Jurnal Pharmascience, Vol. 10, No.1, Februari 2023, hal: 36-50
ISSN-Print. 2355 – 5386
ISSN-Online. 2460-9560
https://ppjp.ulm.ac.id/journal/index.php/pharmascience
Research Article

Isolasi Fungi Tanah Muara Sungai Desa Kalinaun Sulawesi Utara serta Skrining Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Muhammad Habiburrohman[1], Nafa Rosyida Zanuba[1], Muhammad Zainul Arifin[2], Saeful Akhmad Tauladani[2,3], Gani Asri Muharam[4], Asia[5], Dwi Koko Pratoko[1], Bawon Triatmoko[1], Ari Satia Nugraha[1]*

[1]Drug Utilisation and Discovery Research Groups, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, Jember, Jawa Timur, Indonesia
[2]Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung, Bitung, Sulawesi Utara, Indonesia
[3]Australian National Centre for Ocean Resources and Security (ANCORS), University of Wollongong, Australia
[4]Balai Pendidikan dan Pelatihan Perikanan Aertembaga, Bitung, Sulawesi Utara, Indonesia
[5]Politeknik Kelautan dan Perikanan Bone, Bone, Sulawesi Selatan, Indonesia
Email: arisatia@unej.ac.id

ABSTRAK

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang menyebabkan mortalitas dan morbiditas di dunia yang dapat diterapi menggunakan antibotik. Adanya resistensi dapat mengancam efektivitas antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mencari kandidat antibiotik yang bersumber dari fungi tanah muara yang diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Ekosistem tanah muara mangrove memiliki kondisi ekstrem sehingga menuntut mikroorganisme untuk bertahan hidup dengan memproduksi senyawa antibiotik untuk bersaing dengan mikroorganisme lain. Sampel tanah diambil dari Muara Sungai Desa Kalinaun, Kecamatan Likupang Timur, Kabupaten Minahasa Utara, Provinsi Sulawesi Utara. Sampel tanah yang didapat sebanyak empat isolat fungi berpotensi dalam menghambat bakteri uji, yaitu IS2-BTG11-1-1, IS2-BTG11-2-1, IS2-BTG11-2-2, IS2-BTG11-2-3. Keempat isolat tersebut dilakukan fermentasi selama 14 hari lalu diekstraksi dengan pelarut etil asetat. Setelah didapatkan ekstrak etil asetat, dilakukan skrining fitokimia dan didapatkan hasil bahwa keempat ekstrak mengandung senyawa golongan terpenoid. Setelah dilakukan skrining fitokimia, dilakukan uji aktivitas antibakteri menggunakan metode mikrodilusi. Uji mikrodilusi dilakukan dengan konsentrasi tunggal 50 µg/mL. Berdasarkan uji mikrodilusi, keempat ekstrak fungi tanah muara memberikan aktivitas penghambatan berturut-turut dari terbesar ke terkecil : IS2-BTG11-2-3 (50,9% ± 7,6); IS2-BTG11-2-1 (49,8% ± 13,5); IS2-BTG11-1-1 (34,4% ± 2,4); IS2-BTG11-2-2 (37,2% ± 7,7). Pada penelitian ini senyawa yang berperan sebagai antibakteri belum bisa dipastikan, sehingga membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Kata Kunci: Antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa,* Fungi Tanah Muara, Mikrodilusi, Desa Kalinaun

ABSTRACT

Infectious diseases are one of the leading causes of mortality and morbidity in the world that can be treated with antibiotics. The existence of resistance can threaten the effectiveness of antibiotics. This study aims to find new antibiotic candidates from fungi in estuary soils and tested the activity against Pseudomonas aeruginosa bacteria. Estuary soil ecosystems have extreme conditions that require microorganisms to be able to survive Soil samples were taken from the Estuary of the Kalinaun Village, East Likupang District, North Minahasa Regency, North Sulawesi Province. Soil samples obtained were 4 isolates of fungi that had the potential bacteria inhibition, namely IS2-BTG11-1-1, IS2-BTG11-2-1, IS2-BTG11-2-2, IS2-BTG11-2-3. Four isolates were fermented for 14 days and extracted with ethyl acetate solvent. Phytochemical screening of the extract was carried out and the results showed that the four extracts contained terpenoid compounds. Antibacterial activity was tested using the microdilution methods with a single concentration of 50 µg/mL. Based on the microdilution test, four estuary soil fungal extracts gave inhibitory activity from the largest to the smallest: IS2-BTG11-2-3 (50.9% ± 7.6); IS2-BTG11-2-1 (49.8% ± 13.5); IS2-BTG11-1-1 (34.4% ± 2.4); IS2-BTG11-2-2 (37.2% ± 7.7). In this study, the compound that acts as an antibacterial has not been determined, so it requires further research.

Keywords: Antibacterial, Pseudomonas aeruginosa, Estuary Soil Fungi, Microdilution, Kalinaun Village

I.PENDAHULUAN

Selama 20 tahun terakhir, penyakit infeksi termasuk 4 dari 10 penyakit penyebab kematian di dunia dengan jumlah kasus yang meningkat setiap tahunnya dan diperkirakan akan terus mengalami peningkatan (WHO, 2020). Pada tahun 2019, telah dilaporkan data kematian sebanyak 13,7 juta orang akibat penyakit infeksi (Murray *et al*., 2022). Pada tahun 2019 hingga 2022 juga telah dilaporkan angka kematian akibat infeksi dari Covid-19 mencapai 6,6 juta jiwa (WHO, 2022). Hal tersebut menunjukkan bahwa penyakit infeksi berkontribusi secara substansial pada angka kematian di dunia. Penyakit infeksi akibat bakteri dapat diterapi menggunakan antibiotik. Namun demikian, adanya resistensi dapat mengancam efektivitas antibiotik. Menurut Komite Pengendalian Resistensi Antimikroba, tingkat resistensi bakteri di Indonesia terus meningkat dari tahun 2013 (40%), 2016 (60%), hingga 2019 (60,4%) (Nurmala & Gunawan, 2020). Salah satu bakteri patogen yang sudah mengalami resistensi adalah *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri patogen gram negatif yang menjadi penyebab infeksi saluran kemih, infeksi luka, infeksi saluran pernafasan bawah pada pasien *immunocompromised* (Mittal *et al*., 2006). Bakteri ini mempunyai

kemampuan untuk hidup dan berkembang biak dalam berbagai lingkungan hidup. Hal ini menyebabkan bakteri ini merupakan agen infeksius yang menyebabkan mudahnya muncul wabah bakteri MDR *(multi drug resistance)* di rumah sakit, khususnya ICU (Lee & Zhang, 2014). Pengembangan dan penelitian lebih lanjut tentang pencarian obat tentunya sangat dibutuhkan untuk mengatasi keganasan bakteri tersebut. Pencarian antibiotik baru bisa bersumber dari fungi yang ada di dalam tanah muara.

Tanah muara sungai adalah ekosistem yang masih terpengaruh oleh ekosistem laut. Misalnya pasang surut, gelombang laut, aliran air tawar dan sedimen dari muara sungai yang mengarah ke laut. Di ekosistem tersebut terkandung berbagai macam fungi (Khandavilli, 2016). Secara ekologis, tanah merupakan sumber yang subur untuk ditumbuhi berbagai macam mikroorganisme yang mampu menghasilkan antimikroba karena adanya persaingan perebutan nutrisi dan wilayah yang kuat (Karwehl & Stadler, 2016). Salah satu contoh kawasan yang berada di bagian muara sungai adalah hutan mangrove.

Ekosistem mangrove merupakan habitat berbagai macam fungi. Fungi ini berperan penting dalam melakukan siklus nutrisi sehingga mampu menyokong ekosistem mangrove. Vegetasi mangrove yang memiliki kondisi ekstrem semacam salinitas tinggi, kecepatan angin tinggi, suhu tinggi serta tanah liat anaerob menuntut mikroorganisme harus mampu bertahan dan menyesuaikan diri (Thatoi *et al*., 2013). Salah satunya dengan memproduksi senyawa antibiotik untuk bersaing dengan mikroorganisme lain.

Kita ketahui bersama bahwa penelitian terhadap potensi tanah muara di Indonesia relatif masih sedikit. Tanah Muara Sungai Desa Kalinaun, Kecamatan Likupang Timur, Kabupaten Minahasa Utara, Provinsi Sulawesi Utara merupakan tanah muara pada ekosistem mangrove yang dapat digunakan sebagai sampel dalam penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri pada *Pseudomonas aeruginosa.* Pengujian antibakteri pada penelitian ini menggunakan menggunakan metode mikrodilusi dengan *single concentration* 100 µg/mL pada metode mikrodilusi. Persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara digunakan sebagai parameter aktivitas antibakteri dalam penelitian ini.

II. METODE

A. Alat

Neraca analitik (OHAUS®), *hot plate* (HEIDOLPH®), *Laminar Air Flow* (THERMO CIENTIFIC® 1300 SERIES A2), *spreader*, autoklaf (B-ONE®), *centrifuge*, *vortex* (GENE-2®), *shaker incubator* (B-ONE®), jarum ose, jangka sorong (TRICLE BRAND®), mikroskop (Digimi

13D®), *micropipet* (SOCOREX®), *microplate 96-well*, *microplate reader* (CORONA SH-100®), *Chamber* KLT (CAMAG®), spektrofotometer (Biobase BK-UV1000®) UV-Vis, corong pisah (SCHOTT DURAN®), dan detektor ultraviolet (SPECTROLINE ENF-240C/FE).

B. Bahan

Tanah muara Sungai Desa Kalinaun, Kecamatan Likupang Timur, Kabupaten Minahasa Utara, Provinsi Sulawesi Utara yang didapat dari bapak Saeful A. Tauladani, air laut, aqua demineral (HYDROBATT), aquabidest steril, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA), *Mueller Hinton Agar* (MERCK), *Mueller Hinton Broth* (HIMEDIA), NaCl 0,9%, etanol 70%, etil asetat pa, DMSO (Emsure), $MgCl_2$ (Brataco), $CaCl_2$ (Sigma), $BaCl_2$, H_2SO_4, gentamisin sulfat, bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, lempeng KLT (Kromatografi Lapis Tipis), silika gel F_{254}, reagen *Dragendorff*, reagen Vanilin-H_2SO_4, reagen $FeCl_3$.

C. Prosedur Kerja

1. Preparasi media

Ada beberapa media yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu media PDA, PDB, PDAC, MHA, dan CAMHB. Media PDA, PDB, dan PDAC digunakan sebagai media pertumbuhan jamur, sedangkan media MHA digunakan untuk peremajaan bakteri uji. Media CAMHB digunakan sebagai basis suspensi bakteri pada pengujian mikrodilusi. Media PDA dibuat dengan melarutkan 9,75 gram PDA dalam 250 mL air laut pada erlenmayer. Media PDB dibuat dengan melarutkan 4,8 gram PDB dalam 200 mL aqua demineral pada erlenmayer. Media PDAC dibuat dengan melarutkan 9,75 gram PDA dalam 250 mL air laut pada erlenmayer. Media MHA dibuat dengan melarutkan 6,8 gram MHA dalam 200 mL air laut pada *erlenmayer*. Media CAMHB merupakan media campuran dari MHB steril dengan dan ditambahkan kation Mg^{2+} sebanyak 225 µL dan kation Ca^{2+} sebanyak 450 µL. Semua media disterilkan menggunakan autoklaf dengan suhu 121℃ selama 15 menit dan semua proses dilakukan secara aseptis dibawah LAF.

2. Preparasi sampel tanah

Sampel tanah yang didapat, diambil secukupnya dan dimasukkan kedalam tabung sentrifus dan disuspensikan dengan menggunakan 10 mL aquabidest steril. Kedua campuran tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 3 menit dan disentrifus dengan kecepatan 1.000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat diambil 100 µL untuk dikultur pada media PDA dan diratakan menggunakan *spreader*. Semua proses dilakukan secara

aseptis diabawah LAF dan biakan yang telah dibuat kemudian diinkubasi pada suhu 28 ± 2˚C selama 7 hari.

3. Isolasi fungi tanah muara

Isolat fungi yang tumbuh kemudian diamati pertumbuhannya secara makroskopis. Isolasi dilakukan dengan cara memindahkan isolat fungi ke media PDA yang baru berdasarkan perbedaan morfologi seperti warna, tekstur, dan bentuk hingga menjadi isolat fungi tunggal.

4. Skrining awal aktivitas antibakteri

Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan uji kontak langsung (Metode difusi) bakteri dengan isolat jamur Proses tersebut dilakukan dengan mengontakkan langsung isolat fungi tanah muara tunggal pada media MHA yang sebelumnya sudah dikultur bakteri uji. Bakteri dikultur dengan menginokulasikan 100 µL suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam NaCl fisiologis ke media MHA. Uji antagonis dilakukan secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 37 ± 2˚C selama 18 – 24 jam.

5. Fermentasi fungi tanah muara

Fermentasi pada penelitian ini menggunakan metode *batch fermentation* dengan memasukkan sejumlah 5 *plug* atau cakram isolat fungi tanah muara tunggal pada media PDA dalam 200 media PDB steril. Campuran yang telah dibuat diinkubasi pada suhu 28 ± 2˚C selama 14 hari dengan bantuan *shaker* kecepatan 125 rpm.

6. Ekstraksi fungi tanah muara

Proses ekstraksi dilakukan pada penelitian ini merupakan ekstraksi partisi cair–cair dengan cara menambahkan pelarut etil asetat kedalam media hasil fermentasi dengan perbandingan 1:1 sebanyak 2–3 kali replikasi. Campuran etil asetat dan hasil fermentasi fungi tanah dipisahkan hingga membentuk dua fase air yang berasal dari media fermentasi dan fase etilasetat yang mengandung ekstrak fungi tanah. Fase etil asetat ditampung kemudian diuapkan dan diambil ekstrak yang dihasilkan, ditimbang bobotnya, dihitung % rendemennya dan disimpan dalam lemari pendingin.

7. Skrining kandungan senyawa

Skrining kandungan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara dengan menggunakan metode KLT. Ekstrak yang didapat dilarutkan menggunakan metanol dan ditotolkan pada lempeng KLT kemudian dieluasi menggunakan eluen diklorometana : metanol (9,5 : 0,5). Lempeng KLT yang telah dieluasi dideteksi dengan penampak noda dragendorff untuk analisis alkaloid, vanilin-H_2SO_4 untuk analisis terpenoid, dan $FeCl_3$ Untuk analisis fenolat.

8. Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode mikrodilusi yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada

CLSI M07-A09 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2012). Konsentrasi suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan adalah 1×10^6 CFU/mL dalam media CAMHB dan pada setiap *well* berisi 50 µLLarutan kontrol positif, kontrol negatif, dan ekstrak yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 50 µL pada setiap sumuran. Kelompok perlakuan pada pengujian ini berisi ekstrak dengan konsentrasi 50 µg/mL yang dilarutkan dalam DMSO 1% sebanyak 50 µL dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 µL. Kontrol ekstrak terdiri dari ekstrak dalam DMSO 1% sebanyak 50 µL dan media CAMHB sebanyak 50 µL. Kontrol positif terdiri dari gentamisin yang dilarutkan dalam media CAMHB dengan konsentrasi akhir 1µg/ml sebanyak 50 µL dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 µL.Kontrol gentamisin terdiri gentamisin yang dilarutkan dalam media CAMHB dengan konsentrasi akhir 1µg/ml sebanyak 50 µL dan media CAMHB tanpa bakteri sebanyak 50 µL . Kontrol negatif ekstrak terdiri dari DMSO 1% dalam media CAMHB sebanyak 50 µL dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 µL. Kontrol DMSO terdiri dari DMSO 1% dan media CAMHB sebanyak 50 µL. Kontrol negatif terdiri dari media CAMHB sebanyak 50 µL dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 µL. Kontrol media terdiri dari media CAMHB sebanyak 100 µL. *Microplate* yang telah berisi larutan uji kemudian diinkubasi pada suhu 35 ± 2˚C selama 18–20 jam dengan bantuan *shaker* kecepatan 120 rpm.

9. Analisis data

Hasil yang didapat dalam pengujian ini adalah nilai absorbansi. Data absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan dalam rumus % penghambatan sebagai berikut:

$$\%\text{Penghambatan: } \frac{1- (Abs\ C - Abs\ D)}{(Abs\ A - Abs\ B)} \times 100\%$$

Keterangan:

Abs: absorbansi

A: kontrol negatif ekstrak/gentamisin

B: kontrol DMSO 1% /media CAMHB

C:larutan uji ekstrak/gentamisin

D: kontrol ekstrak/gentamisin

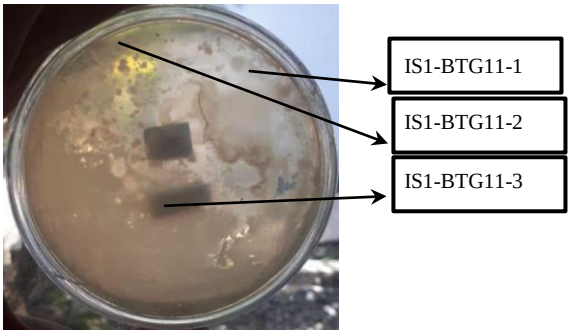
III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Pembiakan dan Isolasi Sampel Fungi

Sampel tanah diambil di desa Kalinaun, Sulawesi Utara dengan tiitk koordinat 1.599379, 125.142623 yang ditunjukkan pada Gambar 1.

Gambar 1. Maps lokasi pengambilan sampel tanah

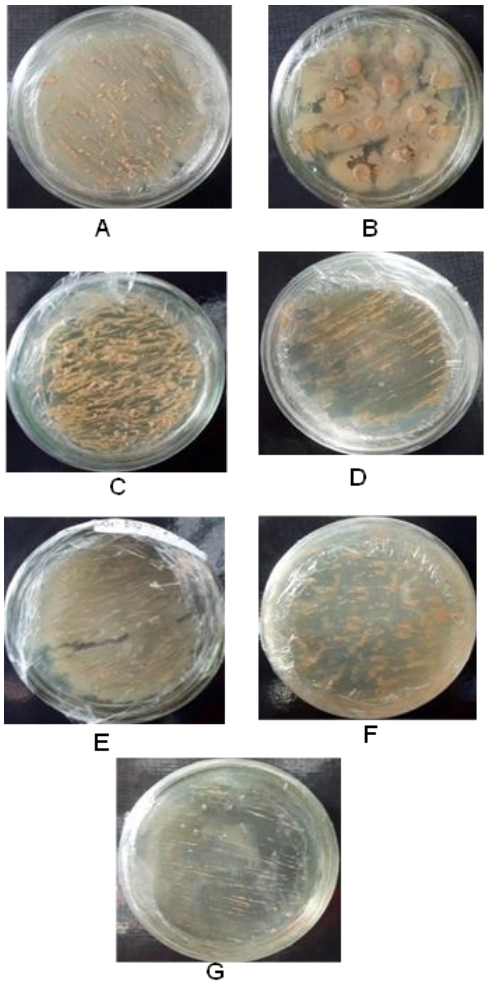
Tanah yang didapatkan dilakukan sentrifugasi dan supernatan yang dihasilkan dari campuran tanah dan air steril kemudian ditumbuhkan dalam media PDA dengan pelarut air laut. Media PDA merupakan media yang cocok untuk penumbuhan fungi, karena kandungan sari pati kentang dan dextrose yang mampu mendorong sporulasi fungi (Nevalainen et al., 2014). Parameter yang diamati selama masa inkubasi adalah variasi pertumbuhan fungi. Variasi fungi yang tumbuh kemudian dipisahkan dengan melakukan isolasi kembali dalam media PDA baru berdasarkan perbedaan morfologis seperti warna, tekstur, dan bentuk (Gambar 1). Secara visual terdapat 3 variasi pertumbuhan fungi dan dari 3 perbedaan tersebut diisolasi ke media PDA baru. Hasil akhir didapat 7 isolat fungi tanah muara seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil biakan awal sampel tanah muara.

B. Identifikasi Makroskopis dan Mikroskopis

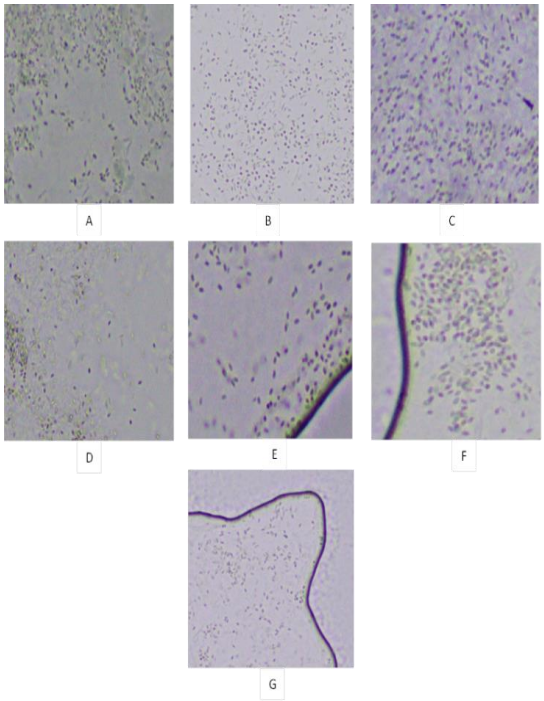
Hasil identifikasi makroskopis dan mikroskopis pada keseluruhan fungi tanah pada penelitian ini adalah jenis fungi *yeast*/khamir yang dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil isolasi sampel fungiberturut-turut (A) IS2-BTG11-1-1; (B) IS2-BTG11-1-2; (C) IS2-BTG11-2-1; (D) IS2-BTG11-2-2; (E) IS2-BTG11-2-3; (F) IS2-BTG11-3-1; (G) IS2-BTG11-3-2

Ciri makroskopis koloni khamir memiliki ciri-ciri permukaan yang halus, tidak berfilamen, tidak mengkilap, serta warna koloni yang bervariasi dari putih, putih kekuningan, hingga kuning. Sedangkan kapang memiliki ciri koloni dengan permukaan yang kasar, berfilamen,

tepinya berwarna lebih pudar dibandingkan dengan bagian pusat koloninya yang berwarna lebih gelap (Hernández-Montiel *et al.*, 2010). Selain itu, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh (Jumiyati *et al.*, 2012). menunjukkan khamir memiliki morfologi koloni yang cenderung berwarna putih susu, putih kekuningan dan bertekstur halus. Sedangkan ciri mikroskopis khamir diantaranya uniseluler, berbentuk bulat, oval. Sel khamir memiliki nukleus karena merupakan organisme eukariotik. (Dangi *et al.*, 2014). Pengamatan mikroskopis menunjukkan bahwa khamir selnya cenderung berbentuk oval hingga bulat (Dangi *et al*., 2014).



Gambar 4. Hasil Mikroskopis isolat aktif berturut-turut (A) IS2-BTG11-1-1; (B) IS2-BTG11-1-2; (C) IS2-BTG11-2-1; (D) IS2-BTG11-2-2; (E) IS2-BTG11-2-3; (F) IS2-BTG11-3-1; (G) IS2-BTG11-3-2

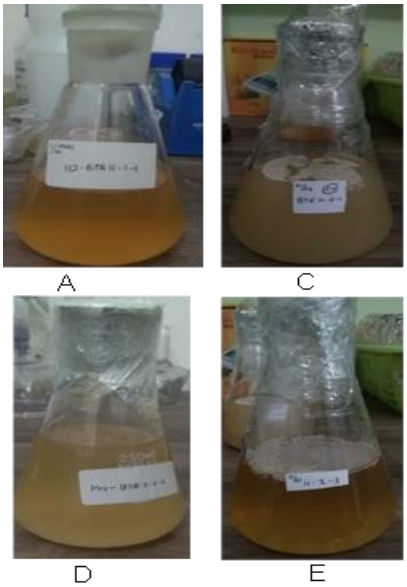
C. Skrining Awal Pengujian Aktivitas Antibakteri

Skrining awal pada penelitian ini mengamati zona bening yang terbentuk disekitar isolat saat dilakukan uji antagonis. Berdasarkan hasil uji antagonis, zona bening yang terbentuk tidak terlalu jelas. Hambatan yang dihasilkan tidak terlalu kuat karena pada pengujian ini hanya mengontakkan isolat fungi dengan jumlah yang kecil pada bakteri uji. Hal tersebut berpengaruh terhadap metabolit sekunder yang dihasilkan, bisa saja metabolit sekunder belum cukup dihasilkan atau konsentrasinya belum cukup untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sara-Ramiez (Dangi *et al*., 2014), hambatan yang dihasilkan dalam bentuk ekstrak pada pertumbuhan bakteri akan jauh lebih besar dibandingkan pada saat masih dalam bentuk isolat fungi. Pada penelitian ini, dari 7 isolat yang terisolasi terdapat 4 isolat aktif yang terdapat dalam Tabel I.

D. Fermentasi dan Ekstraksi Fungi Tanah

Fermentasi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memperbanyak biomassa isolat fungi tanah muara. Pada penelitian kali ini, dipilih metode *batch fermentation* karena prosesnya yang mudah dibandingkan dengan metode fermentasi yang lain yaitu dengan menginokulasikan

langsung fungi tanah muara dalam media pada volume tertentu, selain itu fermentasi pada metode ini resiko kontaminasinya rendah (Jagschies *et al.*, 2018). Media PDB dipilih karena memiliki kandungan pati kentang yang menyediakan unsur nitrogen, vitamin dan mineral yang dibutuhkan dalam pertumbuhan fungi (Swapna & Lalchand, 2016). Selama proses fermentasi dibantu dengan agitasi untuk menghomogenkan nutrisi yang ada pada media menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 125 rpm. Pemilihan waktu 14 hari untuk fermentasi disesuaikan dengan fase logaritmik dan pertumbuhan stasioner pada fungi karena berpengaruh terhadap metabolit sekunder yang dihasilkan, hasil fermentasi bisa dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil fermentasi fungi selama 14 hari. Berturut-turut (A) IS2-BTG11-1-1; (C) IS2-BTG11-2-1; (D) IS2-BTG11-2-2; (E) IS2-BTG11-2-3

Tabel I. Hasil uji antagonis 7 isolat fungi tanah muara umur 7 hari terhadap bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* pada media MHA dengan suhu 37°C selama 24 jam

Nama Fungi	Hasil Uji	Zona Hambat (mm)
IS2-BTG11-1-1	+	16,87
IS2-BTG11-1-2	-	-
IS2-BTG11-2-1	+	8,67
IS2-BTG11-2-2	+	10,75
IS2-BTG11-2-3	+	8,75
IS2-BTG11-3-1	-	-
IS2-BTG11-3-2	-	-

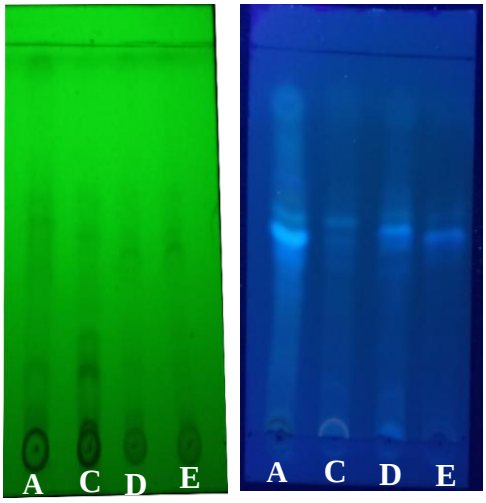
Metabolit sekunder dan enzim dihasilkan oleh isolat fungi selama proses fermentasi berlangsung yang ditandai dengan perubahan warna pada media PDB (Swapna & Lalchand, 2016).

Ekstraksi merupakan suatu proses untuk menyaring metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat fungi selama proses fermentasi. Digunakan etil asetat sebagai pelarut dalam proses ekstraksi karena sifatnya yang kurang toksik, mudah menguap, dan semi polar sehingga diharapkan dapat menarik metabolit sekunder yang bersifat polar maupun nonpolar dengan maksimal. Dari proses ekstraksi didapat 2 fase, yaitu fase air dan fase etil asetat. Fase etil asetat ditampung dalam mangkok dan diuapkan hingga didapat ekstrak fermentasi isolat fungi tanah muara. Ekstrak yang dihasilkan kemudian dimasukkan ke dalam

vial dan dihitung % rendemennya. Hasil perhitungan % rendemen ekstrak etil asetat fungi tanah muara dapat dilihat pada Tabel II.

E. Skrining Kandunga Senyawa

Skrining kandungan senyawa pada ekstrak isolat fungi tanah muara dilakukan untuk mendeteksi golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat. Dari hasil optimasi eluen didapatkan eluen diklorometana : metanol (9,5 : 0,5) dan hasil elusi golongan senyawa menggunakan lempeng KLT pada panjang gelombang 254 nm dan 365 nm ditunjukkan pada Gambar 6 dengan nilai Rf secara berurutan (A) 0,625; (B) 0,65; (D) 0,575; (E) 0,55 . Kondisi analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah fase diam lempeng KLT F_{254}, fase gerak diklorometana : metanol (9,5 : 0,5), jarak pengembangan 4 cm, penampak noda Dragendorff, vanilin H_2SO_4, dan $FeCl_3$. Tabel III menunjukkan hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak isolat fungi tanah muara.



a b

Gambar 6. Hasil elusi ekstrak etil asetat menggunakan eluen diklorometana : metanol (9,5 : 0,5). Panjang gelombang secara berurutan (a) 254 nm dan (b)365 nm

Tabel II. . Data persen rendemen ekstrak etil asetat enam isolat fungi tanah muara

Sampel	Volume media (mL)	Bobot ekstrak (g)	Pesen rendemen (%g/mL)
IS2-BTG11-1-1	200	0,0195	0,0096
IS2-BTG11-2-1	200	0,026	0,013
IS2-BTG11-2-2	200	0,228	0,114
IS2-BTG11-2-3	200	0,182	0,091

Tabel III. Identifikasi golongan senyawa ekstrak etil asetat fungi tanah muara

Sampel	Hasil Uji	
	Alkaloid	**Terpenoid/ Steroid**
IS2-BTG11-1-1	-	+
IS2-BTG11-2-1	-	+
IS2-BTG11-2-2	-	+
IS2-BTG11-2-3	-	+
IS2-BTG11-1-1	-	+

F. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara yang diuji terhadap bakteri Pseudomonas aeruginosa. Digunakan metode pengujian mikrodilusi untuk mendapatkan data % penghambatan sesuai dengan protokol *pada Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Media CAMHB (*Cation Adjusted Mueller Hinton Broth*) digunakan pada pengujian ini sebagai standarisasi kadar kation seperti Mg2+ dan Ca2+ dalam media *Mueller Hinton Broth*. Adanya kation sangat berpengaruh terhadap pengujian aktivitas antibakteri karena dapat mempengaruhi integritas membran sel bakteri.Kontrol positif dan kontrol negatif dalam pengujian diperlukan sebagai pembanding hasil pengujian.Pada penelitian ini digunakan gentamisin sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif. Sesuai dengan persyaratan pada CLSI, konsentrasi gentamisin yang digunakan adalah 1 µg/mL dengan % penghambatan pada metode pengujian mikrodilusi ≥ 80%. Tabel 4 merupakan hasil % penghambatan dari gentamisin sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif terhadap bakteri Pseudomonas aeruginosa.

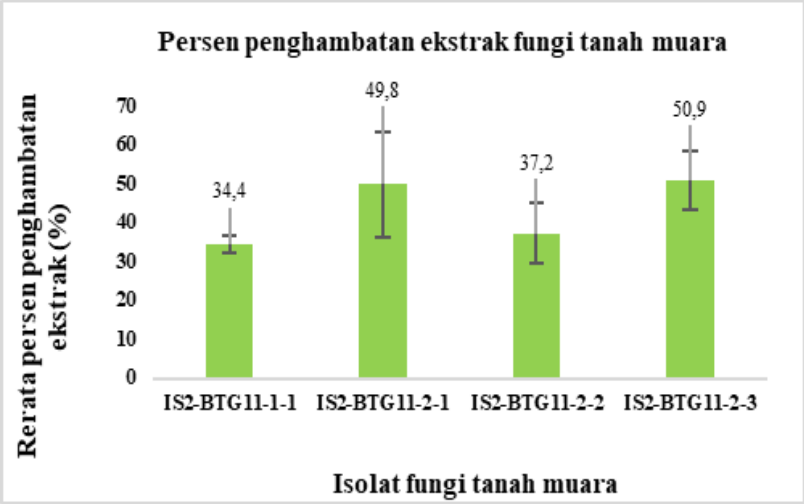
DMSO sebagai kontrol negatif juga digunakan sebagai kosolven ekstrak etil asetat dalam media CAMHB. Sesuai dengan protokol yang ditetapkan pada CLSI, konsentrasi DMSO yang digunakan adalah 1%. Hal ini dikarenakan DMSO termasuk kosolven surfaktan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri apabila konsentrasinya melebihi 1%. Hasil % penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara dicantumkan pada Tabel IV dan diagram batang pada Gambar 7.

Tabel IV. Tabel penghambatan ekstrak fungi tanah muara

Kode Fungi	Rerata Penghambatan Pertumbuhan Bakteri (%)	SD	CV (%)
Kontrol Positif	97,8	0,5	0,5
Kontrol Negatif	14,8	2,4	16,4
IS2-BTG11-1-1	34,4	2,4	17,8
IS2-BTG11-2-1	49,8	13,5	27,1
IS2-BTG11-2-2	37,2	7,7	20,7
IS2-BTG11-2-3	50,9	7,6	15,0

Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi ekstrak etil asetat fungi tanah muara memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapat hasil persen penghambatan tertinggi yaitu pada ekstrak dengan kode IS2-BTG11-2-3 sebesar 50,9% ± 7.6. Sedangkan nilai penghambatan terkecil ada pada isolat IS2-BTG11-1-1 sebesar 34,4% ± 2,4. Ekstrak dengan nilai persen penghambatan lebih dari 50% diduga memiliki nilai IC_{50} berada di bawah 50 µg/ml sehingga sampel IS2-BTG11-2-3 dapat diteliti lebih lanjut untuk dilakukan isolasi senyawa aktif dan penentuan IC_{50}.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia terhadap ekstrak etil asetat fungi tanah muara, keempat ekstrak dapat dipastikan mengandung senyawa golongan terpenoid. Keempat ekstrak tersebut ada pada sampel IS2-BTG11-1-1, IS2-BTG11-2-1, IS2-BTG11-2-2, IS2-BTG11-2-3. Senyawa tunggal yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri belum secara pasti diketahui. Maka, diperlukan isolasi dan karakterisasi senyawa aktif ekstrak fungi. Fungi memiliki beberapa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri, di antaranya alkaloid, terpenoid, steroid, poliketida, lipid dan peptida (Rateb & Ebel, 2011). Terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang diproduksi oleh tumbuhan. Selain pada tumbuhan, terpenoid juga ditemukan pada beberapa jenis fungi, salah satunya fungi *marine*. Terpenoid yang dihasilkan *marine fungi* memiliki berbagai macam aktivitas biologis seperti sitotoksik,antibakteri, antifungi, antivirus, antiinflamasi, dan inhibitor aktivitas enzim (Jiang *et al*., 2020). Terpenoid memiliki efek melemahkan dinding sel bakteri hingga sel bakteri menjadi lisis (Di Pasqua *et al.*, 2007). Terpenoid yang diisolasi dari tanaman *Aspergillus versicolor* memiliki mekanisme antibakteri dengan menipiskan *lipid bilayer membrane*, sehingga berakibat pada rusaknya membran sel dan sel menjadi lisis (Harnvoravongchai *et al*., 2018).



Gambar 7. Diagram batang nilai persen penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara Desa Kalinaun Sulawesi Utara

IV.KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan, ada empat isolat yang memiliki aktivitas anti-bakteri berdasarkan uji antagonis yaitu: IS2-BTG11-1-1, IS2-BTG11-2-1, IS2-BTG11-2-2, IS2-BTG11-2-3. Berdasarkan skrining golongan senyawa ekstrak fungi tanah muara, menunjukkan hasil positif pada uji terpenoid. Namun menunjukkan hasil negatif pada uji alkaloid. Nilai penghambatan ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* berturut-turut terbesar hingga terkecil : IS2-BTG11-2-3 (50,9% ± 7,6); IS2-BTG11-2-1 (49,8% ± 13,5); IS2-BTG11-1-1 (34,4% ± 2,4); IS2-BTG11-2-2 (37,2% ± 7,7).

KONFLIK KEPETINGAN

Seluruh penulis menyatakan bahwa tidak ada konflik kepentingan dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ; Approved Standard — Ninth Edition* (Vol. 32, Issue 2). Pennsylvania.

Dangi, P., Sharma, M., & Choudhary, M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications. In *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* (Vol. 3, Issue 2). http://www.ijcmas.com

Di Pasqua, R., Betts, G., Hoskins, N., Edwards, M., Ercolini, D., & Mauriello, G. (2007). Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(12), 4863–4870. https://doi.org/10.1021/jf0636465

Harnvoravongchai, P., Chankhamhaengdecha, S., Ounjai, P., Singhakaew, S., Boonthaworn, K., & Janvilisri, T. (2018). Antimicrobial effect of asiatic acid against Clostridium difficile

is associated with disruption of membrane permeability. *Frontiers in Microbiology*, *9*(SEP), 2125. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02125

Hernández-Montiel, L. G., Ochoa, J. L., Troyo-Diéguez, E., & Larralde-Corona, C. P. (2010). Biocontrol of postharvest blue mold (Penicillium italicum Wehmer) on Mexican lime by marine and citrus Debaryomyces hansenii isolates. *Postharvest Biology and Technology*, *56*(2), 181–187. https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2009.12.010

Jagschies, G., Lindskog, E., Lacki, K., & Galliher, P. (2018). *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. https://www.google.com/books?hl=id&lr=&id=b9F1DQAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Biopharmaceutical+Processing:+Development,+Design,+and+Implementation+of+Manufacturing+Processes.+Development,+Desain,+and+Implementation+of+Manufacturing+Processes&ots=B9VWD0bhDJ&sig=08wOTsA_ZpJfvS6hvlijPwhUa8A

Jiang, M., Wu, Z., Guo, H., Liu, L., & Chen, S. (2020). A Review of Terpenes from Marine-Derived Fungi: 2015–2019. *Marine Drugs*, *18*(6), 321. https://doi.org/10.3390/md18060321

Jumiyati, Bintari, S. H., & Mubarok, I. (2012). ISOLASI DAN IDENTIFIKASI KHAMIR SECARA MORFOLOGI DI TANAH KEBUN WISATA PENDIDIKAN UNIVERSITAS NEGERI SEMARANG. *Biosaintifika: Journal of Biology & Biology Education*, *4*(1). https://doi.org/10.15294/biosaintifika.v4i1.2265

Karwehl, S., & Stadler, M. (2016). Exploitation of fungal biodiversity for discovery of novel antibiotics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *398*, 303–338. https://doi.org/10.1007/82_2016_496

Khandavilli, R. (2016). Fungal phylogenetic diversity in estuarine sediments of Gautami Godavari River, Andhra Pradesh, India. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, *6*(4), 268–276. https://doi.org/10.5943/cream/6/4/4

Lee, J., & Zhang, L. (2014). The hierarchy quorum sensing network in Pseudomonas aeruginosa. *Protein and Cell*, *6*(1), 26–41. https://doi.org/10.1007/s13238-014-0100-x

Mittal, R., Khandwaha, R. K., Gupta, V., & P. K. M., & Harjai, K. (2006). Phenotypic characters of urinary isolates of Pseudomonas aeruginosa & their association with mouse renal colonization. *Indian J Med Res*, *123*, 67–72. https://www.researchgate.net/publication/7211187_Phenotypic_characters_of_urinary_isolates_of_Pseudomonas_aeruginosa_their_association_with_mouse_renal_colonization

Murray, C. J. L., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., & others. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655.

Nevalainen, H., Kautto, L., & Te'O, J. (2014). Methods for isolation and cultivation of filamentous fungi. *Methods in Molecular Biology*, *1096*, 3–16. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-712-9_1

Rateb, M. E., & Ebel, R. (2011). Secondary metabolites of fungi from marine habitats. In *Natural Product Reports* (Vol. 28, Issue 2, pp. 290–344). The Royal Society of Chemistry. https://doi.org/10.1039/c0np00061b

Swapna, P. K., & Lalchand, P. D. (2016). Fungal biodiversity of a library and

cellulolytic activity of some fungi. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, *78*(6), 849–854. https://doi.org/10.4172/pharmaceutical-sciences.1000193

Thatoi, H., Behera, B. C., & Mishra, R. R. (2013). Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: A review. *Mycology*, *4*(1), 54–71. https://doi.org/10.1080/21501203.2013.785448

World Health Organization. (2020). *The Top 10 Cause of Death*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death

World Health Organization. (2022). *WHO Coronavirus (Covid-19) Dashboard*. https://covid19.who.int/