



Isolasi dan Skrining Aktivitas Antibakteri Fungi Tanah Muara Desa Katialada Gorontalo Lokasi Satu terhadap *Staphylococcus aureus*

Isolation and Antibacterial Activity Screening of Soil Fungi in the Estuary of Katialada Gorontalo, Location One Against Staphylococcus aureus

Wilda Nur Rohmatillah, Muhammad Zainul Arifin, Saeful Akhmad Tauladani, Gani Asri Muharam, Asia Asia, Dwi Koko Pratoko, Ari Satia Nugraha*

Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Negeri Jember, Jember, Indonesia

*E-mail: arisatia@unej.ac.id

Abstrak

Resistensi antibiotik menjadi penghalang dalam pengendalian penyakit infeksi sehingga alternatif penemuan antibiotik baru perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi metabolit sekunder isolat fungi tanah muara Desa Katialada Gorontalo Lokasi Satu sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Parameter antibakteri yang diamati adalah persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*. Sampel tanah muara dikultur dalam media PDA dan diisolasi hingga menjadi isolat fungi tunggal. Lima isolat fungi tunggal yang dibedakan berdasarkan warna, tekstur, serta bentuk dan diberi kode IS2-BTG-4.1.1, IS2-BTG-4.1.2, IS1-BTG-4.2, IS2-BTG4.3.1, dan IS2-BTG-4.3.2. Kelima isolat fungi tanah muara difermentasi menggunakan media PDB dan hasil fermentasi diekstraksi dengan pelarut etil asetat. Ekstrak yang diperoleh diskriminasi kandungan senyawanya menggunakan lempeng KLT dan dilakukan pengujian antibakteri dengan konsentrasi tunggal 100 µg/mL pada metode mikrodilusi. Kelima ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara mengandung senyawa golongan terpenoid dan isolat dengan kode IS2-BTG-4.3.2 juga mengandung senyawa golongan alkaloid. Kelima ekstrak etil asetat hasil fermentasi isolat fungi tanah muara memiliki aktivitas penghambatan pada pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan persen penghambatan pada ekstrak IS2-BTG-4.1.1 sebesar 50,2% ± 14,8%, IS2-BTG-4.1.2 35,6% ± 12,9%, IS1-BTG-4.2 13,0% ± 7,3%, IS2-BTG-4.3.1 13,6% ± 6,0%, dan IS2-BTG-4.3.2 sebesar 12,4% ± 9,2%.

Abstract

The emergence of antibiotic resistance becomes a barrier in controlling infectious diseases, so it is necessary to find new alternative antibiotics. This study aimed to explore the potential of estuarine soil fungals secondary metabolites isolated from Katialada Village Gorontalo Location One and test their antibacterial activity against Staphylococcus aureus. The antibacterial parameter observed was the percent inhibition of ethyl acetate extracts against Staphylococcus aureus. The estuarine soil samples were cultured in PDA media producing five single fungal isolates differentiated based on color morphology, texture, and shape coded IS2-BTG-4.1.1, IS2-BTG-4.1.2, IS1-BTG-4.2, IS2-BTG4.3.1, and IS2-BTG-4.3.2. Those five samples were fermented using PDB media and the fermented products were extracted with ethyl acetate. The extracts were screened for its compound using a TLC plate and antibacterial testing with a single concentration of 100 g/mL in the microdilution method. The screening results showed that the five ethyl acetate extracts contained terpenoid compounds and code IS2-BTG-4.3.2 also had alkaloids. Based on the antibacterial test results, the five ethyl acetate extracts had growth inhibitory activity on the Staphylococcus aureus, with the percentage showed by IS2-BTG-4.1.1 50,2% ± 14,8%, IS2-BTG-4.1.2 35,6% ± 12,9%, IS1-BTG-4.2 13,0% ± 7,3%, IS2-BTG-4.3.1 13,6% ± 6,0%, and IS2-BTG-4.3.2 by 12,4% ± 9,2%.

Kata kunci:

Antibakteri;
Staphylococcus aureus; Isolasi
fungi tanah

Keywords:

Antibacterial;
Staphylococcus aureus; Soil fungi
isolation

Received:

22-04-2022

Revised:

04-07-2022

Accepted:

18-07-2022

Jurnal Kefarmasian
Indonesia,
2022;12(2):99-108

DOI:

<https://doi.org/10.22435/jki.v12i2.5978>

PENDAHULUAN

Salah satu masalah kesehatan yang menjadi perhatian khusus adalah penyakit infeksi. Penyakit infeksi merupakan penyakit yang disebabkan karena adanya infeksi oleh mikroorganisme patogen dalam tubuh yang disertai atau tanpa gejala.¹ Berdasarkan data *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) 2020, terdapat 10 peringkat teratas penyakit penyebab kematian terbesar di Indonesia dan 7 di antaranya adalah penyakit infeksi.² Pengendalian penyakit infeksi dilakukan menggunakan agen yang dikenal sebagai antibiotik. Tantangan terbesar untuk mengendalikan penyakit infeksi adalah adanya resistensi antibiotik. World Health Organization WHO menyatakan bahwa pada tahun 2014 angka kematian akibat resistensi antibiotik di seluruh dunia sebesar 700.000 jiwa per tahun. Angka tersebut diperkirakan meningkat hingga 10 juta jiwa pada tahun 2050 apabila tidak dikendalikan.³

Salah satu bakteri yang resisten terhadap antibiotik adalah bakteri *Staphylococcus aureus*, yang resisten hanya dalam waktu 2 tahun setelah pengenalan penisilin dengan MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) sebagai bentuk resistensinya.⁴ Adanya pengembangan obat baru yang efektif dan terjangkau untuk mengobati infeksi bakteri perlu dilakukan untuk mencegah adanya resistensi.¹ Sumber utama antibiotik di masa lalu adalah senyawa bahan alam dan dibuktikan dengan penemuan antibiotik β -laktam yang berasal dari mikroorganisme lalu diikuti dengan penemuan aminoglikosida, poliketida, glikopeptida, dan golongan antibiotik lainnya.⁵

Eksplorasi tanah dalam penyaringan mikroorganisme yang mampu menghasilkan senyawa bioaktif telah direkomendasikan. Antibiotik seperti β -laktam, streptomisin, aminoglikosida, dan tetrasiklin diproduksi oleh bakteri dan fungi tanah.⁶ Fungi tanah secara metabolik sangat aktif dan mampu menghasilkan banyak zat seperti metabolit sekunder dan pigmen.⁷

Salah satu ekosistem tanah yang berpotensi dalam penemuan senyawa baru dengan keberadaan mikroorganisme khususnya fungi adalah tanah muara. Mangrove merupakan salah satu ekosistem yang sering dijumpai pada tanah muara. Perbedaan salinitas memberikan pengaruh terhadap komunitas fungi rizosfer di ekosistem mangrove.⁸ Kondisi atipikal akar mangrove dapat membuat habitat yang kaya akan nutrisi sehingga memungkinkan kolonisasi mikroorganisme yang beragam khususnya fungi.⁹

Berdasarkan uraian di atas, fungi tanah sangat berpotensi untuk dijadikan sebagai agen antibiotik baru dalam menangani resistensi antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menggali potensi fungi tanah muara yang berlokasi di Desa Katialada Gorontalo lokasi satu dalam menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan *single concentration* 100 $\mu\text{g/mL}$ pada metode mikrodilusi. Persen penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara digunakan sebagai parameter aktivitas antibakteri dalam penelitian ini.

METODE

Alat

Neraca analitik (OHAUS®), *hot plate* (HEIDOLPH®), *Laminar Air Flow* (LAF) (THERMO SCIENTIFIC® 1300 SERIES A2), spreader, autoklaf (B-ONE), *centrifuge, vortex* (GENE-2®), *shaker incubator* (B-ONE®), jarum ose, jangka sorong (TRICLE BRAND®), mikroskop, *micropipet* (SOCOREX®), *microplate 96-well, microplate reader* (CORONA® SH-100), Lempeng Kromatografi Lapis Tipis (KLT), *Chamber KLT* (CAMAG®), spektrofotometer UV-Vis, corong pisah (SCHOTT DURAN®), dan detektor ultraviolet.

Bahan

Tanah muara Desa Katialada, Kecamatan Kwandang, Kabupaten Gorontalo Utara, Provinsi Gorontalo lokasi satu, air laut, aqua demineral

(HYDROBATT®), aquabidest steril, *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA®), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (HIMEDIA®), *Mueller Hinton Agar* (MHA) (MERCK®), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (HIMEDIA®), *Cation Adjusted Mueller* (CAMHB), NaCl 0,9%, etanol 70%, etil asetat pa, DMSO (Emsure®), MgCl₂ (Brataco®), CaCl₂ (Sigma®), BaCl₂, H₂SO₄, gentamisin sulfat, bakteri *Staphylococcus aureus*, lempeng KLT (Kromatografi Lapis Tipis) silika gel F₂₅₄, reagen Dragendorff, reagen Vanilin-H₂SO₄, reagen FeCl₃.

Preparasi media

Media yang digunakan pada penelitian ini diantaranya yaitu media PDA, PDB, MHA, MHB, dan CAMHB. 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 MHA dibuat dengan melarutkan 6,8 gram MHA dalam 200 mL air laut pada erlenmayer. Media MHB dibuat dengan melarutkan 4,2 gram MHB dalam 200 mL air laut pada erlenmayer. Media CAMHB merupakan media MHB steril yang ditambahkan kation Mg²⁺ sebanyak 225 µL dan kation Ca²⁺ sebanyak 450 µL. Semua proses dilakukan secara aseptis di bawah LAF.

Preparasi sampel tanah

Sampel tanah didapat dari Desa Katialada, Kecamatan Kwandang, Kabupaten Gorontalo Utara, Provinsi Gorontalo lokasi satu. Sampel tanah, 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 1000 rpm selama 10 menit. Supernatan yang didapat diambil 100 µL untuk dikultur pada media PDA dan diratakan menggunakan *spreader*. Semua proses dilakukan secara aseptis dibawah LAF dan biakan yang telah dibuat kemudian diinkubasi pada suhu 28 ± 2°C

selama 7 hari. Pemilihan suhu 28 ± 2°C disesuaikan dengan suhu optimum dalam pertumbuhan fungi yaitu pada suhu 25 – 30°C.¹⁰

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.

Skrining awal aktivitas antibakteri

Skrining awal aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode uji antagonis atau uji kontak langsung. 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 *Staphylococcus aureus* dalam NaCl fisiologis ke media MHA. Uji antagonis dilakukan secara aseptis dan diinkubasi pada suhu 37 ± 2°C selama 18 – 24 jam.¹¹

Fermentasi fungi tanah muara

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

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. Etil asetat yang didapat dari proses ekstraksi diuapkan dan diambil ekstrak yang dihasilkan, ditimbang bobotnya, dihitung rendemennya dan disimpan.

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 (9:1). Lempeng KLT yang telah dieluasi dideteksi dengan penampak noda dragendorff, vanilin-H₂SO₄, dan FeCl₃. Reagen vanillin-H₂SO₄ digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa golongan terpenoid yang ditandai dengan noda berwarna ungu. Reagen FeCl₃ digunakan untuk mendeteksi adanya senyawa golongan fenolat yang ditandai dengan noda berwarna hitam.¹²

Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode mikrodilusi yang dilakukan pada penelitian ini mengacu pada CLSI M07-A09.¹³ Konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan adalah 1×10^6 CFU/mL dalam media CAMHB dan pada setiap sumuran berisi 50 μ L. Larutan kontrol positif, kontrol negatif, dan ekstrak yang digunakan pada penelitian ini sebanyak 50 μ L pada setiap sumuran. Kelompok perlakuan pada pengujian ini berisi ekstrak dalam DMSO 1% sebanyak 50 μ L dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol ekstrak terdiri dari ekstrak dalam DMSO 1% sebanyak 50 μ L dan media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol positif terdiri dari gentamisin dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol gentamisin terdiri dari gentamisin dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L dan media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol negatif ekstrak terdiri dari DMSO 1% dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol DMSO terdiri dari DMSO 1% dalam media CAMHB dan media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari media CAMHB sebanyak 50 μ L dan bakteri dalam media CAMHB sebanyak 50 μ L. Kontrol media terdiri dari media CAMHB sebanyak 100 μ L. *Microplate* yang telah berisi larutan uji kemudian diinkubasi pada suhu $35 \pm 2^\circ\text{C}$ selama 18 – 20 jam dengan bantuan *shaker* kecepatan 120 rpm.

Analisis data

Hasil yang didapat dalam pengujian ini adalah nilai absorbansi. Data absorbansi yang didapat kemudian dimasukkan dalam rumus 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% /media CAMHB

C : larutan uji ekstrak/gentamisin

D : kontrol ekstrak/gentamisin

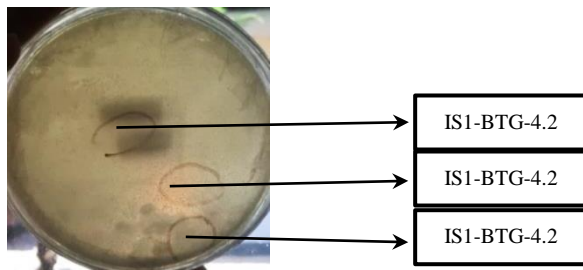
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pembiakan dan isolasi fungi tanah muara

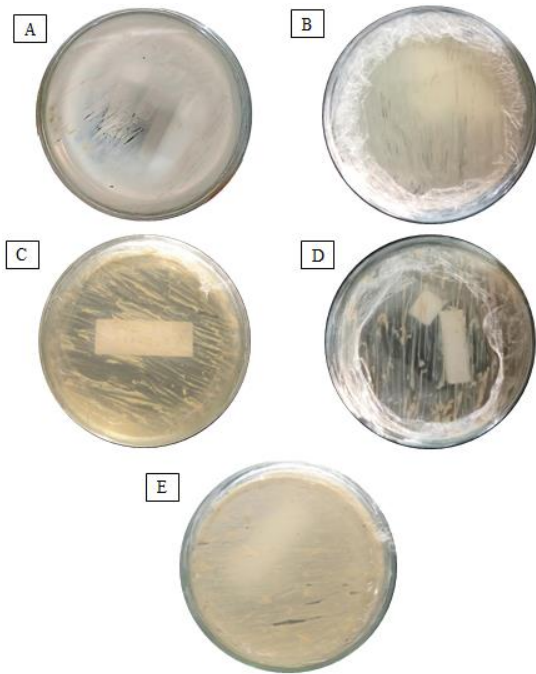
Supernatan yang dihasilkan dari campuran tanah dan air steril kemudian ditumbuhkan dalam media PDA dengan pelarut air laut. Media PDA merupakan media yang cocok untuk penumbuhan fungi, karena kandungan sari pati kentang dan dextrose yang mampu mendorong sporulasi fungi.¹⁴ Parameter yang diamati selama 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 5 isolat fungi tanah muara seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2 dan karakteristik makroskopis dari masing-masing isolat fungi tanah muara dapat dilihat pada Tabel 1.

Identifikasi makroskopis dan mikroskopis

Hasil identifikasi makroskopis dan mikroskopis fungi tanah pada penelitian ini adalah jenis fungi *yeast*. Fungi *yeast* merupakan fungi dengan karakteristik terdiri dari sel soliter dengan bentuk bulat hingga oval dan tumbuh mirip seperti koloni bakteri.¹⁵



Gambar 1. Penumbuhan fungi tanah pertama kali pada media PDA



Gambar 2. Hasil isolasi fungi tanah muara terdapat lima isolat; (a) IS2-BTG-4.1.1, (b) IS2-BTG-4.1.2, (c) IS1-BTG-4.2, (d) IS2-BTG-4.3.1, (e) IS2-BTG-4.3.2

Tabel 1. Karakteristik makroskopis isolat fungi tanah muara

Isolat	Karakteristik
IS2-BTG-4.1.2	Putih susu, kasar, keruh
IS1-BTG-4.2	Kuning pucat, halus, kental
IS2-BTG-4.3.1	Putih kekuningan, halus, kering
IS2-BTG-4.3.2	Putih kekuningan, halus, keruh

Morfologi makroskopis *yeast* pada penelitian yang dilakukan oleh Nurcholis M., dkk¹⁶ tentang isolasi dan karakteristik *yeast* pada buah lokal di Indonesia berwarna putih, halus, mengkilap, dan keruh, sedangkan morfologi mikroskopis berbentuk oval dan bulat. Penelitian lain

juga menunjukkan bahwa bentuk mikroskopis dari *yeast* adalah oval hingga bulat.¹⁷ Pada penelitian ini karakteristik fungi yang didapat memiliki struktur sel soliter, berbentuk oval, dan tumbuh mirip seperti koloni bakteri. Secara kasat mata, perbedaan morfologi makroskopis antara kelima isolat memiliki penampakan yang berbeda. Hal ini dimungkinkan bahwa spesies fungi yang berbeda pada setiap isolat, namun perlu dilakukan pembuktian bahwa isolat tersebut benar-benar merupakan spesies fungi yang berbeda dengan menggunakan analisis filogenik.

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 *S. aureus*. Hal ini dibuktikan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sara-Ramiez, dkk yang melaporkan bahwa hambatan yang dihasilkan dalam bentuk ekstrak pada pertumbuhan bakteri akan jauh lebih besar dibandingkan pada saat masih dalam bentuk isolat fungi.¹⁸

Fermentasi dan ekstraksi fungi tanah

Fermentasi merupakan suatu proses yang bertujuan untuk memperbanyak biomassa isolat fungi tanah muara. dipilih metode *batch fermentation* karena prosesnya yang mudah dibandingkan dengan metode fermentasi yang lain, selain itu fermentasi pada metode ini resiko kontaminasinya rendah.¹⁹ Media PDB dipilih karena memiliki kandungan pati kentang yang menyediakan unsur nitrogen, vitamin dan mineral yang dibutuhkan dalam pertumbuhan fungi.²⁰ 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 3. Metabolit sekunder dan enzim dihasilkan oleh isolat fungi selama proses fermentasi berlangsung yang ditandai dengan perubahan warna pada media PDB.²⁰



Gambar 3. Hasil fermentasi selama 14 hari isolat fungi tanah muara

Ekstraksi merupakan suatu proses untuk menyaring metabolit sekunder yang dihasilkan oleh isolat fungi selama proses fermentasi. Etil asetat digunakan 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. Hasil perhitungan persentase rendemen ekstrak etil asetat fungi tanah muara dapat dilihat pada Tabel 2.

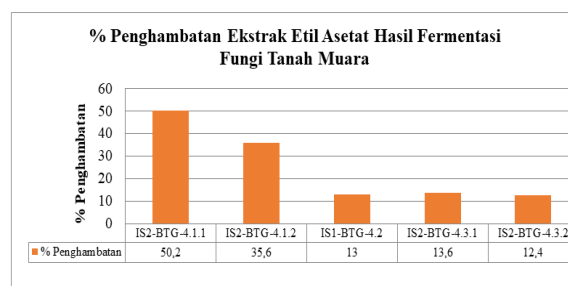
Perbedaan kondisi, perlakuan, jumlah kultur fungi, spesies fungi, dan jenis senyawa yang terkandung dalam fungi tanah dapat berpengaruh terhadap persentase rendemen yang dihasilkan. Ekstrak dengan kode isolat fungi IS2-BTG-4.3.2 merupakan ekstrak dengan persentase rendemen tertinggi (0,266%) dan IS2-BTG-4.3.1 merupakan ekstrak dengan persentase rendemen terkecil (0,009%).

Tabel 2. Persentase rendemen ekstrak etil asetat fungi tanah muara

Kode Fungi	Volume Media (mL)	Bobot Ekstrak (g)	Rendemen (%)
IS2-BTG-4.1.1	190	0,019	0,01
IS2-BTG-4.1.2	178	0,261	0,146
IS1-BTG-4.2	186	0,027	0,014
IS2-BTG-4.3.1	180	0,017	0,009
IS2-BTG-4.3.2	172	0,459	0,266

Skrining kandungan senyawa

Skrining kandungan senyawa pada ekstrak isolat fungi tanah muara dilakukan untuk mendeteksi golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat. Hasil optimasi eluen menunjukkan eluen yang optimum adalah diklorometana : metanol (9 : 1) dan hasil elusi lempeng KLT seperti pada Gambar 4.



Gambar 4. Diagram batang penghambatan (%) ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Kondisi analisis yang digunakan pada penelitian ini adalah fase diam lempeng KLT F₂₅₄, fase gerak diklorometana: metanol (9:1), jarak pengembangan 4 cm, penampak noda dragendorff, vanilin H₂SO₄, dan FeCl₃. Tabel 3 menunjukkan hasil identifikasi golongan senyawa pada ekstrak isolat fungi tanah muara.

Tabel 3. Identifikasi golongan senyawa ekstrak etil asetat fungi tanah muara

Kode Ekstrak Fungi	Hasil Uji		
	Alkaloid	Terpenoid/ Steroid	Fenolat
IS2-BTG-4.1.1	-	+	-
IS2-BTG-4.1.2	-	+	-
IS1-BTG-4.2	-	+	-
IS2-BTG-4.3.1	-	+	-
IS2-BTG-4.3.2	+	+	-

Uji aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan ekstrak etil asetat isolat fungi tanah muara yang diuji terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. 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 Mg^{2+} dan Ca^{2+} dalam media *Mueller Hinton Broth*. Adanya kation sangat berpengaruh terhadap pengujian aktivitas antibakteri karena dapat mempengaruhi integritas membran sel bakteri.²¹

Kontrol positif dan kontrol negatif dalam pengujian pasti diperlukan agar didapat data hasil yang baik. Oleh karena itu, 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 $\geq 80\%$ dan apabila tidak sesuai dengan persyaratan perlu dilakukan penyesuaian kadar kation dalam media kembali.¹³ Pada penelitian ini, penyesuaian kadar kation tidak perlu dilakukan karena konsentrasi kontrol negatif yang digunakan sudah sesuai dan nilai penghambatan (%) yang didapat oleh kontrol positif $\geq 80\%$. Tabel 3 merupakan hasil penghambatan (%) dari gentamisin sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. 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%.¹³ Hal ini dikarenakan DMSO termasuk kosolven surfaktan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri apabila konsentrasinya melebihi 1%.²² Aktivitas penghambatan ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara dicantumkan

pada Tabel 4 dan diagram batang pada Gambar 4.

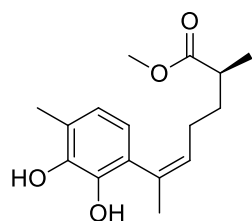
Tabel 4. Rerata Penghambatan kontrol + dan kontrol -, dan ekstrak etil asetat fungi tanah muara terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

Kode Kontrol dan Fungi	Rerata		
	Penghambatan Pertumbuhan Bakteri (%)	SD (%)	CV (%)
Kontrol + (Gentamisin)	99,3	0,6	0,6
Kontrol - (DMSO)	8,5	1,1	13,4
IS2-BTG-4.1.1	50,2	7,4	14,8
IS2-BTG-4.1.2	35,6	4,6	12,9
IS1-BTG-4.2	13,0	1,0	7,3
IS2-BTG-4.3.1	13,6	0,8	6,0
IS2-BTG-4.3.2	12,4	1,1	9,2

Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri dengan metode mikrodilusi ekstrak etil asetat fungi tanah muara memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* didapat nilai penghambatan (%) tertinggi yaitu pada ekstrak dengan kode IS2-BTG-4.1.1 ($50,2 \pm 14,8\%$) dan penghambatan (%) terendah adalah ekstrak dengan kode IS2-BTG-4.3.2 ($12,4 \pm 9,2\%$). *Coefficient of variation (CV)* pada penelitian ini sudah memenuhi persyaratan CV penelitian berbasis sel yaitu $< 30\%$ sehingga keterulangan metode pada penelitian ini dapat diterima (23). Pada skrining kandungan senyawa, kelima ekstrak etil asetat fungi tanah muara mengandung senyawa terpenoid dan ekstrak dengan kode IS2-BTG-4.3.2 juga mengandung senyawa alkaloid. Kedua golongan senyawa tersebut yang diduga berperan dalam aktivitas antibakteri.

Terpenoid merupakan golongan senyawa yang terdiri dari gugus isopren dan disintesis melalui dua jalur yaitu non-mevalonat dan jalur mevalonat. Penelitian yang dilakukan oleh Liu, dkk²⁴ menunjukkan bahwa senyawa yang berhasil diisolasi dari fungi *Aspergillus sydowii* SW9 dengan nama senyawa methyl (*R,E*)-6-(2,3-dihydroxy-4-methylpenyl)-2-methylhept-5-enoate (Gambar 5) termasuk dalam kelompok seskuiterpenoid. Senyawa tersebut memiliki aktivitas antibakteri

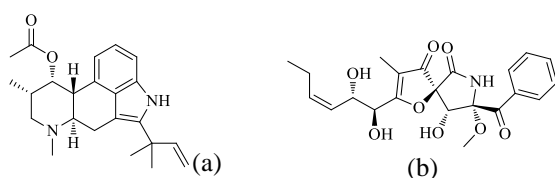
terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, dan *S. pneumoniae* dengan rentang nilai MIC sebesar 2-16 µg/mL.



Gambar 5. Struktur senyawa methyl (R,E)-6-(2,3-dihydroxy-4-methylphenyl)-2-methylhept-5-enoate

Mekanisme kerja dari senyawa terpenoid sebagai aktivitas antibakteri adalah menghambat dua proses penting untuk kelangsungan hidup bakteri yaitu pada penyerapan oksigen dan fosforilasi oksidatif.²⁵

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa yang banyak ditemukan pada bakteri, jamur, tumbuhan, dan hewan dengan pendistribusian yang cukup terbatas. Penelitian yang dilakukan oleh Pienheiro, dkk tentang pengujian aktivitas antibakteri senyawa yang berhasil diisolasi dari fungi *Aspergillus* sp., yaitu senyawa fumigaclavine C dan pseurotin A (Gambar 6 a,b), terhadap beberapa bakteri uji salah satunya bakteri *S. aureus* dengan nilai penghambatan MIC sebesar 15,62 µg/mL untuk senyawa fumigaclavin C dan 15,6 µg/mL untuk senyawa Pseurotin A.²⁶



Gambar 6. Struktur senyawa fumigaclavine C (a) dan pseurotin A (b)

Kedua senyawa tersebut termasuk dalam golongan senyawa alkaloid. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat pembelahan sel, mengurangi konsumsi oksigen, mengganggu homeostasis bakteri,

dan mengurangi integritas membran sel bakteri.²⁷

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil dan pembahasan dari penelitian yang telah dilakukan, lima isolat fungi tanah muara yang didapat termasuk ke dalam kelompok *yeast* dan lima isolat tersebut diberi kode IS2-BTG-4.1.1, IS2BTG-4.1.2, IS1-BTG-4.2, IS2-BTG-4.3.1, dan IS2-BTG-4.3.2. Hasil skrining kandungan senyawa ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi tanah muara menunjukkan kelima ekstrak mengandung senyawa golongan terpenoid dan ekstrak IS2-BTG-4.3.2 mengandung senyawa golongan alkaloid. Pada uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi tanah muara dengan *single concentration* 100 µg/mL menunjukkan adanya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dengan persen penghambatan tertinggi pada ekstrak IS2-BTG-4.1.1 sebesar 50,2% ± 14,8% dan terendah pada ekstrak IS2-BTG-4.3.2 sebesar 12,4% ± 9,2%.

SARAN

Pengujian lanjutan perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas dari masing-masing isolate terkait nilai IC₅₀ yang dihasilkan terhadap bakteri uji. Pengujian lanjutan perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas dari masing-masing isolat terkait nilai IC₅₀ yang dihasilkan terhadap bakteri uji. Pengujian lanjutan perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas dari masing-masing isolat terkait nilai IC₅₀ yang dihasilkan terhadap bakteri uji. Pengujian lanjutan perlu dilakukan untuk memastikan aktivitas dari masing-masing isolat terkait nilai IC₅₀ yang dihasilkan terhadap bakteri uji.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih ditujukan pada kelompok riset DUDRG (*Drug Utilisation Discovery Research Group*), Fakultas Farmasi, Universitas Jember, dan

Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung atas dukungan fasilitas pada penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

- Elisha IL, Botha FS, McGaw LJ, Eloff JN. The antibacterial activity of extracts of nine plant species with good activity against *Escherichia coli* against five other bacteria and cytotoxicity of extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2017;17(1):133.
- CDC Indonesia. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) in Indonesia. Cdc. 2020;(Cdc).
- World Health Organization. Antimicrobial resistance [Internet]. 2018 [cited 2020 May 14]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;31(4):1–103.
- Singh SB BJ. Empirical antibacterial drug discovery — Foundation in natural products. *Biochemical Pharmacology*. 2006;71(7):1006–15.
- Cytryn E, Markiewicz Z, Popowska M. Antibiotics and antibiotics resistance genes dissemination in soils. In: Hashmi, M., Strezov, V., Varma, A. (eds) *Antibiotics and antibiotics resistance genes in soils*. *Soil Biology*, vol 51. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66260-2_9. p. 151–90.
- Akilandeswari P, Pradeep B V. Exploration of industrially important pigments from soil fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016;100(4):1631–43.
- Vanegas J, Muñoz-García A, Pérez-Parra KA, Figueroa-Galvis I, Mestanza O, Polanía J. Effect of salinity on fungal diversity in the rhizosphere of the halophyte *Avicennia germinans* from a semi-arid mangrove. *Fungal Ecology*. 2019;42:1–9.
- Sanka Loganathachetti D, Poosakkannu A, Muthuraman S. Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09281-3>
- Alshaili, S. A. dan B. M. Bani-Hasan. Morphological and molecular identification of fungi isolated from different environmental sources in the northern eastern desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*. 2018;1(3):329–337.
- Kawaguchi, M., K. Nonaka, R. Masuma, dan H. Tomoda. New method for isolating antibiotic-producing fungi. *Journal of Antibiotics*. 2013;66(1):17–21.
- Harborne, J. B. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. ITB Bandung. 2006.
- CLSI. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard — Ninth Edition*. 2012;32.
- Paulsen I. T. HAJ. *methods for isolation and cultivation of filamentous fungi*. In: *Environmental Microbiology: Methods and Protocols*. 2014; 2–6.
- Gorthi LV. Morphological classification of fungal infections (Yeasts, Mold, Dimorphic). *Fungal Infections of the Central Nervous System*. 2019;23–30.
- Nurcholis M, Fernando D, Zubaidah E. MJ. Isolation and identification of thermotolerant and ethanol-tolerant yeast on Indonesian local fruits. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 2020;8(3):122–33.
- Phale S. Yeast: Characteristics and economic significance. *Journal of Bioprocessing and Biotechniques*. 2018;08(05):8–10.
- Sara Ramírez R, Arias M. JD, Bedoya JC, Rueda L. EA, Sánchez CY, Granada G. SD. Metabolitos producidos por microorganismos antagonistas son capaces de inhibir in vitro los principales patógenos del aguacate. *Agronomía Colombiana*. 2015;33(1):58–63.
- Lindskog EK. The upstream process: principal modes of operation. In: *Biopharmaceutical processing: development, design, and implementation of manufacturing processes*. Development, desain, and implementation of manufacturing processes. 2018;625–35.
- Ramirez Ronda CH, Holmes RK, Sanford JP. Effects of divalent cations on binding of aminoglycoside antibiotics to human serum proteins and to bacteria.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 1975;7(3):239–45.
21. Communities TC of TE. Establishing requirements determination of the levels of dioxins and dioxin-like pebs in feedingstuffs. Official Journal of the European Communities. 2002;15–21.
 22. Timm, M., L. Saaby, L. Moesby, dan E. W. Hansen. Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. Cytotechnology. 2013;65(5):887–894.
 23. Swapna PK, Lalchand PD. Fungal biodiversity of a library and cellulolytic activity of some fungi. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2016;78(6):849–54.
 24. Liu YJ, Zhang JL, Li C, Mu XG, Liu XL, Wang L, et al. antimicrobial secondary metabolites from the seawater-derived fungus *Aspergillus sydowii* SW9. Molecules. 2019;24(24):4–11.
 25. Zengin, H., Baysal A. Antibacterial and antioxidant activity of essential oil terpenes against pathogenic and spoilage-forming bacteria and cell structure-activity relationships evaluated by SEM microscopy. Molecules. 2014;11:17773–98.
 26. Pinheiro, E. A., Carvalho, J.M., Dos Santos, D.C., Feitosa, A. D. dkk. Antibacterial activity of alkaloids produced by endophytic fungus *Aspergillus* sp. EJC08 isolated from medical plant *Bauhinia guianensis*. Natural Product Research. 2013;27(18):1633–8.
 27. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. International Journal of Antimicrobial Agents [Internet]. 2014 [cited 2020 May 14];44(5):377–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>