan
Mann-Whitney U	16,000
Wilcoxon W	37,000
Z	-,320
Asymp. Sig. (2-tailed)	,749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,818 ^b

3. Kelompok Sampel Tengah dan Bawah

4. Ranks				
	Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Persenpenghambatan	tengah	6	9,50	57,00
	Bawah	6	3,50	21,00
	Total	12		

Test Statistics^a

	Persenpenghamb atan
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	21,000
Z	-2,882
Asymp. Sig. (2-tailed)	,004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,002 ^b

