

## Isolasi Fungi Tanah Kabupaten Situbondo serta Skrining Aktivitas Antibakteri terhadap *Pseudomonas Aeruginosa* (Soil Fungi Isolation from Situbondo District and Screening of Antibacterial Activities against *Pseudomonas Aeruginosa*)

FAWWAS B PUTRA P, BAWON TRIATMOKO, ARI SATIA NUGRAHA\*

Drug Utilisation and Discovery Research Groups, Fakultas Farmasi, Universitas Jember  
Jl. Kalimantan I/2, Jember, Jawa Timur, Indonesia 68121.

Diterima 26 Juli 2019, Disetujui 29 Januari 2020

**Abstrak:** Resistensi agen antibakteri terhadap bakteri menjadi perhatian serius. Pencarian senyawa antibakteri baru dari tanaman obat dapat mengakibatkan eksploitasi bahan alam secara berlebihan. Oleh karena itu pencarian sumber alternatif baru perlu dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mencari agen antibakteri baru yang berasal dari fungi tanah yang diisolasi dari tanah rawa di kawasan Pantai Pasir Putih Kabupaten Situbondo dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Isolasi dilakukan dengan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) yang dilarutkan dalam air laut. Hasil dari isolasi didapatkan 5 isolat fungi. Fungi dengan kode IS-STB-III-4 dan IS-STB-III-5 memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan uji antagonis. Fungi tanah potensial dilakukan fermentasi selama 14 hari dan dilakukan ekstraksi dengan pelarut etil asetat. Hasil ekstraksi dilarutkan dalam pelarut DMSO 10% dengan seri konsentrasi 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 4000 µg/mL, 6000 µg/mL, 8000 µg/mL yang akan digunakan sebagai larutan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram. Hasil uji aktivitas ekstrak menunjukkan hasil yang berbanding lurus dengan konsentrasi ekstrak. Hasil analisis dan profiling senyawa dalam ekstrak dengan instrumen Kromatografi Cepat Kinerja Tinggi (KCKT) menunjukkan bahwa ekstrak mengandung alkaloid yang kemudian diisolasi dan diidentifikasi dengan KCKT.

**Kata kunci:** Fungi tanah, antibakteri, *Pseudomonas aeruginosa*.

**Abstract:** Bacterial resistance to antibiotics is a serious concern. The search for new antibacterial compounds from medicinal plants can result in overexploitation of natural ingredients. Therefore, it is necessary to search for new alternative sources. This study was aimed to find new antibacterial agents derived from soil fungi isolated from swampy soil in the Pasir Putih Beach area of Situbondo Regency in inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). Isolation was carried out using *Potato Dextrose Agar* (PDA) dissolved in sea water. The isolation results showed that 5 isolates fungi. The fungi IS-STB-III-4 and IS-STB-III-5 have the potential to inhibit bacterial using antagonist tests. Potential soil fungi were fermented for 14 days and extracted with ethyl acetate as a solvent. The extraction results were dissolved in 10% DMSO with a concentration series of 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 4000 µg/mL, 6000 µg/mL, 8000 µg/mL which will be used for antibacterial activity test using the disc diffusion method. The extract activity test showed results that were directly proportional to the extract concentration. The analysis and profiling of the extract using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) instrument showed that the extract contained alkaloids which were then isolated and identified by HPLC.

**Keywords:** Soil fungi, antibacterial, *Pseudomonas aeruginosa*.

---

\*Penulis korespondensi  
email: arisatia@unej.ac.id

## PENDAHULUAN

PENYAKIT infeksi menjadi masalah besar yang di hadapi oleh negara-negara di dunia termasuk Indonesia. Penyakit yang bersumber dari mikroorganisme patogen seperti parasit, virus, jamur dan bakteri ini menjadi salah satu penyebab utama kematian di dunia. Penyakit infeksi di Indonesia tergolong dalam sepuluh besar penyakit penyebab kematian dengan presentase 9,5% dengan rincian presentase 5,2% untuk penyakit infeksi saluran pernafasan dan 4,3% untuk tuberkulosis <sup>(1)</sup>.

Penyakit infeksi yang diterapi dengan agen antibakteri sering meimbulkan masalah resistensi akibat penggunaan yang kurang tepat. Resistensi adalah ukuran kerentanan apakah mikroorganisme tergolong sebagai 'rentan', 'menengah' atau 'tahan' terhadap agen antibakteri <sup>(2)</sup>. Masalah resistensi antibakteri yang terjadi di Indonesia banyak terjadi pada golongan bakteri patogen gram negatif <sup>(3)</sup>. Salah satu bakteri patogen gram negative yang telah mengalami resisten adalah *P. aeruginosa*. Bakteri *P. aeruginosa* telah resisten terhadap ampicilin, trimetoprim, sefurosim, gentamisin, seftriakson, eritromisin, kotrimoksazol, tetrasiklin, sefadroksil, amoksisilin, piperasilin, nalidixid, tobramisin, sulfonamida dengan tingkat resistensi  $\geq 50$  <sup>(4)</sup>. Adanya permasalahan resistensi ini perlu disikapi dengan serius dengan mulai mencari antibakteri baru. Bahan alam telah menjadi sasaran dalam pencarian agen antibakteri baru.

Indonesia sebagai negara dengan kawasan laut dan daratan yang luas menyajikan sumber keanekaragaman hayati yang melimpah. Berbagai macam keanekaragaman hayati ini merupakan peluang besar dalam pengembangan obat karena terdapat banyak macam tumbuhan yang memiliki potensi sebagai obat-obatan. Penggunaan ekstrak tanaman dalam pencarian agen antibiotik baru dalam prakteknya memiliki beberapa kelemahan. Kebutuhan jumlah tanaman yang tidak sedikit untuk menghasilkan ekstrak menjadi salah satu kelemahan yang akan berdampak pada kelangkaan.

Berdasarkan sejarah, agen antibakteri banyak ditemukan di fungi <sup>(5)</sup>. Salah satu contohnya adalah penemuan penisillin dari *Penicillium notatum* oleh Alexander Fleming pada tahun 1928 <sup>(6)</sup>. Oleh karena itu diperlukan strategi yang lebih baik untuk mengembangkan agen antibakteri tanpa menyebabkan kerugian besar bagi lingkungan. Salah satu strateginya adalah menggunakan fungi tanah. Beberapa penelitian telah menyebutkan potensi fungi tanah dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Namun penelitian tentang fungi tanah di Indonesia masih sangat minim dan jarang dilakukan. Oleh karena itu

penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi fungi tanah dari kawasan Kabupaten Situbondo dan melakukan uji aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Tanah rawa yang diperoleh dari wilayah Pantai Pasir Putih Kecamatan Bungatan - Kabupaten Situbondo, aquades steril, NaCl, Potato Dextrose Agar (PDA), Mueller Hinton Agar (Merck), bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, DMSO, BaCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan gentamisin cakram 10 µg sebagai kontrol positif.

**Alat.** Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain *Laminar Air Flow*, inkubator, neraca analitik (Ekhous), autoklaf (TOMY ES-315), *hot plate* (UC-152), *vortex* (GENE-2), mikropipet (SOCOREX), cawan petri, jarum ose, pinset, *yellow tip*, *blue tip*, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vial, spatula logam, *beaker glass*, pipet tetes, jangka sorong (TRICLE BRAND).

**Pengambilan Tanah Rawa.** Pengambilan tanah rawa dilakukan di kawasan Pantai Pasir Putih, Kabupaten Situbondo dengan menancapkan pipa sedalam 40 cm. Pengambilan dilakukan dalam 3 replikasi dengan jarak minimal 2 meter.

**Isolasi Fungi Tanah.** Isolasi dilakukan pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan penambahan air laut dan NaCl 2%. 10 gram tanah di suspensikan pada air steril dan di sentrifugasi dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Supernatan di ambil dan di tuang kedalam media isolasi.

**Skrining Fungi Potensial.** Skrining dilakukan dengan uji kontak langsung atau uji antagonis fungi dengan bakteri uji. Potongan isolat fungi dengan diameter 1 cm di tempelkan pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) yang berisi bakteri *P.aeruginosa* dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

**Fermentasi Fungi Potensial.** Proses fermentasi dilakukan pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Empat sumuran fungi dengan diameter 1 cm dimasukkan dalam 150 mL media PDB. Fermentasi dilakukan selama 14 hari dengan penambahan pengadukan melalui *shaker*.

**Ekstraksi Hasil Fermetasi.** Ekstraksi dilakukan dengan pelarut etil asetat. Penyaringan dilakukan untuk memisahkan fungi dengan media fermentasi. Volume media dihitung dan ditambahkan dengan etil asetat dengan perbandingan 1:1. Campuran dimasukkan kedalam corong pisah dan dilakukan penggojokan selama 10 menit. Campuran didiamkan hingga terben-

tuk 2 fase. Fase etil asetat yang berada di atas ditampung dalam cawan untuk diuapkan dan dikeringkan.

**Uji Aktivitas Antibakteri.** Uji aktivitas antibakteri dilakukan metode difusi cakram dengan diameter cakram berukuran 6 mm. Uji aktivitas dilakukan dengan seri konsentrasi larutan sebesar 1000 µg/mL, 2000 µg/mL, 4000 µg/mL, 6000 µg/mL, 8000 µg/mL dalam DMSO 10%. Kontrol positif yang digunakan adalah cakram gentamisin 10 µg.

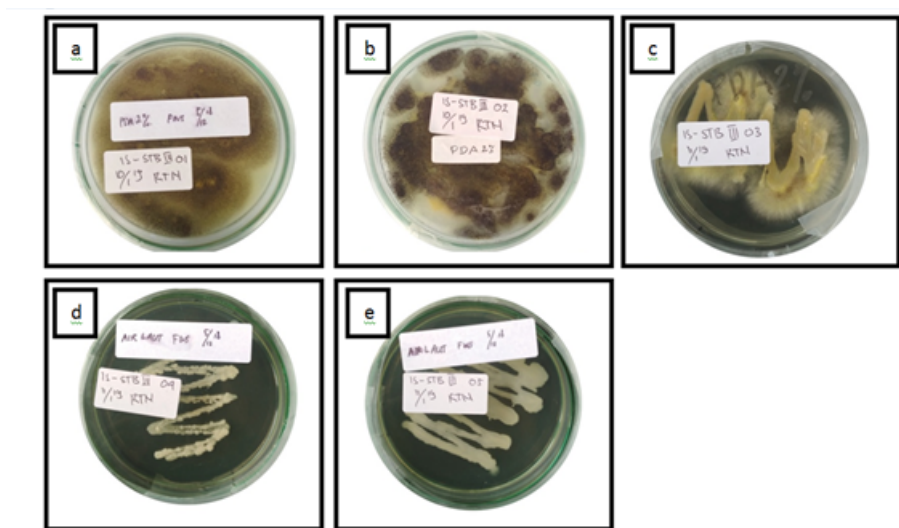
**Analisis Data.** Analisis data dilakukan dengan SPSS yang dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA* dan *LSD (Least Significant Difference)* untuk mengetahui perbedaan bermakna dari setiap konsentrasi uji yang digunakan.

**Profiling Senyawa Ekstrak.** Profiling senyawa dalam ekstrak dilakukan dengan metode KCKT. Ekstrak ditimbang dan dilarutkan dalam metanol dengan konsentrasi 100 ppm. Fase gerak yang digunakan adalah air : asetonitril dengan perbandingan 20 : 100. Detektor yang digunakan adalah detector UV-Vis pada panjang gelombang 254 nm dan dieluasi selama 35 menit.

**Isolasi Senyawa Golongan Alkaloid.** Ditimbang 100 mg ekstrak kering dan dilarutkan dalam metanol. Campuran ditambah dengan 5 mL HCl 10% dan diklorometana 5 mL. Fase air asam diambil dan ditambah dengan NH<sub>3</sub> hingga pH > 10 dan ditambahkan diklorometana. Fase diklorometana diambil dan dikeringkan dalam cawan.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Isolasi Fungi Tanah.** Isolasi yang dilakukan menggunakan dua jenis media, yaitu PDA dengan air laut dan PDA dengan NaCl 2%. Pemilihan media didasarkan pada hasil optimasi pertumbuhan fungi. Media PDA air laut dan PDA 2% memiliki pertumbuhan yang lebih beragam dibandingkan media tanpa penambahan ataupun media dengan penambahan NaCl 1%.



Gambar 1. Hasil isolasi dan pemurnian fungi tanah, a). IS-STB-III-1; b). IS-STB-III-2; c). IS-STB-III-3; d). IS-STB-III-4; e). IS-STB-III-5; f). Media PDA.

Gambar 1 menunjukkan 2 bentuk fungi yaitu kapang dan khamir. Fungi berbentuk kapang memiliki hifa sebagai ciri khasnya yang digunakan sebagai alat reproduksi vegetatif, sedangkan fungi dengan bentuk khamir tumbuh dengan morfologi menyerupai koloni bakteri<sup>(7)</sup>. Berdasarkan morfologinya, fungi yang tumbuh diisolasi menjadi 5 isolat fungi dengan kode IS-STB-III-1, IS-STB-III-2, IS-STB-III-3, IS-STB-III-4, IS-STB-III-5. Fungi dengan kode IS-STB-III-1 tumbuh dengan bentuk kapang dengan dasar berwarna kuning dan spora berwarna hitam. Fungi IS-STB-III-2 tumbuh hampir sama dengan IS-STB-III-1 namun

tidak memiliki dasar berwarna kuning dengan spora berwarna hitam. IS-STB-III-3 tumbuh berwarna kuning dengan serabut tipis berwarna putih. IS-STB-III-4 tumbuh dengan bentuk khamir dengan permukaan bergaris dan berwarna putih tulang. IS-STB-III-5 tumbuh mirip dengan IS-STB-III-4 namun memiliki permukaan yang mulus dan berwarna putih.

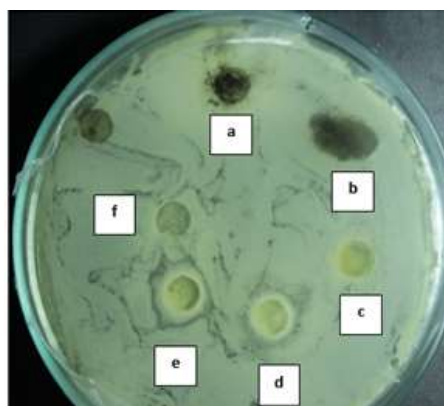
**Skrining Fungi Tanah Potensial.** Hasil skrining dengan uji antagonis dirangkum dalam Tabel 1. Merujuk pada Gambar 2, fungi tanah IS-STB-III-4 dan IS-STB-III-5 memiliki zona bening yang menunjukkan aktivitas penghambatan bakteri. Fungi dengan kode

IS-STB-III-5 memiliki zona bening yang lebih luas dibandingkan IS-STB-III-4. Fungi tanah IS-STB-III-1, IS-STB-III-2, dan IS-STB-III-3 sama sekali tidak memiliki zona bening yang menunjukkan tidak adanya aktivitas dari fungi tanah dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

**Tabel 1. Hasil skrining fungi tanah potensial.**

Nama fungi	Zona hambat
IS-STB-III-1	-
IS-STB-III-2	-
IS-STB-III-3	-
IS-STB-III-4	+
IS-STB-III-5	+

**Uji Aktivitas Antibakteri.** Dalam penelitian ini hanya fungi tanah dengan kode IS-STB-III-5 yang dilakukan fermentasi, karena fungi tanah dengan kode IS-STB-III-4 mengalami kontaminasi selama masa penyimpanan. Hasil uji aktivitas antibakteri fungi tanah IS-STB-III-5 dirangkum dalam Tabel 2. Berdasarkan analisis data, kenaikan konsentrasi dari ekstrak IS-STB-III-5 berbanding lurus dengan



**Gambar 2. Hasil uji antagonis isolat fungi, a). IS-STB-III-1; b). IS-STB-III-2; c). IS-STB-III-3; d). IS-STB-III-4; e). IS-STB-III-5; f). Media PDA.**

diameter zona hambat yang dihasilkan. Data yang diolah melalui program SPSS menunjukkan bahwa data yang dihasilkan normal dan homogen dengan nilai signifikansi  $> 0,05$ . Uji *One Way ANOVA* dan *LSD (Least Significant Difference)* menunjukkan perbedaan bermakna dari setiap seri konsentrasi uji dalam 3 kali replikasi.

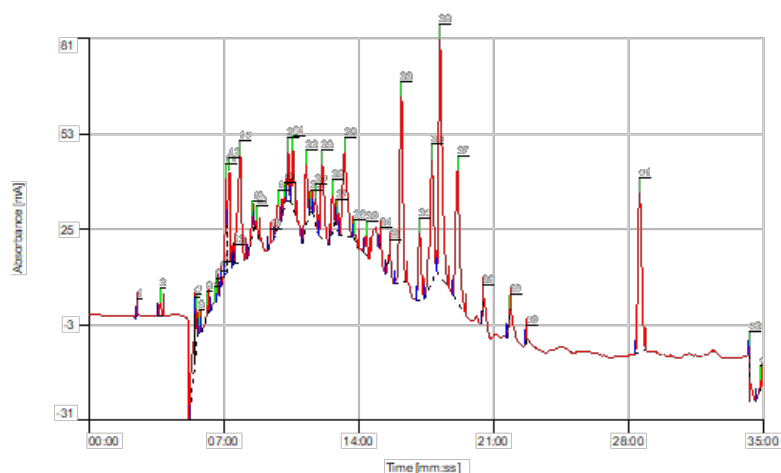
**Tabel 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak IS-STB-III-5.**

Konsentrasi ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rata-rata zona hambat (mm)	Simpangan baku (mm)	Koefisien variasi (%)
1000	6,43 <sup>(a)</sup>	0,21	3,26
2000	7,13 <sup>(b)</sup>	0,15	2,13
4000	8,17 <sup>(c)</sup>	0,15	1,83
6000	9,40 <sup>(d)</sup>	0,20	2,13
8000	11,40 <sup>(e)</sup>	0,10	0,88

Adanya notasi huruf menunjukkan perbedaan bermakna dari masing-masing seri konsentrasi uji berdasarkan uji *LSD (Least Significant Difference)*

**Profiling Ekstrak dan Deteksi Senyawa.** Metode analisis dan pemisahan dilakukan dengan instrument KCKT. Kurva hasil analisis menunjukkan hasil yang maksimal apabila kondisi analisis mampu memisahkan puncak secara baik selama eluasi. Berdasarkan hasil kurva eluasi didapatkan beberapa puncak yang ditunjukkan pada Gambar 3. Puncak yang muncul dalam kurva merupakan identitas dari golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etil asetat IS-STB-

III-5. Untuk menghindari puncak yang dihasilkan oleh *noise*, puncak dengan absorbansi dominan diatas 25 mAU diindikasikan sebagai identitas senyawa mayor dari ekstrak etil asetat IS-STB-III-5. Berdasarkan kurva yang didapat, terdapat 8 puncak dengan absorbansi diatas 25 mAU. Waktu munculnya puncak dan luas area puncak yang diduga sebagai senyawa mayor dalam ekstrak dirangkum dalam Tabel 3.



Gambar 3. Profil kromatogram IS-STB-III-5 dengan HPLC.

Tabel 3. Identitas senyawa mayor dalam ekstrak etil asetat IS-STB-III-5.

Nama puncak	Ret. time (mm:ss)	Luas area (mAs)	Tinggi puncak (mAU)
Puncak 11	07:04	128,6	28,3
Puncak 12	07:16	248,2	28,8
Puncak 14	07:50	447,7	31,1
Puncak 33	16:11	644,5	54,8
Puncak 35	17:46	495,6	36,2
Puncak 36	18:11	874,2	69,3
Puncak 37	19:06	565,0	38,6
Puncak 41	28:33	649,0	46,8

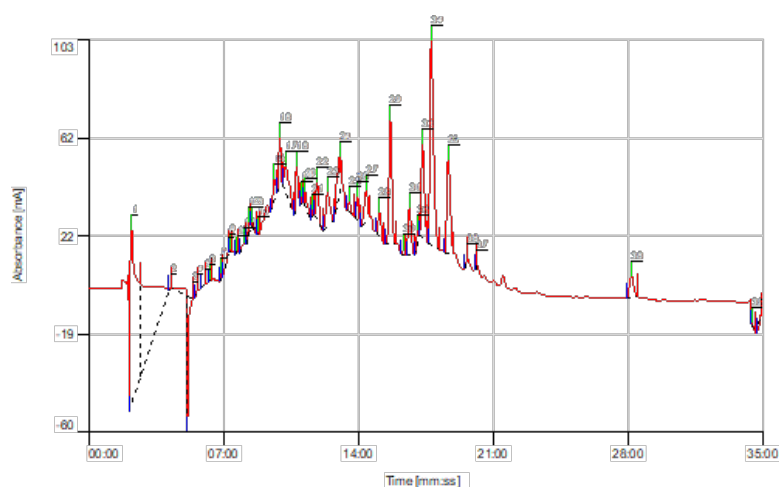
Golongan senyawa potensial yang biasa digunakan sebagai agen antibakteri adalah golongan senyawa alkaloid. Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik dengan sifat basa dan memiliki atom nitrogen yang termasuk dalam cincin heterosiklik<sup>(8)</sup>. Dalam bentuk struktur kimianya, alkaloid mengandung gugus atom nitrogen yang biasa dijadikan target dalam penemuan agen antibakteri baru. Dalam skrining fitokimia dengan menggunakan metode KLT menunjukkan ekstrak etil asetat IS-STB-III-5 mengandung senyawa golongan alkaloid. Adanya golongan senyawa alkaloid dalam ekstrak ditunjukkan dengan munculnya noda berwarna jingga dengan reagen dragendorff.

Metode pemisahan atau isolasi senyawa golongan alkaloid didasarkan pada kelarutan suasana asam dan basa<sup>(9)</sup>. Dalam suasana asam, golongan senyawa yang bersifat basa akan membentuk garam dan larut dalam fase air, sedangkan senyawa yang bersifat asam akan berbentuk molekul dan terlarut dalam pelarut organik. Berat rendemen yang dihasilkan dari 100 mg ekstrak adalah 2,131 g. Serbuk yang didapat berbentuk kristal

dengan warna putih. Kebanyakan alkaloid yang diisolasi memiliki bentuk kristal dan tidak berwarna atau berwarna untuk beberapa senyawa seperti berberin dengan warna kuning dan betanin berwarna merah<sup>(10)</sup>.

Serbuk hasil isolasi di analisis dengan KCKT untuk mengetahui identitas dari senyawa golongan alkaloid yang terdapat dalam serbuk. Hasil elusi ditunjukkan pada Gambar 4. Sejumlah 5 puncak dominan dianalisis sebagai identitas senyawa golongan alkaloid yang terdapat dalam serbuk ditampilkan dalam Tabel 4.

Skrining KLT untuk golongan senyawa lain dalam serbuk yang didapat dilakukan untuk mengetahui komponen pengganggu dari golongan senyawa lain yang terdapat dalam ekstrak. Hasil skrining menunjukkan hasil negatif dengan tidak munculnya noda yang menunjukkan golongan senyawa lain seperti fenolat, flavonoid dan terpenoid. Identitas yang didapat dari profil HPLC dapat digunakan untuk penelitian lanjutan untuk mengisolasi dan mendapat senyawa murni dari golongan alkaloid yang bertanggung jawab dalam aktivitas antibakteri.



Gambar 4. Profil kromatogram senyawa golongan alkaloid dengan HPLC.

Tabel 4. Identitas senyawa mayor golongan alkaloid.

Nama Puncak	Ret. Time (mm:ss)	Luas area (mAs)	Tinggi Puncak (mV)
Puncak 1	02:13	1749,8	72,0
Puncak 29	15:38	545,7	51,5
Puncak 33	17:18	448,0	39,3
Puncak 34			
	17:45	1116,9	85,4
Puncak 35	18:38	506,4	38,6

## SIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa proses penelusuran dan isolasi fungi tanah dari tanah rawa di Kabupaten Situbondo didapatkan 5 isolat fungi dengan kode IS-STB-III-1, IS-STB-III-2, IS-STB-III-3, IS-STB-III-4 dan IS-STB-III-5. Terdapat 2 dari 5 fungi tanah yang memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri yaitu IS-STB-III-4 dan IS-STB-III-5. Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menunjukkan hasil positif dengan munculnya zona bening disekitar cakram yang berisi ekstrak etil asetat fungi tanah IS-STB-III-5. Hasil skrining dan profiling menunjukkan adanya kandungan alkaloid dari ekstrak fungi tanah yang dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai agen antibakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Who statistical profile : World Health Organization on Behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. 2015. diambil dari [http://who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/en/](http://who.int/gho/mortality_burden_disease/en/). diakses 21 April, 2019
2. Weber JT. Antimicrobial Resistance Edisi 6. Switzerland: S. Karger AG; 2010. P. 35–50
3. Lestari ESJA, Severin PMG, Filius K, Kuntaman DO, Duerink U, Hadi H, Wahjono *et al.* Antimicrobial resistance among commensal isolates of escherichia coli and staphylococcus aureus in the indonesian population inside and outside hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007. 27(1):45-51.
4. Rukmono P, Zuraida R. Uji kepekaan antibiotik terhadap pseudomonas aeruginosa penyebab sepsis neonatorum. *Sari Pediatri.* 2013. 14(5) :332–6.
5. Zhu F, Qin C, Tao L, Liu X, Shi Z, Ma X, Jia J, *et al.* Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. *PNAS.* 2011. 108(31) :12943–8.
6. Lestari ND. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri tumbuhan epifit liken *Parmelia cetrata* Ach. [skripsi]. Jurusan Farmasi Universitas Jember; 2018. hal 1-4.
7. Cannon P, Aguirre-Hudson B, Aime MC, Ainsworth AM, Bidartondo M, Gaya E, *et al.* Definition and diversity. In: Willis KJ, editor. *State of the world's fungi.* London: Royal Botanic Gardens – Kew; 2018. p. 1-12.
8. Gita T. Isolasi dan karakterisasi senyawa alkaloid ekstrak metanol sponge *Clathria sp* [skripsi]. Jurusan Kimia Universitas Lampung; 2018. hal. 1-3.
9. Nugraha AS, Haritakun R, Lambert JM, Dillon CT,

- Keller PA. Alkaloids from the root of Indonesian *Annona muricata* L. *Nat Prod Res.* 2021. 35(3): 481-9.
10. Pranata I. Pengaruh suhu dan waktu penyimpanan terhadap stabilitas triprolidin hcl dan pseudoephedrin hcl dalam sediaan sirup obat flu [tugas akhir]. Jurusan Analis Kimia Politeknik Negeri Bandung; 2012. hal 9 – 26.