



Artikel Penelitian

Isolasi Fungi Tanah Muara Mangrove Desa Katialada Gorontalo dan Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

A H Prakoso¹, M Z Arifin², S A Tauladani^{2,3}, G A Muharam⁴, Asia⁵, Bawon Triatmoko¹, A S Nugraha^{1*}¹Drug Utilisation Discovery Research Group, Fakultas Farmasi, Universitas Jember²Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung³Australian National Centre for Ocean Resources and Security (ANCORS), University of Wollongong⁴Balai Pendidikan dan Pelatihan Perikanan Aertembaga⁵Politeknik Kelautan dan Perikanan Bone**INFO ARTIKEL****ABSTRAK****Riwayat Artikel**

Diterima 22 April 2022

Direvisi 25 Juni 2022

Tersedia online 29 Maret 2023

*Email penulis korespondensi:
arisatia@unej.ac.id

Pseudomonas aeruginosa is a bacterial pathogen that causes various kinds of infections. The use of antibiotics is usually done to treat the infection. However, *Pseudomonas aeruginosa* has various resistance abilities that can avoid the efficacy of antibiotics. The emergence of drug resistance events encourages the need for the discovery of new antibiotic drugs, one of which comes from fungal secondary metabolites. Soil fungi from mangrove ecosystems have not been studied much. Interestingly, these soil fungi have unique adaptive responses. This response also affects the secondary metabolites it contains. Knowing this information, mangrove soil samples were cultured on fungi media which were then tested against *Pseudomonas aeruginosa* through an antagonist test and microdilution test. Three fungal cultures with yeast characteristics were obtained and each of the secondary metabolite ethyl acetate extracts of these three fungi had antibacterial activity. The antibacterial activity was indicated by the % inhibition parameter. The terpenoid content in fungal cultures may be responsible for the antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. This research is an initial screening of the search for new antibiotic candidates, so further research study such as isolation and species determination needs to be done.

Keywords: Antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*, Mangroves soil fungi

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri patogen penyebab berbagai macam infeksi. Penggunaan antibiotik biasa dilakukan untuk mengobati infeksi tersebut. Namun, bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memiliki beragam kemampuan resistensi yang mampu menghindari efikasi antibiotik. Munculnya kejadian resistensi obat mendorong kebutuhan terhadap penemuan antibiotik baru, salah satu sumbernya berasal dari metabolit sekunder fungi. Fungi tanah dari ekosistem mangrove masih belum banyak diteliti. Menariknya, fungi tanah tersebut memiliki respon adaptasi yang unik. Respon tersebut juga berpengaruh terhadap metabolit sekunder yang dikandungnya. Mengetahui informasi tersebut, sampel tanah mangrove dikultur pada media fungi yang selanjutnya diujikan terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* melalui uji antagonis dan uji mikrodilusi. Tiga fungi berciri khamir berhasil terkulturkan dengan masing masing ekstrak etil asetat menunjukkan aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri masing-masing ekstrak etil asetat ditunjukkan dengan parameter % penghambatan dengan hasil 60.5%, 31.9%, dan 51.0%. Uniknya, kandungan terpenoid fungi mampu berkontribusi sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Aktivitas antibakteri ketiga kultur merupakan skrining awal kandidat antibiotik baru sehingga penelitian

lanjutan seperti determinasi spesies, pengujian IC50, beserta isolasi senyawa pada ekstrak perlu dilakukan.

Kata Kunci: Antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa*, Fungi tanah Mangrove

1. Pendahuluan

Kejadian resistensi antibiotik telah banyak dijumpai secara global. Salah satu jenis bakteri yang mampu menyebabkan resistensi adalah *Pseudomonas aeruginosa* (PA). Pada tahun 2019, dunia mengalami peningkatan resistensi PA sebesar 15-30% di beragam instalasi kesehatan [1]. Bakteri PA merupakan bakteri aerobik gram negatif, berbentuk *rod* atau batang yang menyebabkan beragam macam infeksi pada manusia [2]. Infeksi yang dimaksud adalah infeksi nasokomial dengan beragam manifestasi klinik, mulai dari pneumonia hingga infeksi saluran kemih [3]. Pada penelitian FORLAB Infeksi Indonesia 2018, telah ditelusuri isolat PA pada 4.873 pasien yang terdiri atas 3.245 sensitif karbapenem (67%) dan 1.628 resisten terhadap karbapenem (33%) [4]. Faktanya, PA resisten karbapenem telah menjadi perhatian besar WHO sejak 2017 dan menjadi prioritas kritis dalam penemuan antibiotik [5]. PA memiliki banyak kemampuan infeksi yang kuat pada individu dengan gangguan imun, keserbagunaan yang dinamis dan ekstrem terhadap berbagai macam kondisi lingkungan, serta seperti yang disebutkan sebelumnya, kebal terhadap antibiotik karbapenem. Kemampuan-kemampuan tersebut menjadikan PA sebagai mikroorganisme tangguh untuk diobati dalam pengobatan modern [2]. Umumnya, pengobatan penyakit yang disebabkan PA bisa diatasi dengan pemberian antibiotik, baik monoterapi maupun terapi kombinasi. Namun, regimen tersebut menjadi halangan besar pengobatan akibat kemampuan PA yang mampu bertahan dan menghindari efikasi antibiotik. Ditambah lagi penggunaan antibiotik berlebih selama pengobatan dapat mengakibatkan munculnya *strain multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa* yang menyebabkan penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif [6]. Meningkatnya kejadian resistensi obat mendorong kebutuhan terhadap penemuan obat baru. Secara historis, senyawa antibiotik merupakan turunan dari produk bahan alam [7]. Produk bahan alam seperti fungi dilaporkan memiliki banyak aktivitas dalam dunia pengobatan. Dari 22.500 senyawa biologis aktif, 40% di antaranya diproduksi oleh fungi [8]. Penemuan tersebut mengindikasikan bahwa fungi merupakan kandidat obat baru yang menjanjikan.

Pencarian fungi poten sebagai penghasil antibiotika memerlukan banyak pertimbangan, salah satu pertimbangannya adalah habitat atau letak fungi tumbuh. Tanah merupakan rumah untuk beragam mikroorganisme. Di tanah, variasi biotik dan abiotik yang luas membuat mikroorganisme penghuni melakukan adaptasi seperti mengembangkan kemampuan bertahan hidup. Produksi antibiotik merupakan salah satu strategi kompetitif dalam beradaptasi [9]. Beberapa senyawa antibiotik seperti penisilin, griseofulvin, fumigalin, sefalosporin, dan *ceftobiprole* ditemukan pada fungi tanah [10]. Fungi tanah juga diketahui menghasilkan metabolit sekunder sebagai *enhancer* antibiotik meropenem, yaitu aspergilomarasmin [11]. Uniknya perbedaan karakteristik tanah mampu mempengaruhi diversitas dan kelimpahan fungi tanah [12]. Salah satu ekosistem tanah yang masih sedikit diteliti namun memiliki peluang akan kelimpahan temuan adalah ekosistem mangrove [13]. Ekosistem mangrove memiliki diversitas hayati yang teradaptasi oleh salinitas, tanah pesisir yang cenderung anoksik, kelembaban dan temperatur tinggi, kecepatan angin tinggi, serta gelombang laut [14]. Kondisi lingkungan yang ekstrem mengindikasikan adanya respon adaptasi mikroorganisme unik yang tinggal dalam ekosistem tersebut.

Keunikan ekosistem mangrove menjadi hunian bagi fungi *terrestrial* dan *marine* yang kemudian disebut dengan *manglicolous fungi*. Sebanyak 625 mangrove fungi terestikasi dijumpai secara global, dan mayoritas fungi tersebut dilaporkan berasal dari Asia Tenggara [14]. Pada penelitian studi genomik di ekosistem mangrove Laut Merah, banyak komunitas fungi ditemukan. Genus *Aspergillus* banyak dijumpai pada ekosistem mangrove [15]. Fungi *Aspergillus* dikenal kaya akan metabolit antimikrobal seperti asam helvonat, aspergillin, *claviformin*, dan fumagillin [16]. Penelitian lain mengungkapkan, lingkungan *marine* seperti pada ekosistem mangrove kaya akan metabolit fungi golongan alkaloid dan terpenoid [17], [18]. Keunikan ekosistem mangrove mendorong penelitian ini untuk menelusuri karakteristik isolat fungi tanah mangrove sebagai upaya dalam pencarian kandidat obat baru. Penelusuran karakteristik yang dimaksud dalam penelitian ini memiliki tujuan: (i) Mengkultur dan mengidentifikasi morfologi fungi tanah muara mangrove pada laboratorium, (ii) Mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat fungi tanah muara yang berhasil dikultur terhadap bakteri PA, (iii) Skrining golongan senyawa terpenoid dan alkaloid yang diduga bertanggung jawab dalam aktivitas antibakteri, (iv) Menjadi acuan dasar isolasi senyawa dan determinasi spesies fungi yang berkompeten pada penelitian selanjutnya.

2. Bahan dan Metode

2.1. Bahan

Sampel tanah muara mangrove Desa Katialada Gorontalo (koordinat Google Maps 0°50'56.7"N 122°54'00.1"E, 0.849072, 122.900025), *sterile water for injection* dan aqua demineralisata (HYDROBATT), air laut, NaCl fisiologis 0,9% (Widatra Bhakti), *Potato Dextrose Agar* (PDA) (HIMEDIA), *Potato Dextrose Agar with Chloramphenicol* (PDAC) (HIMEDIA),

Potato Dextrose Broth (PDB) (HIMEDIA), Mueller Hinton Agar (MHA) (Merck), Mueller Hinton Broth (MHB) (HIMEDIA), bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. DMSO (Merck), CaCl₂ (Sigma-Aldrich), MgCl₂ (Brotaco), BaCl₂ (Merck), H₂SO₄ 96% (Fluka), etil asetat teknis, etanol 70% teknis, gentamisin sulfat injeksi 40 mg/mL, lempeng silika gel kromatografi lapis tipis F 254 (Merck), reagen Dragendorff, vanillin (Merck), Diklorometana pa (Emsure), dan etil asetat pa (Emsure).

2.2. Preparasi Media

Media untuk kultur jamur adalah PDA, PDAC dan PDB, sedangkan MHA dipakai untuk peremajaan (kultur) bakteri uji. Pada pengujian mikrodilusi, *Cation-Adjusted MHB* (CAMHB) digunakan sebagai basis suspensi bakteri uji [19]. Media-media tersebut dibuat dengan cara; PDA, menimbang 9,75 g serbuk PDA dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata; PDAC, menimbang 9,75 g serbuk PDAC dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata; PDB, menimbang 4,8 g serbuk PDB dan dilarutkan dalam 200 mL aqua demineralisata; MHA, menimbang 8,5 g serbuk MHA dan dilarutkan dalam 250 mL aqua demineralisata; CAMHB, menimbang 1,05 g serbuk MHB, dilarutkan dalam 50 mL aqua demineralisata. Media MHB kemudian ditambahkan kation Mg²⁺ dari MgCl₂ dan Ca²⁺ dari CaCl₂. Sebanyak 225 µL MgCl₂ dan 450 µL CaCl₂ ditambahkan ke dalam MHB. Media disterilkan dengan panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.3. Preparasi Sampel Tanah

Sampel tanah muara mangrove diambil pada kedalaman 10 cm di atas permukaan tanah. Cuplikan tanah diambil dan disuspensikan dengan 10 mL air steril, kemudian dihomogenkan dengan bantuan *vortex shaker* selama 3 menit. Suspensi sampel tanah kemudian disentrifugasi (500 rpm) selama 10 menit. Sebanyak 100 µL supernatan hasil sentrifugasi diambil dan disebar dengan bantuan *spreader* di atas media PDA untuk mengkultur fungi dari sampel tanah. Media PDA tersebut diinkubasi pada suhu 28 °C selama 7 hari.

2.4. Identifikasi Sampel Fungi

Jumlah sampel fungi ditentukan berdasarkan hasil kultur preparasi tanah muara. Koloni yang tumbuh dipisahkan secara visual ke media PDA berbeda berdasarkan morfologi seperti bentuk, tekstur dan warna. Koloni yang dipisahkan selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C selama 7 hari. Selama proses inkubasi, koloni dipastikan memiliki konsistensi morfologi sehingga didapat koloni tunggal. Koloni tunggal kemudian dipastikan merupakan fungi dengan cara mengkulturkan pada media PDAC dan diinkubasi pada suhu 28 °C selama 7 hari. Koloni yang masih dapat tumbuh merupakan fungi. Fungi yang tumbuh pada PDAC dipindah ke PDA dan disebut dengan isolat fungi. Isolat fungi dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran 100x untuk melihat jenis fungi. Jenis yang dimaksud adalah kapang atau khamir.

2.5. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji *Pseudomonas aeruginosa*

Suspensi bakteri uji digunakan pada uji antagonis dan uji mikrodilusi. Pada uji kontak, suspensi PA dibuat dengan cara mengambil sejumlah koloni bakteri kultur pada media MHA kemudian disuspensikan dalam tabung reaksi yang berisikan NaCl fisiologis 0,9%. Untuk pengujian mikrodilusi, sejumlah koloni bakteri PA diambil dari kultur media MHA dan dicampurkan ke dalam 10 mL media CAMHB, lalu diencerkan 100 kalinya. Kedua jenis suspensi tersebut diukur absorbansinya hingga didapat nilai absorbansi 0,08 – 0,13 pada panjang gelombang 625 nm. Rentang absorbansi tersebut sesuai dengan standar McFarland 0,5.

2.6. Uji Antagonis

Uji antagonis yang dilakukan menggunakan metode *agar plug diffusion*, mengacu pada penelitian Kibthiyah dkk [20]. Isolat fungi media PDA berumur 7 hari dicetak menjadi *plug* atau cakram dengan pembuat sumuran berdiameter 6,3 mm. Cakram isolat fungi kemudian dikontakkan dengan suspensi bakteri uji PA yang sebar di atas media MHA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Zona bening di sekitar cakram diukur menggunakan jangka sorong.

2.7. Fermentasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder Fungi

Submerged Fermentation dilakukan menggunakan metode *batch*. Lima *plug* atau cakram isolat fungi berdiameter 6,3 mm dimasukkan ke dalam 200 mL media PDB yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 28 °C selama 14 hari dalam *shaker incubator* 125 rpm. Setelah 14 hari, hasil fermentasi disaring dan ditampung untuk selanjutnya diekstraksi menggunakan partisi cair-cair dua fase sebanyak 3x replikasi. Hasil fermentasi merupakan fase air yang kemudian ditambahkan dengan etil asetat dengan perbandingan 1:1 dalam corong pisah. Partisi cair-cair dilakukan selama 15 menit tiap replikasi. Fase etil asetat hasil partisi diambil, ditampung dalam mangkok untuk menguapkan pelarut sehingga ekstrak metabolit sekunder (ekstrak uji) didapatkan. Ekstrak uji kemudian ditampung ke dalam vial dan dihitung rendemennya.

2.8. Skrining Kandungan Kimia

Proses skrining dilakukan dengan kromatografi lapis tipis. Golongan yang dideteksi adalah alkaloid dan terpenoid. Sebanyak 4 μL ekstrak isolat fungi ditotolkan pada lempeng silika gel F_{254} dan dielusi menggunakan fase gerak diklorometana : metanol (9,5 : 0,5). Setelah lempeng jenuh, deteksi golongan dilakukan menggunakan penampak noda semprot. Deteksi golongan alkaloid dilakukan dengan menyemprotkan reagen Dragendorff, sedangkan deteksi terpenoid dilakukan dengan menyemprotkan reagen Vanilin- H_2SO_4 pada lempeng yang kemudian dihangatkan di atas *hotplate* 70 $^\circ\text{C}$. Adanya golongan alkaloid pada ekstrak isolat ditunjukkan dengan munculnya noda jingga pada lempeng yang telah disemprot, sedangkan terpenoid akan menunjukkan warna ungu.

2.9. Uji Mikrodilusi

Uji mikrodilusi mengacu pada protokol CLSI 2012 [19] dan menggunakan standar konsentrasi ekstrak isolat 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [21]. Pengujian mikrodilusi pada penelitian membutuhkan kelompok perlakuan, kontrol negatif ekstrak, kontrol positif, kontrol negatif gentamisin, kontrol ekstrak, kontrol DMSO, kontrol gentamisin, dan kontrol media dalam *microplate* 96-well. Masing-masing kelompok diletakkan dalam pola sumuran yang telah ditentukan. Kelompok perlakuan berisikan 50 μL ekstrak uji dalam DMSO 1% + 50 μL suspensi bakteri dalam CAMHB; Kontrol negatif ekstrak berisikan 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB + 50 μL suspensi bakteri dalam CAMHB; Kontrol positif berisikan 50 μL gentamisin + 50 μL suspensi bakteri dalam CAMHB; Kontrol negatif gentamisin berisikan 50 μL media CAMHB + 50 μL suspensi bakteri dalam CAMHB; Kontrol ekstrak berisikan 50 μL ekstrak uji dalam DMSO 1% + 50 μL media CAMHB; Kontrol DMSO berisikan 50 μL DMSO 1% dalam media CAMHB + 50 μL media CAMHB; Kontrol gentamisin berisikan 50 μL gentamisin + 50 μL media CAMHB; Kontrol media berisikan 100 μL Media CAMHB. Seluruh prosedur dilakukan secara aseptis di bawah *Laminar Air Flow*. *Microplate* yang telah diberi perlakuan diinkubasi pada suhu 37 $^\circ\text{C}$ selama 18 jam pada *shaker incubator* 125 rpm. Selanjutnya, absorbansi setiap kelompok uji diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 625 nm.

2.10. Analisis Data

Data absorbansi setiap kelompok uji digunakan untuk menghitung persen penghambatan bakteri berdasarkan rumus

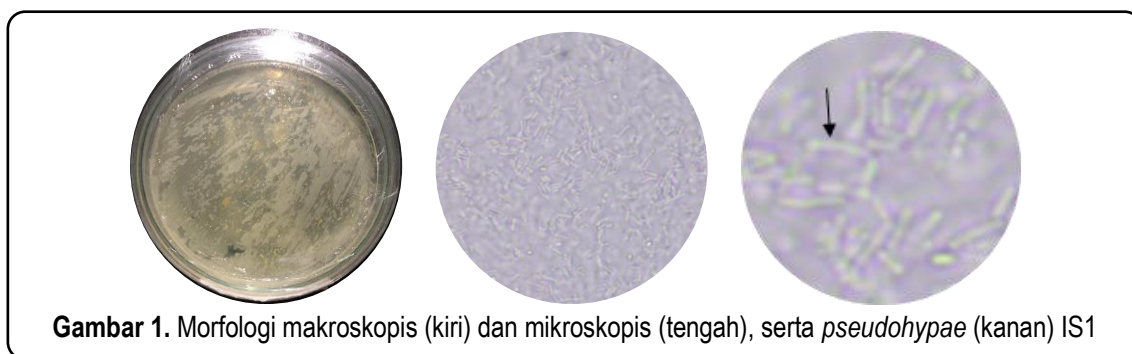
$$\% \text{Penghambatan} = \frac{(1 - ((\text{Abs C} - \text{Abs D}))}{(\text{Abs A} - \text{Abs B})} \times 100\% \quad (1)$$

Dimana Abs adalah absorbansi, A adalah kontrol (negatif/gentamisin), B adalah kontrol (DMSO 1%/media CAMHB), C adalah larutan (perlakuan ekstrak uji/kontrol positif), dan D adalah kontrol (ekstrak/gentamisin)

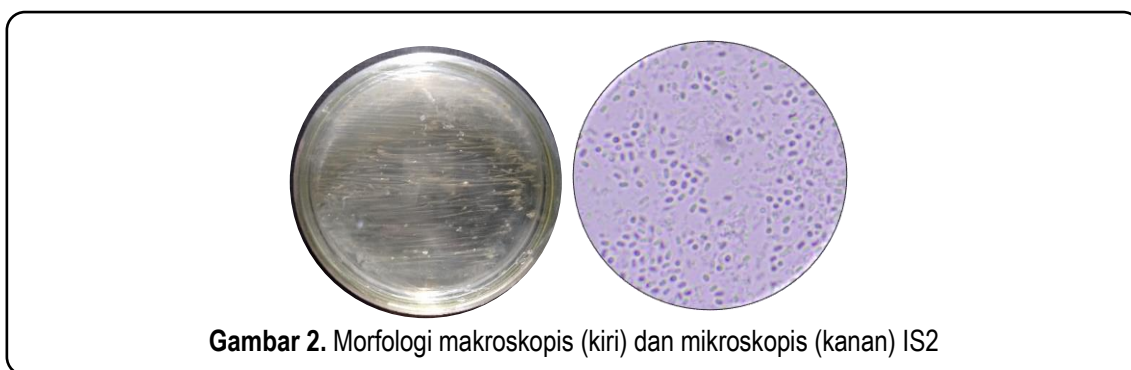
3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Morfologi Isolat Fungi

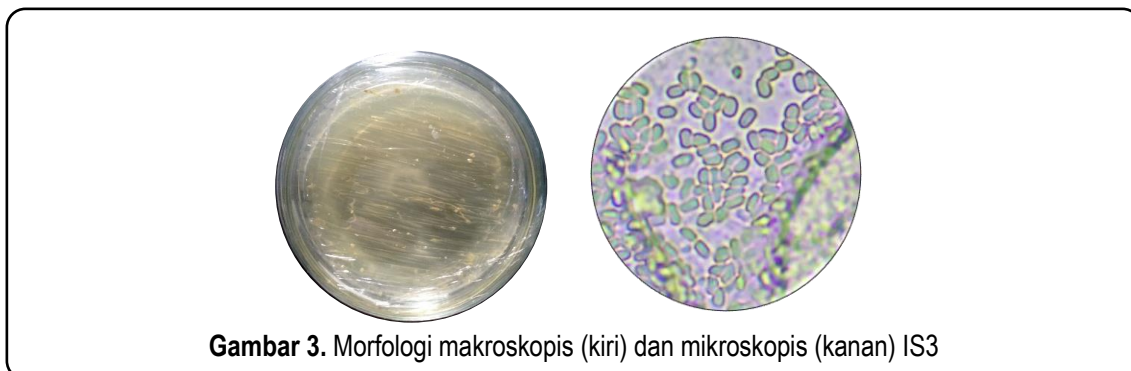
Kultur dengan salinitas tinggi merupakan kultur yang mampu beradaptasi dengan tekanan osmotik yang tinggi. Tidak semua mikroorganisme dapat tumbuh pada kondisi garam tinggi, artinya salinitas mampu mempengaruhi pertumbuhan dan produksi metabolit sekunder yang unik [23]. Preparasi sampel tanah yang dilanjutkan dengan proses identifikasi menghasilkan tiga isolat fungi dengan morfologi visual yang berbeda. Masing-masing isolat fungi diberi kode IS1, IS2, dan IS3. Ketiga isolat merupakan kultur fungi yang dibuktikan dengan tumbuhnya koloni dengan morfologi serupa pada media PDAC. Kloramfenikol di dalam media PDAC merupakan antibiotik yang mampu mengeliminasi bakteri melalui mekanisme kerja penghambatan subunit 50S yang mengakibatkan kegagalan sintesis protein [24]. Selain menggunakan media PDAC, isolat dibuktikan lagi dengan pengamatan mikroskopis yang menunjukkan ciri-ciri dari khamir (*yeast*). Khamir merupakan jenis fungi yang memiliki karakteristik bentuk sel yang oval atau membulat, adanya *budding* (sel *parent* membelah diri secara aseksual menghasilkan sel anak identik yang lebih kecil), serta pada kondisi dan jenis tertentu menunjukkan struktur *pseudohyphae* [25]. Penampakan morfologi makroskopis dan mikroskopis IS1, IS2, dan IS3 berturut turut ditunjukkan pada **Gambar 1**, **Gambar 2**, dan **Gambar 3**.



Gambar 1. Morfologi makroskopis (kiri) dan mikroskopis (tengah), serta *pseudohyphae* (kanan) IS1



Gambar 2. Morfologi makroskopis (kiri) dan mikroskopis (kanan) IS2



Gambar 3. Morfologi makroskopis (kiri) dan mikroskopis (kanan) IS3

Morfologi makroskopis dari ketiga isolat merupakan hasil penginderaan mata dari isolat fungi di atas media PDA. Karakteristik masing-masing isolat fungi dapat dijumpai pada tabel 1. Berbeda dengan IS2 dan IS3 yang hanya menampilkan sel soliter khamir berbentuk bulat hingga oval, IS1 memiliki struktur khamir secara umum dan *pseudohyphae* yang jelas setelah melakukan perbesaran mikrograf. *Pseudohyphae* merupakan sel hifa semu dengan salah satu ujung membulat, ujung lainnya memanjang, tidak bersekat, dan tidak terpisah saat sitokinesis [26]. Struktur ini biasa terbentuk saat nutrisi di sekitar fungi rendah, menyebabkan fungi beradaptasi untuk melakukan *foraging* (pencarian makan menyeluruh) [27]. Terlihatnya struktur *pseudohyphae* memerlukan identifikasi lebih lanjut, sebab pemanjangan sel serupa juga ditemui pada struktur sel *actinomycetes* (aktinobakteria). Aktinobakteria merupakan bakteri gram positif yang memiliki struktur menyerupai hifa panjang dengan percabangan yang memiliki septa (sekat) [28]. Dengan membandingkan ciri tersebut, IS1 merupakan *pseudohyphae* dari fungi dibuktikan dengan tidak ditemukannya sekat pada sel. Perlakuan kultur sebelumnya pada PDAC juga memvalidasi hanya kultur fungi yang dapat bertahan hidup.

Tabel 1. Karakteristik tiga isolat fungi

Kode Isolat	Jenis Fungi	Ciri Makroskopis	Ciri Mikroskopis
IS1	Khamir	Warna koloni putih pucat, bertekstur kasar dan kering	<i>Pseudohyphae</i> , dengan sel oval ditemui di sekitarnya
IS2	Khamir	Warna koloni kuning pucat, bertekstur lembek dan basah	Sel individu berbentuk bulat hingga oval, tidak ditemui <i>pseudohyphae</i>
IS3	Khamir	Warna koloni kuning, bertekstur lembek dan basah	Sel individu berbentuk bulat hingga oval. Nampak sel <i>budding</i> dan tidak ditemui <i>pseudohyphae</i>

3.2. Skrining Aktivitas Antibakteri dengan Uji Antagonis

Uji antagonis dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya aktivitas antibakteri dari tiga isolat fungi yang didapatkan. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar cakram isolat. Senyawa aktif yang disekresi fungi akan menyebar di atas permukaan media yang telah diberi bakteri uji, sehingga pertumbuhan dan kelangsungan hidup bakteri uji dapat terganggu serta menghasilkan zona bening akibat interaksi dengan senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri [29]. Pengukuran zona bening dilakukan sebanyak tiga kali replikasi di sisi yang berbeda lalu parameter diameter zona bening merupakan rata-ratanya. Hasil uji antagonis isolat terhadap bakteri PA disajikan pada tabel 2. Berdasarkan diameter zona bening, IS1 memiliki zona bening terbesar, dilanjutkan oleh IS3 dan IS2. IS1 mungkin memiliki metabolit sekunder yang banyak atau poten dalam melawan bakteri uji PA dibandingkan dengan isolat fungi lainnya.

Tabel 2. Hasil uji antagonis

Kode Isolat	Diameter Zona Bening
IS1	12,05 mm
IS2	8,35 mm
IS3	11,38 mm

3.3. Fermentasi dan Ekstraksi Metabolit Sekunder

Produksi metabolit sekunder fungi dan mikroorganisme lainnya umumnya dimulai pada saat awal fase log dan tidak lagi bertambah pada fase stasioner [30]. Beberapa jenis fungi lain juga dapat memproduksi metabolit sekunder di awal atau akhir fase stasioner sebagai respon berkurangnya nutrisi pada lingkungan tumbuh [31]. Mengetahui variasi tersebut, fermentasi pada penelitian ini dihentikan di awal fase stasioner sebagai asumsi metabolit telah dihasilkan. Fase stasioner fungi bervariasi tergantung spesies, tetapi umum dimulai di hari ke-14 periode kultur [32]. Di hari ke-14, media fermentasi menunjukkan perubahan warna dan kekeruhan media, serta munculnya endapan dan formasi *pellicle*. Perubahan tersebut merupakan ciri khas fungi jenis khamir yang berhasil difermentasi [33]. Perolehan rendemen isolat disajikan pada tabel 3. IS1 menghasilkan rendemen metabolit sekunder terbesar, dilanjutkan dengan IS3 dan IS2.

Tabel 3. Perolehan ekstrak hasil fermentasi

Kode Isolat	Bobot Ekstrak (g)	% Rendemen (%g/mL)
IS1	0,167	0,090
IS2	0,065	0,034
IS3	0,082	0,045

3.4. Skrining Kandungan Kimia

3.4.1. Deteksi Golongan Alkaloid

Reagen Dragendorff mampu membentuk kompleks bismut-alkaloid dengan variasi warna tampak kuning-jingga, merah kehitaman, atau merah muda-ungu tergantung dari spesies atau genus penghasil alkaloid [34]. Pada ketiga ekstrak isolat fungi, tidak ditemukan adanya noda kejinggaan pada lempeng KLT (gambar 2). Golongan alkaloid tidak dijumpai pada ekstrak metabolit sekunder hasil fermentasi ketiga isolat.

**Gambar 2.** Hasil deteksi alkaloid dengan reagen Dragendorff pada IS1 (1), IS3 (2), dan IS2 (3)

Hasil negatif pada skrining dapat didasarkan dari dua kemungkinan. Kemungkinan pertama, polaritas alkaloid yang beragam dari polar hingga non-polar [35]. Fase air pada proses ekstraksi partisi cair-cair perlu diskruining dalam penelitian selanjutnya karena mungkin alkaloid yang dihasilkan isolat fungi bersifat polar. Kemungkinan kedua, tidak semua fungi menghasilkan alkaloid. Banyak jenis alkaloid fungi ditemukan pada jenis mold atau kapang seperti genus *Claviceps* [36]. Penelitian lain juga menyebutkan fungi golongan *mold* atau kapang seperti genus *Boletus*, *Fusarium*, dan *Psilocibe*, dalam kondisi *fermentor* khusus (pH 5-6 dipertahankan) dapat menghasilkan alkaloid dalam jumlah besar [37]. Ketiadaan fungi jenis mold atau kapang yang berhasil diisolasi dan fermentor khusus, mungkin menjadi penyebab tidak terdeteksinya alkaloid pada proses skrining.

3.4.2. Deteksi Golongan Terpenoid

Golongan terpenoid dapat terdeteksi menggunakan reagen Vanilin-H₂SO₄ dibuktikan dengan munculnya noda berwarna ungu, biru, ataupun hijau [38]. Ketiga sampel isolat fungi menunjukkan noda-noda ungu terpenoid setelah disemprot reagen Vanilin-H₂SO₄ (Gambar 3). Noda ungu yang terpisah dan berbeda posisi menunjukkan jenis terpenoid yang berbeda. Berdasarkan fase gerak yang digunakan, noda yang nampak atau tertinggal di bagian bawah lempeng memiliki sifat polar. Mengetahui informasi tersebut, beberapa terpenoid yang dikandung ketiga ekstrak isolat fungi bersifat polar.



Gambar 3. Hasil deteksi terpenoid dengan reagen Vanilin-H₂SO₄ pada IS1 (1), IS3 (2), dan IS2 (3)

3.5. Uji Aktivitas Antibakteri Metode Mikrodilusi

Mikrodilusi dilakukan untuk mengetahui % penghambatan ekstrak etil asetat isolat fungi terhadap bakteri uji PA. Perolehan % penghambatan gentamisin terhadap bakteri uji disajikan pada tabel 4. Hasil akhir persentase penghambatan direpresentasikan dengan rerata penghambatan \pm CV. Nilai CV menunjukkan kedekatan hasil dari suatu seri pengukuran (presisi). Menurut FDA, kriteria penerimaan *cell-based assay* adalah \pm 25% [39]. CLSI merekomendasikan untuk setiap kontrol positif yang digunakan memiliki % penghambatan \geq 80%. Apabila % penghambatan yang didapat tidak sesuai, penambahan kation Ca²⁺ dan Mg²⁺ perlu disesuaikan. Kontrol positif gentamisin pada penelitian ini menghasilkan % penghambatan yang sesuai (98,5%), sehingga tidak perlu melakukan penyesuaian kadar kation pada media yang digunakan.

Tabel 4. Perolehan % penghambatan kontrol dan ekstrak isolat fungi

Jenis Perlakuan	Rerata Penghambatan Pertumbuhan Bakteri (%) \pm SD (%)	CV (%)
Kontrol positif gentamisin	98,5 \pm 0,5	0,5
Kontrol negatif ekstrak (DMSO)	12,7 \pm 1,0	7,5
Ekstrak IS1	60,5 \pm 2,4	4,0
Ekstrak IS2	31,9 \pm 1,6	5,1
Ekstrak IS3	51,0 \pm 7,2	14,1

DMSO memiliki nilai persentase penghambatan yang berarti. DMSO yang digunakan dalam penelitian mampu menghambat 12,7% pertumbuhan bakteri PA. Untuk penelitian selanjutnya, ada baiknya melakukan penyesuaian konsentrasi DMSO. Konsentrasi DMSO 1% pada penelitian ini masih memiliki nilai hambat yang relatif besar sebagai kontrol negatif, sehingga direkomendasikan untuk menurunkan konsentrasi DMSO di bawah 1%. Namun, dalam pengujian ekstrak penelitian ini, persentase penghambatan yang didapat merupakan potensi ekstrak tanpa pengaruh DMSO. Ditinjau dari rumus yang digunakan, persentase penghambatan ekstrak sudah dikurangi dengan penghambatan DMSO.

Aktivitas penghambatan PA tertinggi dimiliki oleh ekstrak isolat 1 (IS1), dilanjutkan isolat 3 (IS3) dan isolat 2 (IS2). Besarnya % penghambatan setiap ekstrak mungkin ada kaitannya dengan rendemen metabolit sekunder yang dihasilkan. IS1 memiliki nilai rendemen dan penghambatan terbesar, sehingga ada kemungkinan dalam pembuatan konsentrasi 50 μ g/mL, terdapat banyak senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri. IS1 dan IS3 memiliki persentase penghambatan di

atas 50%, artinya dugaan nilai IC₅₀ ekstrak etil asetat fungi tanah muara IS1 dan IS3 ada di bawah konsentrasi 100 µg/mL. Dari hasil tersebut perlu dilakukan isolasi lebih lanjut untuk mengetahui senyawa yang berperan dalam aktivitas antibakteri [21]. Selanjutnya, berdasarkan hasil skrining kandungan kimia ekstrak, ketiga ekstrak fungi mengandung senyawa golongan terpenoid. Aktivitas antibakteri ekstrak diduga berasal dari golongan terpenoid.

Terpenoid banyak ditemukan pada tumbuhan, tetapi beberapa spesies fungi mampu memproduksinya. Uniknya, terpenoid dari fungi lingkungan marine memiliki banyak variasi bioaktivitas, beberapa di antaranya berperan sebagai agen sitotoksik, antibakteri, antifungi, antiviral, anti-inflamasi, dan inhibitor enzim [18], [36]. Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri sangat bervariasi. Mekanisme yang telah dipelajari adalah mengganggu fungsi membran bakteri, menyebabkan membran lisis mengeluarkan bagian penting dari bakteri yang menyebabkannya mati [40]. Satu senyawa dari metabolit sekunder fungi bisa saja memiliki lebih dari satu aktivitas [18]. Bisa pula memiliki aktivitas serupa namun di berbeda subjek uji. Sebagai contoh, terpenoid *ophiobolin U* (dari golongan *sesterterpenes*) berhasil diekstraksi dari *marine fungi Aspergillus ustus* dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* [41]. Tidak hanya sebatas pada *sesterterpens*, golongan *meroterpenoids* juga diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri pada *strain Staphylococcus aureus* [18]. Penelitian ini bersifat skrining awal sehingga untuk mengetahui senyawa dan mekanisme antibakteri yang sesungguhnya, perlu dilakukan penelitian lanjutan.

4. Kesimpulan

Tiga isolat fungi tanah muara mangrove berhasil dikultur dan menunjukkan karakteristik fungi khamir (*yeast*). Ketiga isolat fungi memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri PA dibuktikan dengan hasil uji antagonis dan mikrodilusi. Dari hasil uji mikrodilusi, aktivitas antibakteri terbesar dimiliki oleh IS1 dilanjutkan dengan IS3 dan IS2. Kandungan terpenoid yang dikandung dalam ketiga ekstrak isolat fungi mungkin berperan penting dalam aktivitas antibakteri. Menariknya lagi, IS1 dan IS3 memiliki % penghambatan di atas 50%, artinya nilai IC₅₀ kedua ekstrak tersebut ada di bawah 100 µg/mL. Penelitian lanjutan seputar isolasi dan determinasi ketiga spesies fungi perlu dilakukan sebagai upaya pencarian antibiotik baru.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan kepada *Drug Utilisation Discovery Research Group*, Fakultas Farmasi, Universitas Jember, dan Politeknik Kelautan dan Perikanan Bitung atas dukungan fasilitas penelitian antibakteri.

Daftar Pustaka

- [1] J. P. Horcajada *et al.*, "Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 32, no. 4, 2019, doi: 10.1128/CMR.00031-19/ASSET/3CDB73D6-9097-4D7E-A591-80EBAD992610/ASSETS/GRAPHIC/CMR.00031-19-T004H.JPEG.
- [2] M. G. Wilson and S. Pandey, *Pseudomonas Aeruginosa*. StatPearls Publishing, 2020.
- [3] P. Pachori, R. Gothwal, and P. Gandhi, "Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review," *Genes and Diseases*, vol. 6, no. 2. Chongqing University, pp. 109–119, Jun. 01, 2019, doi: 10.1016/j.gendis.2019.04.001.
- [4] D. Dahesih, Y. P. Dewi, A. K. Sugainli, and I. Parwati, *SURVEILANS BAKTERI RESISTAN MULTI OBAT dan KEPEKAANNYA TERHADAP ANTIBIOTIK di RUMAH SAKIT INDONESIA TAHUN 2018*. Departemen Patologi Klinik dan Kedokteran Laboratorium Fakultas Kedokteran Kesehatan Masyarakat dan Keperawatan Universitas Gadjah Mada, 2019.
- [5] Z. Breijyeh, B. Jubeh, and R. Karaman, "Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it," *Molecules*, vol. 25, no. 6. MDPI AG, Mar. 02, 2020, doi: 10.3390/molecules25061340.
- [6] Z. Pang, R. Raudonis, B. R. Glick, T. J. Lin, and Z. Cheng, "Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies," *Biotechnology Advances*, Elsevier Inc, vol. 37, no. 1., pp. 177–192, Jan. 01, 2019, doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- [7] B. R. da Cunha, L. P. Fonseca, and C. R. C. Calado, "Antibiotic discovery: Where have we come from, where do we go?," *Antibiotics*, MDPI AG, vol. 8, no. 2, Jun. 01, 2019, doi: 10.3390/antibiotics8020045.
- [8] A. L. Demain and E. Martens, "Production of valuable compounds by molds and yeasts," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 70, no. 4, pp. 347–360, Apr. 2017, doi: 10.1038/ja.2016.121.
- [9] N. Chandra and S. Kumar, "Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils," *Antibiot. Antibiot. Resist. Genes Soils; Soil Biol.*, vol. 51, no. November, pp. 1–18, 2017, doi: 10.1007/978-3-319-66260-2.
- [10] C. L. Ventola, "The antibiotic resistance crisis: causes and threats," *P T J.*, vol. 40, no. 4, pp. 277–83, 2015, doi: Article.
- [11] A. L. Demain and E. Martens, "Production of valuable compounds by molds and yeasts," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol.

- 70, no. 4, pp. 347–360, 2017, doi: 10.1038/ja.2016.121.
- [12] S. Tančić Živanov *et al.*, “Fungal Diversity as Influenced by Soil Characteristic,” *Zemdirbyste*, vol. 104, no. 4, pp. 305–310, 2017, doi: 10.13080/z-a.2017.104.039.
- [13] D. Sanka Loganathachetti, A. Poosakkannu, and S. Muthuraman, “Fungal community assemblage of different soil compartments in mangrove ecosystem,” *Sci. Reports 2017 71*, vol. 7, no. 1, pp. 1–9, Aug. 2017, doi: 10.1038/s41598-017-09281-3.
- [14] H. Thatoi, B. C. Behera, and R. R. Mishra, “Ecological role and biotechnological potential of mangrove fungi: A review,” *Mycology*, vol. 4, no. 1, pp. 54–71, 2013, doi: 10.1080/21501203.2013.785448.
- [15] M. F. Simões *et al.*, “Soil and Rhizosphere Associated Fungi in Gray Mangroves (*Avicennia marina*) from the Red Sea - A Metagenomic Approach,” *Genomics, Proteomics Bioinforma.*, vol. 13, no. 5, pp. 310–320, 2015, doi: 10.1016/j.gpb.2015.07.002.
- [16] A. A. Al-Fakih and W. Q. A. Almaqtri, “Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp.,” *Mycology*, Taylor and Francis Ltd vol. 10, no. 4., pp. 191–209, Oct. 02, 2019, doi: 10.1080/21501203.2019.1604576.
- [17] T. Willems, M. L. De Mol, A. De Bruycker, S. L. De Maeseneire, and W. K. Soetaert, “Alkaloids from marine fungi: Promising antimicrobials,” *Antibiotics*, vol. 9, no. 6, pp. 1–27, 2020, doi: 10.3390/antibiotics9060340.
- [18] M. Jiang, Z. Wu, H. Guo, L. Liu, and S. Chen, “A review of terpenes from marine-derived fungi: 2015–2019,” *Mar. Drugs*, vol. 18, no. 6, pp. 2015–2019, 2020, doi: 10.3390/md18060321.
- [19] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard — Ninth Edition*, vol. 32, no. 2. 2012.
- [20] M. Kibthiyah, B. Triatmoko, and A. S. Nugraha, “Penelusuran dan Isolasi Fungi Tanah Muara Pelabuhan Besuki Serta Skrining Aktivitas Antibakteri Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,” *JPSCR J. Pharm. Sci. Clin. Res.*, vol. 6, no. 2, p. 128, 2021, doi: 10.20961/jpscr.v6i2.44275.
- [21] P. Cos, V. AJ, B. DV, and M. L., “Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro ‘proof-of-concept,’” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 106, no. 3, pp. 290–302, Jul. 2006, doi: 10.1016/J.JEP.2006.04.003.
- [22] G. R. Savitri, B. Triatmoko, and A. S. Nugraha, “Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Tumbuhan Anyang-Anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*,” *JPSCR J. Pharm. Sci. Clin. Res.*, vol. 5, no. 1, p. 22, 2020, doi: 10.20961/jpscr.v5i1.32206.
- [23] M. Venkatachalam, L. Gérard, C. Milhau, F. Vinale, L. Dufossé, and M. Fouillaud, “Salinity and Temperature Influence Growth and Pigment Production in the Marine-Derived Fungal Strain *Talaromyces albobiverticillius* 30548,” *Microorganisms*, vol. 7, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.3390/MICROORGANISMS7010010.
- [24] G. Kapoor, S. Saigal, and A. Elongavan, “Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians,” *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, vol. 33, no. 3. Wolters Kluwer -- Medknow Publications, pp. 300–305, Jul. 01, 2017, doi: 10.4103/joacp.JOACP_349_15.
- [25] G. A. Marzluf, “Introduction to Mycology,” in *Methods for General and Molecular Microbiology*, ASM Press, 2014, pp. 925–928.
- [26] J. Kim and M. D. Rose, “Stable Pseudohyphal Growth in Budding Yeast Induced by Synergism between Septin Defects and Altered MAP-kinase Signaling,” *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 12, p. 1005684, 2015, doi: 10.1371/journal.pgen.1005684.
- [27] A. Gontar, M. J. Bottema, B. J. Binder, and H. Tronolone, “Characterizing the shape patterns of dimorphic yeast pseudohyphae,” *R. Soc. Open Sci.*, vol. 5, no. 10, Oct. 2018, doi: 10.1098/rsos.180820.
- [28] Q. Li, X. Chen, Y. Jiang, and C. Jiang, “Morphological Identification of Actinobacteria,” in *Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications*, InTech, 2016.
- [29] M. K.A.A.R, T. M.M.J, N. A. I., N. S., and D. I., “Screening of Antibacterial Activity of Endophytic Fungi Isolated From Different Leaf Ages of Curcuma Mangga Using Different,” *Int. J. Res. Med. Heal. Sci.*, vol. 4, no. 9, 2015.
- [30] D. Thirumurugan, A. Cholarajan, S. S. S. Raja, and R. Vijayakumar, “An Introductory Chapter: Secondary Metabolites,” in *Secondary Metabolites - Sources and Applications*, InTech, 2018.
- [31] S. M. Abdel-Aziz, M. M. Abo Elsoud, and A. A. H. Anise, *Microbial Biosynthesis: A Repertory of Vital Natural Products*. Elsevier Inc., 2017.
- [32] C. Roullier *et al.*, “Time dependency of chemodiversity and biosynthetic pathways: AnLC-MS metabolomic study of Marine-Sourced penicillium,” *Mar. Drugs*, vol. 14, no. 5, 2016, doi: 10.3390/md14050103.
- [33] S. Phale, “Yeast: Characteristics and Economic Significance,” *J. Bioprocess. Biotech.*, vol. 08, no. 05, pp. 8–10, 2018, doi: 10.4172/2155-9821.1000337.
- [34] L. Peter, “Chemical Investigations of the Alkaloids from the Plants of the Family Elaeocarpaceae Author ALKALOIDS FROM THE PLANTS OF THE FAMILY ELAEOCARPACEAE Peter L . Katavic , BSc (Hons) School of Science / Natural Product Discovery (NPD) Faculty of Science , ” 2006.
- [35] H. Kristanti and W. A. S. Tunjung, “DETECTION OF ALKALOID, FLAVONOID, AND TERPENOID COMPOUNDS IN BREAD (*Artocarpus communis* Forst.) LEAVES AND PULPS,” *KnE Life Sci.*, vol. 2, no. 1, p. 129, Sep. 2015, doi:

- 10.18502/KLS.V211.131.
- [36] D. Jakubczyk and F. Dussart, "Selected fungal natural products with antimicrobial properties," *Molecules*, vol. 25, no. 4. MDPI AG, Feb. 18, 2020, doi: 10.3390/molecules25040911.
- [37] Z. A. Mahmood, S. W. Ahmed, I. Azhar, M. Sualeh, M. T. Baig, and S. M. S. Zoha, "Bioactive alkaloids produced by fungi I. Updates on alkaloids from the species of the genera *Boletus*, *Fusarium* and *Psilocybe*," *Pak. J. Pharm. Sci.*, vol. 23, no. 3, pp. 349–357, 2010.
- [38] Z. Jiang, C. Kempinski, and J. Chappell, "Extraction and Analysis of Terpenes/Terpenoids," *Curr. Protoc. Plant Biol.*, vol. 1, no. 2, pp. 345–358, Mar. 2016, doi: 10.1002/cppb.20024.
- [39] D. Pifat, "Confidence of Measuring Response Assay," 2003.
- [40] A. C. Guimarães *et al.*, "Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils," *Molecules*, vol. 24, no. 13, 2019, doi: 10.3390/molecules24132471.
- [41] A. M. Elissawy, M. El-Shazly, S. S. Ebada, A. N. B. Singab, and P. Proksch, "Bioactive terpenes from marine-derived fungi," *Mar. Drugs*, vol. 13, no. 4, pp. 1966–1992, 2015, doi: 10.3390/md13041966.