

Evaluasi Potensi Penghambatan Ekstrak Etil Asetat Isolat Fungi Indonesia terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922

Evaluation of the Inhibitory Potential of Indonesian Fungal Ethyl Acetate Extracts against Staphylococcus aureus ATCC 25923 and Escherichia coli ATCC 25922

Paryany Pangeran¹, Indah Purwantini^{2,3*}, Evita Chrisnayanti⁴

¹ Magister Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

² Departemen Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

³ Pusat Riset Tumbuhan Obat dan Bahan Alam, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada

⁴ Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

Corresponding author: Desi Kusumawati; Email: rismasaktip@gmail.com

Submitted: 26-06-2024

Revised: 13-09-2024

Accepted: 13-09-2024

ABSTRAK

Indonesia dengan iklim tropis menjadi tempat ideal bagi pertumbuhan fungi yang diketahui menjadi salah satu sumber senyawa bioaktif, termasuk antibiotik. Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) memiliki koleksi fungi yang diisolasi dari berbagai daerah di Indonesia dari tahun 2015 hingga 2020 yang berpotensi besar sebagai sumber senyawa antibakteri baru. Skrining aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* telah dilakukan untuk ekstrak etil asetat isolat fungi tersebut dengan metode difusi cakram. Sepuluh dari 22 ekstrak menunjukkan penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan hambatan terbesar dihasilkan oleh ekstrak F4-20 dengan diameter zona penghambatan 14,773±1,387 mm. Satu ekstrak, yaitu F4-7 menunjukkan penghambatan terhadap *Escherichia coli* dengan diameter zona penghambatan 9,939±0,578 mm. KLT Bioautografi dilakukan terhadap ekstrak-ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji. Berdasarkan hasil KLT bioautografi diperkirakan terdapat 6 senyawa antibakteri yaitu senyawa dengan Rf 0,63 dan 0,7 (F4-2), Rf 0,46 (F4-3), Rf 0,77 (F4-11), Rf 0,43 (F4-15), Rf 0,68 (F4-20). Senyawa dengan Rf 0,7 (F4-2) teridentifikasi sebagai senyawa diterpen berdasarkan visualisasi menggunakan reagen anisaldehyd-asam sulfat.

Kata kunci: Fungi; Antibakteri; KLT Bioautografi; Faktor Retensi

ABSTRACT

Indonesia with its tropical climate is an ideal place for the growth of fungi, which are known as one of the prolific sources of bioactive compounds, including antibiotics. The National Research and Innovation Agency (BRIN) has a collection of fungi isolated from several regions in Indonesia from 2015 to 2020 that have great potential as a source of new antibacterial compounds. Screening of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* was carried out on ethyl acetate extracts of these fungal isolates using disc diffusion method. Ten out of 22 extracts showed inhibition against *Staphylococcus aureus* and the most active was an extract encoded F4-20 with an inhibition zone diameter of 14.773±1.387 mm. Extract F4-7 showed inhibition against *Escherichia coli* with an inhibition zone diameter of 9.939±0.578 mm. TLC Bioautography was performed on extracts that were able to inhibit the growth of both test bacteria. Based on the TLC bioautography results, it is estimated that there are 6 antibacterial compounds, namely compounds with Rf 0.63 and 0.7 (F4-2), Rf 0.46 (F4-3), Rf 0.77 (F4-11), Rf 0.43 (F4-15), Rf 0.68 (F4-20). Compounds with Rf 0.7 (F4-2) were identified as diterpene compounds based on visualization using anisaldehyde-sulfuric acid reagent.

Keywords: Fungi; Antibacterial; TLC Bioautography; Retention factor (Rf)

PENDAHULUAN

Penggunaan antibiotik yang tidak tepat telah berdampak besar pada kondisi kesehatan global saat ini. Gen resisten sebagai hasil adaptasi bakteri patogen terhadap antibiotik telah menyebar luas di seluruh dunia dan menunjukkan peningkatan yang mengkhawatirkan karena telah menyebabkan ribuan kematian setiap tahunnya (Urban-Chmiel dkk., 2022). *Antimicrobial Resistance Collaborators*,

(2022) menyatakan bahwa dua bakteri patogen penyebab kematian tertinggi akibat resistensi antibiotik adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* sehingga penemuan antibiotik baru terhadap kedua bakteri patogen tersebut harus terus diupayakan.

Fungi sebagai salah satu sumber alami senyawa antimikroba, telah memainkan peran penting dalam penemuan dan pengembangan antibiotik (Demain & Sanchez, 2009). Fleming, pada tahun 1928, secara tidak sengaja menemukan penisilin, senyawa antibakteri pertama yang ditemukan dari fungi *Penicillium* (Tan & Tatsumura, 2015). Selama lebih dari 75 tahun sejak penemuannya, penisilin dan turunannya telah menyelamatkan jutaan nyawa dan berperan penting dalam memperpanjang harapan hidup manusia (Gaynes, 2017). Keberhasilan terapi penisilin telah menginspirasi penelitian lebih lanjut untuk menemukan antibiotik baru dari fungi.

Berbagai jenis metabolit sekunder dihasilkan fungi sebagai respon terhadap lingkungan, diantaranya senyawa poliketida, terpenoid, peptida non-ribosom dan alkaloid (Deyi dkk., 2020; Xu dkk., 2014). Sebanyak 16500 senyawa antimikroba telah diketahui merupakan metabolit sekunder dari mikroba dan 4900 senyawa diantaranya dihasilkan oleh fungi. *Penicillium*, *Aspergillus* dan *Cladosporium* merupakan produsen lebih dari 30% senyawa antibakteri yang berhasil diisolasi dari fungi (Al-Fakih & Almaqtri, 2019; Bérdy, 2005; Li dkk., 2024).

Indonesia merupakan negara kepulauan dengan letak geografis yang sangat strategis, topografi yang bervariasi, serta iklim tropis yang memungkinkan berbagai ekosistem berkembang. Indonesia menjadi tempat tumbuh yang ideal bagi fungi. Hingga tahun 2017, ada 2273 spesies fungi yang telah diketahui (Retnowati dkk., 2019). Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) juga memiliki koleksi mikroba termasuk fungi yang diisolasi pada tahun 2015 hingga 2020 dari berbagai wilayah di Indonesia antara lain dari Serpong (Puspipetek), Ambon, Togean, Biak, Gresik, Sidoarjo dan Mojokerto. Fungi tersebut diisolasi dari berbagai sumber yaitu tanah, serasah, rayap, tanaman, air tawar dan laut. Koleksi isolat ini dapat menjadi sumber senyawa-senyawa penting bagi penemuan dan pengembangan obat baru.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui profil aktivitas antibakteri ekstrak fungi koleksi BRIN terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 yang dilakukan dengan metode difusi cakram dan dilanjutkan dengan tahapan bioautografi antibakterial terhadap ekstrak yang menunjukkan aktivitas antibakteri.

METODOLOGI

Bahan

Bahan utama yang diuji yaitu 22 ekstrak etil asetat hasil fermentasi fungi koleksi BRIN menggunakan media F4 (malt ekstrak 5 g/L, glukosa 10 g/L, dextrin 40 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, polipepton 5 g/L, *soybean meal* 5 g/L dan yeast ekstrak 2 g/L). Bahan yang digunakan pada penelitian yaitu metanol p.a (Merck), media *Nutrient Agar* (NA) (Merck), media *Nutrient Broth* (NB) (Oxoid), *Aquadest*, Alkohol 70%, Toluene p.a, Kloroform p.a, Asam Formiat, plat *silica gel* 60 GF₂₅₄, pereaksi sempnot anisaldehyd-asam sulfat. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922.

Alat

Autoklaf (Hirayama, Hiclave HVE-50), bejana KLT, bunsen, *petri dish* (Normax), Erlenmeyer (Pyrex), gelas ukur, *hot plate*, inkubator (Sakura Incubator IF-2B), jangka sorong, *Laminar Air Flow* (Labtech), mikropipet (Socorex), neraca analitik, ose, *paper disc* 6 mm (Advantec), pinset, pipet ukur, *shaker incubator* (Stuart Orbital Incubator), Spektrofotometer (SP-3000 nano Optima), tabung reaksi, vortex.

Jalannya Penelitian

Penyiapan Larutan Uji

Sebanyak 4 mg ekstrak dari masing-masing sampel dilarutkan dalam 200 μL metanol p.a kemudian dihomogenkan dengan vortex sehingga diperoleh konsentrasi larutan sebesar 20 mg/mL yang akan digunakan untuk skrining aktivitas antibakteri. Sebanyak 7,5 μL dari larutan uji yang telah disiapkan ditambahkan dengan 92,5 μL metanol kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh konsentrasi 1,5 mg/ml untuk pengujian KLT bioautografi.

Penyiapan Suspensi Bakteri

Kultur bakteri uji diambil menggunakan ose dan digoreskan pada media NA, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri dibuat dengan mengambil satu ose kultur yang telah diinkubasi kemudian dicelupkan dalam media NB dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *Optical Density* (OD) suspensi mikroba diukur pada panjang gelombang 600 nm hingga didapatkan nilai absorbansi 0,5 atau setara dengan 4×10^8 CFU/mL.

Skrining Aktivitas Antibakteri

Media uji dibuat dengan cara menuang 10 mL media NA ke dalam cawan petri, kemudian suspensi bakteri uji diinokulasikan sebanyak 100 μ L, dihomogenkan dan dibiarkan memadat. *Paper disc* diletakkan pada permukaan media dan diteteskan sebanyak 10 μ L dari masing-masing larutan uji. Pada uji ini disertakan juga kontrol negatif yaitu yaitu 10 μ L metanol untuk mengetahui pengaruh pelarut yang digunakan. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Pengujian dilakukan terhadap *S. aureus* dan *E. coli* dengan tiga replikasi. Observasi dilakukan terhadap terbentuknya zona inhibisi di sekitar *paper disc*, dilakukan pengukuran menggunakan jangka sorong. Hasil uji bersifat kualitatif yaitu hanya memberikan gambaran tentang kekuatan aktivitas antimikroba, semakin besar zona inhibisi, semakin kuat potensi aktivitasnya.

KLT Bioautografi

Ekstrak yang memiliki aktivitas antimikroba yang diperoleh dari hasil skrining difusi cakram diuji dengan metode KLT-bioautografi kontak untuk diketahui bercak senyawa aktif. Larutan ekstrak diaplikasikan pada dua plat KLT dengan menggunakan linomat, kemudian sampel dielus dengan fase gerak kombinasi toluen, kloroform, metanol dan asam formiat dengan perbandingan 40:60:20:0,6. Deteksi senyawa dilakukan dengan menggunakan sinar UV 254 nm dan 365 nm. Plat KLT selanjutnya diletakkan pada media uji selama 60 menit, kemudian plat KLT tersebut diangkat kembali dan dilanjutkan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Jarak yang ditempuh bercak dan jarak yang ditempuh pelarut diukur untuk menentukan Nilai *Retention factor* (Rf) zona bening yang tampak di sekitar bercak KLT. Untuk mengetahui jenis senyawa dilakukan penyemprotan plat KLT dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat kemudian plat dipanaskan pada suhu 105 °C selama 5 menit kemudian diamati pada cahaya tampak dan UV 365 nm.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada penelitian ini, larutan uji untuk pengujian aktivitas antibakteri metode difusi cakram disiapkan dengan konsentrasi 20 mg/mL. Difusi cakram merupakan metode yang umum digunakan untuk menguji sensitivitas suatu isolat mikroba terhadap antibiotik. Metode ini dapat digunakan dalam skrining penemuan senyawa antimikroba dari bahan alam terhadap mikroba tertentu (Balouiri dkk., 2016). Metode difusi cakram hanya memberikan hasil kualitatif, yaitu ada atau tidaknya potensi penghambatan terhadap mikroba uji sehingga tidak dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi penghambatan minimum (KHM), karena tidak dapat mengukur banyaknya senyawa atau sampel uji yang menyebar ke dalam media (Choma & Grzelak, 2011).

Uji difusi menggunakan cakram menawarkan banyak keunggulan dibandingkan metode lain, yaitu mudah dilakukan, dapat menguji berbagai senyawa antimikroba terhadap banyak mikroba uji, reproduksibel, relatif lebih murah serta mudah untuk menafsirkan hasil yang diperoleh (Jorgensen & Ferraro, 2009).

Hasil skrining aktivitas penghambatan ekstrak etil asetat fungi terhadap bakteri uji dengan metode difusi cakram ditunjukkan pada Tabel I. Terdapat sepuluh ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus*, dengan diameter zona hambat antara 9,428 \pm 1,029 mm hingga yang terbesar 14,773 \pm 1,387 mm yang dihasilkan oleh ekstrak dengan kode F4-20 yang berasal dari isolat *Cladosporium* sp. Ekstrak F4-7 dari isolat *Massarina* sp. menjadi satu-satunya yang memiliki aktivitas penghambatan terhadap *E. coli*.

S. aureus adalah bakteri Gram positif yang memiliki struktur dinding sel sederhana berupa lapisan peptidoglikan, sedangkan *E. coli* merupakan bakteri yang tidak terwarnai pada pewarnaan Gram karena memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks, terdiri dari membran luar, peptidoglikan dan membran dalam, yang menyebabkan senyawa antimikroba sulit berpenetrasi dan

Tabel I. Diameter zona hambatan ekstrak etil asetat fungi terhadap bakteri uji

Kode sampel	Isolat	Diameter Zona Hambat (mm)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
F4-1	<i>Aereobasidium</i> sp.	11,689 ± 0,749	-
F4-2	<i>Kamulsia</i> sp.	13,926 ± 0,294	-
F4-3	<i>Aereobasidium</i> sp.	10,634 ± 0,459	-
F4-4	<i>Periconia</i> sp.	-	-
F4-5	-	13,049 ± 1,618	-
F4-6	<i>Penicillium</i> sp.	-	-
F4-7	<i>Massarina</i> sp.	-	9,939 ± 0,578
F4-8	<i>Cladosporium</i> sp.	-	-
F4-9	<i>Penicillium</i> sp.	12,431 ± 2,841	-
F4-10	<i>Edenia</i> sp.	-	-
F4-11	<i>Aspergillus</i> sp.	11,159 ± 0,155	-
F4-12	<i>Penicillium</i> sp.	-	-
F4-13	<i>Talaromyces</i> sp.	9,428 ± 1,029	-
F4-14	<i>Aspergillus</i> sp.	11,042 ± 1,215	-
F4-15	<i>Periconia</i> sp.	10,250 ± 0,497	-
F4-16	<i>Kalmusia</i> sp.	-	-
F4-17	<i>Curvularia</i> sp.	-	-
F4-18	<i>Nigrospora</i> sp.	-	-
F4-19	<i>Nigrospora</i> sp.	-	-
F4-20	<i>Cladosporium</i> sp.	14,773 ± 1,387	-
F4-21	<i>Acrophialophora</i> sp.	-	-
F4-22	<i>Nigrospora</i> sp.	-	-
F4-K	-	-	-
Kontrol Pelarut	-	-	-

Keterangan: (-) tidak terdapat penghambatan, diameter diukur termasuk diameter cakram yaitu 6 mm dan nilai dinyatakan sebagai rata-rata ± SD

mencapai target intrasel (Breijyeh dkk., 2020). Selain karena perbedaan struktur bakteri uji, metode yang digunakan pada skrining aktivitas antibakteri ini memiliki kelemahan untuk senyawa yang bersifat lipofil karena kemampuan berdifusi yang terbatas pada media Agar yang berbasis air (Armengol dkk., 2021) sehingga senyawa-senyawa tersebut akan sulit menunjukkan potensinya.

Berdasarkan hasil skrining aktivitas antibakteri, sekitar 50% ekstrak yang diuji menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *S.aureus* yaitu dari genus *Cladosporium*, *Kamulsia*, *Penicillium*, *Aereobasidium*, *Aspergillus*, dan *Talaromyces* serta genus *Massarina* yang aktif menghambat *E. coli*. Hal ini sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa, *Cladosporium oxysporum* menghasilkan senyawa dengan aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans*, *E. coli*, dan *S. aureus* (Setyaningrum dkk., 2018); metabolit *Cladosporium* sp. menunjukkan KHM 4 µg/mL dan 16 µg/mL terhadap *S. aureus* 209P dan *C. albicans* FIM709 (Han dkk., 2021). *Penicillium* juga telah dikenal sebagai penghasil senyawa sejumlah antibiotik. Senyawa poliketida yang dihasilkan fungi *Penicillium commune* QSD-17 yang diisolasi dari sedimen laut di Laut Cina Selatan memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, dan *B. subtilis* serta mampu menghambat fungi patogen *C. albicans* (Gao dkk., 2011). *Penicillium steckii* P2648 yang berasosiasi dengan spons laut menghasilkan senyawa alkaloid yang menunjukkan aktivitas penghambatan yang kuat terhadap bakteri patogen *E. coli*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa* (Yao dkk., 2021). *Penicillium* sp. ZZ380 yang diisolasi dari laut menghasilkan senyawa monoterpen yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA dan *E. coli* (Song dkk., 2018). Hal serupa juga ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan terhadap genus *Talaromyces* yaitu *Talaromyces* sp. MCCC 3A01752, *Talaromyces macrosporus* KCU-1NK8 dan *Talaromyces* sp. strain LF458 yang menunjukkan potensi antibakteri terhadap *S. aureus* (Chaiyosang dkk., 2019; Hong dkk., 2024; Wu dkk., 2015).

Berdasarkan hasil penelitian ini menarik untuk diketahui bahwa ada potensi besar yang belum banyak tergali dari genus *Kamulsia*, *Aerobasidium* dan *Massarina*. Oh dkk, (2003) mengisolasi beberapa senyawa baru dari *Massarina tunicata* yang mempunyai penghambatan terhadap *Bacillus subtilis* (ATCC 6051) dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Dua senyawa baru lain, spiromassaritone dan massariphenone diisolasi dari *Massarina*, sp (Wahab dkk., 2007), akan tetapi uji terhadap *Candida albicans* dan *Staphylococcus aureus* tidak menunjukkan aktivitas. Pada penelitian ini ekstrak isolat *Massarina sp* menunjukkan zona hambatan terhadap bakteri Gram Negatif, *Escherichia coli*. Adapun dari genus *Aerobasidium*, sebagian besar senyawa bioaktif termasuk antibakteri dilaporkan dihasilkan dari *Aerobasidium pullulans*. Temuan ini membuka peluang untuk melakukan penelitian lebih mendalam mengenai bioaktivitas dari genus *Massarina*, *Kamulsia* maupun *Aerobasidium* sehingga dapat berperan dalam pengembangan antibiotik baru untuk mengatasi masalah resistensi obat yang berkembang.

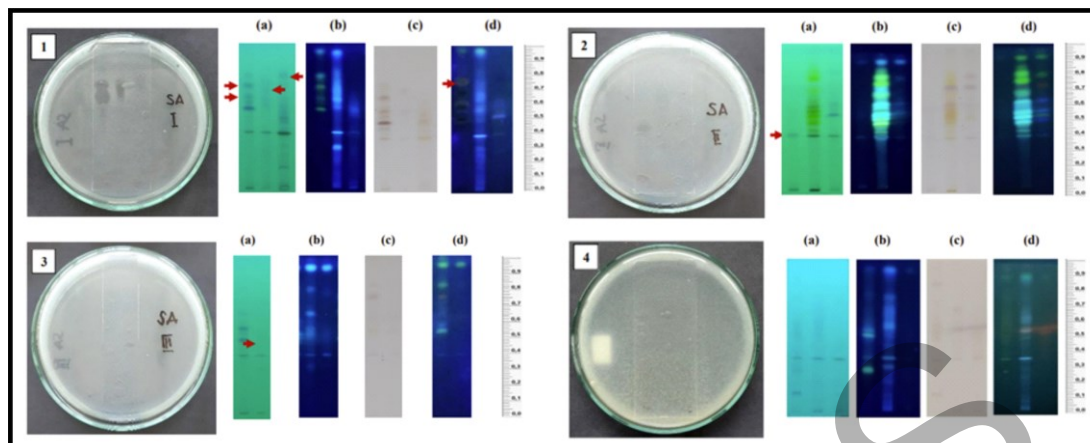
Ekstrak yang menunjukkan aktivitas antibakteri pada tahap awal kemudian dilanjutkan pada pengujian KLT Bioautografi dengan metode kontak untuk mengetahui senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik pada ekstrak-ekstrak tersebut. Dalam metode ini, ekstrak yang diuji dipisahkan menggunakan KLT dan disentuh langsung antara plat KLT dengan media yang berisi bakteri. Pada pengujian ini, konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 1,5 mg/mL sebanyak 10 μ L dan fase gerak yang digunakan adalah kombinasi toluen, kloroform, metanol dan asam formiat dengan perbandingan 40:60:20:0,6. Penentuan konsentrasi sampel dan fase gerak yang sesuai bertujuan agar senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak dapat terpisah dengan baik saat elusi sehingga pengamatan hasil pada pengujian menjadi lebih tepat. Pada pengujian ini, pembentukan zona jernih pada media Agar menandakan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji.

KLT Bioautografi adalah metode yang menggabungkan pemisahan kromatografi dan penentuan aktivitas biologis seperti aktivitas penghambatan antimikroba. Metode ini terutama digunakan untuk skrining awal bahan alam yang memiliki aktivitas biologis dan untuk fraksinasi serta isolasi komponen aktif dari ekstrak kompleks (Cheng & Wu, 2013).

Hasil pengujian KLT Bioautografi ditampilkan pada Tabel II. Terdapat lima ekstrak dari sepuluh ekstrak uji yang menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap bakteri *S. aureus* yaitu F4-2, F4-3, F4-11, F4-15 dan F4-20, sedangkan pengujian terhadap *E. coli* tidak menunjukkan adanya penghambatan. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya zona bening pada nilai Rf tertentu seperti yang ditunjukkan pada Gambar 1. Ekstrak yang tidak menunjukkan aktivitas penghambatan dapat disebabkan oleh dua faktor yaitu pengaruh konsentrasi dan adanya interaksi antar komponen ekstrak.

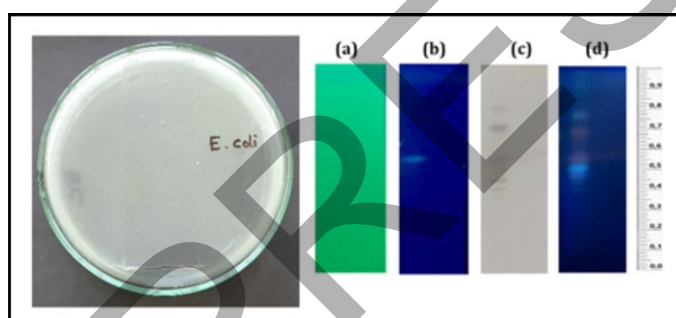
Respon bakteri terhadap suatu senyawa antimikroba bergantung pada konsentrasi. Pada konsentrasi tinggi, senyawa tersebut dapat menunjukkan aktivitas antimikroba pada sel yang rentan, sementara konsentrasi rendah dapat menginduksi beragam respons biologis pada bakteri (Bernier & Surette, 2013). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan tingkat kerentanan suatu strain bakteri tertentu secara *in vitro* terhadap antibiotik yang diterapkan (Jorgensen & Ferraro, 2009). Aktivitas antibakteri akan terdeteksi bila konsentrasi ekstrak yang diuji merupakan KHM atau lebih tinggi dari KHM dan bila konsentrasi ekstrak lebih rendah dari KHM maka aktivitas antimikroba tidak dapat dideteksi. Bila konsentrasi sampel ditingkatkan, akan terjadi peningkatan jumlah senyawa yang berdifusi pada media Agar sehingga aktivitas penghambatan terhadap bakteri uji akan meningkat dan dapat dideteksi. Dalam pengujian ini, konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 15 μ g sehingga dapat diketahui bahwa ekstrak F4-2, F4-3, F4-11, F4-15 dan F4-20 memiliki KHM terhadap *S.aureus* sebesar 15 μ g atau lebih rendah.

Ekstrak merupakan kumpulan senyawa yang kompleks, dan interaksi antar komponen ekstrak dapat terjadi, yaitu berupa interaksi sinergis, aditif atau antagonis. Sinergi terjadi ketika efek gabungan senyawa lebih besar dari jumlah efek masing-masing. Sinergi juga dapat timbul ketika satu senyawa meningkatkan efek senyawa lain atau ketika semua senyawa yang terlibat tidak aktif sendiri tetapi menjadi aktif ketika dikombinasikan (Vaou dkk., 2022). Aktivitas antibakteri suatu ekstrak sangat dipengaruhi oleh interaksi antar komponennya. Bila aktivitas antibakteri terbentuk karena terjadinya interaksi sinergis atau aditif antar dua atau lebih senyawa, maka ketika senyawa-senyawa tersebut dipisahkan dengan kromatografi, aktivitas antibakteri akan berkurang ataupun hilang, hal ini terlihat pada ekstrak F4-5, F4-9 dan F4-1 yang dapat menunjukkan penghambatan yang kuat



Gambar 1. Hasil KLT Bioautografi ekstrak etil asetat fungi terhadap *S.aureus*

Keterangan: 1. F4 2, F4 20 dan F4 11; 2. F4 15 dan F4 13; 3. F4 1 dan F4 3; 4. F4 5, F4 9 dan F4 14; (a) UV 254 nm; (b) UV 365 nm; (c) dengan perekasi semprot anisaldehyd-asam sulfat pada cahaya tampak; (d) dengan perekasi semprot anisaldehyd-asam sulfat pada UV 365 nm.



Gambar 2. Hasil KLT Bioautografi ekstrak etil asetat fungi kode F4 7 terhadap *E. coli*

Keterangan: (a) UV 254 nm; (b) UV 365 nm; (c) dengan perekasi semprot anisaldehyd-asam sulfat pada cahaya tampak; (d) dengan perekasi semprot anisaldehyd-asam sulfat pada UV 365 nm.

Tabel II. Hasil KLT Bioautografi ekstrak fungi terhadap bakteri uji

Sampel	Jumlah bercak	Nilai Rf
<i>Staphylococcus aureus</i>		
F4-1	-	-
F4-2	2	0,63 dan 0,70
F4-3	1	0,46
F4-5	-	-
F4-9	-	-
F4-11	1	0,77
F4-13	-	-
F4-14	-	-
F4-15	1	0,43
F4-20	1	0,68
<i>Escherichia coli</i>		
F4-7	-	-

(diameter penghambatan antara 11-15 mm (Surjowardojo dkk., 2015)) pada metode cakram terhadap bakteri uji tetapi tidak menunjukkan aktivitasnya pada pengujian KLT Bioautografi.

Fungi diketahui merupakan produsen berbagai produk alami terpenoid yang terkenal, termasuk mikotoksin, antibiotik dan senyawa antitumor yang sangat beragam secara struktural

(Dannert, 2015; Quin dkk., 2014). Dalam penelitian ini, enam senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada pengujian KLT Bioautografi kemudian divisualisasi dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat untuk mendeteksi senyawa terpenoid berdasarkan diferensiasi warna. Monoterpen, triterpen, dan steroid biasanya muncul sebagai bercak biru, ungu, dan abu-abu. Senyawa diterpen menghasilkan spot kecoklatan sedangkan triterpen menghasilkan warna biru violet di bawah sinar tampak, dan warna kemerahan atau biru di bawah UV pada 366 nm (Kustrin dkk., 2019). Hasil visualisasi menunjukkan bahwa senyawa dengan Rf 0,70 (F4-2) (Gambar 1, panah merah pada 1(d)) dari isolat *Kamulsia* sp merupakan senyawa diterpen dengan spot berwarna kecoklatan, sedangkan lima senyawa lainnya bukan termasuk golongan terpenoid, sehingga dibutuhkan pengujian lanjutan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa tersebut, serta evaluasi toksisitas untuk mengetahui keamanan senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik.

KESIMPULAN

Skrining aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat fungi koleksi BRIN terhadap *E. coli* dan *S. aureus* menunjukkan bahwa 10 dari 22 yang diuji (sekitar 50%) memiliki aktivitas penghambatan terhadap *S. aureus*. dan Ekstrak F4-20 menunjukkan diameter hambatan terbesar yaitu $14,773 \pm 1,387$ mm. Terdapat satu ekstrak yang mampu menghambat bakteri *E. coli* yaitu ekstrak F4-7. Pada pengujian KLT Bioautografi metode kontak, diperoleh 6 senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik yaitu Rf 0,63 dan 0,70 (F4-2), Rf 0,46 (F4-3), Rf 0,77 (F4-11), Rf 0,43 (F4-15), Rf 0,68 (F4-20). Berdasarkan visualisasi dengan pereaksi semprot anisaldehyd-asam sulfat menunjukkan bahwa senyawa dengan Rf 0,70 (F4-2) merupakan senyawa diterpen dengan spot berwarna kecoklatan, sedangkan lima senyawa lainnya bukan termasuk golongan terpenoid, sehingga dibutuhkan pengujian lanjutan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa tersebut, serta evaluasi toksisitas senyawa untuk menilai keamanan senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik. Terbuka peluang untuk menggali lebih lanjut potensi fungi genus *Kalmusia*, *Aerobasidium* dan *Massarina* sebagai penghasil senyawa bioaktif terutama aktivitas antimikroba.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan BRIN atas pendanaan yang diberikan melalui skema pendanaan *Joint Collaboration* Riset Rumah Program Organisasi Riset Hayati dan Lingkungan BRIN tahun anggaran 2023 sehingga penelitian ini bisa terlaksana.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Fakih, A. A., & Almaqtri, W. Q. A. (2019). Overview on antibacterial metabolites from terrestrial *Aspergillus* spp. *Mycology*, 10(4), 191–209. <https://doi.org/10.1080/21501203.2019.1604576>
- Antimicrobial Resistance Collaborators. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis. *Lancet (London, England)*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bérdy, J. (2005). Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Antibiotics*, 58(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ja.2005.1>
- Bernier, S. P., & Surette, M. G. (2013). Concentration-dependent activity of antibiotics in natural environments. *Frontiers in Microbiology*, 4, 20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00020>
- Breijyeh, Z., Jubeh, B., & Karaman, R. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6), 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>
- Chaiyosang, B., Kanokmedhakul, K., Sanmanoch, W., Boonlue, S., Hadsadee, S., Jungsuttiwong, S., & Kanokmedhakul, S. (2019). Bioactive oxaphenalenone dimers from the fungus *Talaromyces macrosporus* KKU-1NK8. *Fitoterapia*, 134, 429–434. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.03.015>

- Cheng, Z., & Wu, T. (2013). TLC bioautography: High throughput technique for screening of bioactive natural products. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16(7), 531–549. <https://doi.org/10.2174/1386207311316070004>
- Choma, I. M., & Grzelak, E. M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684–2691. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.069>
- Dannert, C. (2015). Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 148, 19–61. https://doi.org/10.1007/10_2014_283
- Demain, A. L., & Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, 62(1), 5–16. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.16>
- Devi, R., Kaur, T., Guleria, G., Rana, K. L., Kour, D., Yadav, N., Yadav, A. N., & Saxena, A. K. (2020). Fungal secondary metabolites and their biotechnological applications for human health. Dalam *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (hlm. 147–161). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820528-0.00010-7>
- Gao, S.-S., Li, X.-M., Zhang, Y., Li, C.-S., Cui, C.-M., & Wang, B.-G. (2011). Comazaphilones A–F, Azaphilone Derivatives from the Marine Sediment-Derived Fungus *Penicillium commune* QSD-17. *Journal of Natural Products*, 74(2), 256–261. <https://doi.org/10.1021/np100788h>
- Gaynes, R. (2017). The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerging Infectious Diseases*, 23(5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>
- Han, X., Bao, X.-F., Wang, C.-X., Xie, J., Song, X.-J., Dai, P., Chen, G.-D., Hu, D., Yao, X.-S., & Gao, H. (2021). Cladosporine A, a new indole diterpenoid alkaloid with antimicrobial activities from *Cladosporium* sp. *Natural Product Research*, 35(7), 1115–1121. <https://doi.org/10.1080/14786419.2019.1641807>
- Hong, X., Tang, L., Chen, Z., Lai, Q., Zhang, B., Jiang, Y., Wang, X., He, R., Lin, J., Shao, Z., Lin, S., & Wang, W. (2024). Benzoquinone and furopyridinone derivatives from the marine-derived fungus *Talaromyces* sp. MCCC 3A01752. *Natural Product Research*, 38(2), 320–326. <https://doi.org/10.1080/14786419.2022.2121830>
- Jorgensen, J. H., & Ferraro, M. J. (2009). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), 1749–1755. <https://doi.org/10.1086/647952>
- Kustrin, S., Kustrin, E., Gegechkori, V., & Morton, D. W. (2019). High-Performance Thin-Layer Chromatography Hyphenated with Microchemical and Biochemical Derivatizations in Bioactivity Profiling of Marine Species. *Marine Drugs*, 17(3), 148. <https://doi.org/10.3390/md17030148>
- Li, Y., Wang, Y., Wang, H., Shi, T., & Wang, B. (2024). The Genus *Cladosporium*: A Prospective Producer of Natural Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(3), 1652. <https://doi.org/10.3390/ijms25031652>
- Oh, H., Swenson, D. C., Gloer, J. B., & Shearer, C. A. (2003). New Bioactive Rosigenin Analogues and Aromatic Polyketide Metabolites from the Freshwater Aquatic Fungus *Massarina tunicata*. *Journal of Natural Products*, 66(1), 73–79. <https://doi.org/10.1021/np020342d>
- Quin, M. B., Flynn, C. M., & Schmidt-Dannert, C. (2014). Traversing the fungal terpenome. *Natural product reports*, 31(10), 1449–1473. <https://doi.org/10.1039/c4np00075g>
- Retnowati, A., Rugayah, Rahajoe, J., & Arifiani, D. (2019). *Status Keanekaragaman Hayati Indonesia, Kekayaan Jenis Tumbuhan dan Jamur Indonesia*. LIPI Press.
- Sanchez Armengol, E., Harmanci, M., & Laffleur, F. (2021). Current strategies to determine antifungal and antimicrobial activity of natural compounds. *Microbiological Research*, 252, 126867. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126867>
- Setyaningrum, A. F., Pratiwi, R., Suciati, S., Sugijanto, N. E. N., & Indrayanto, G. (2018). Identification of 4-4'-(1-methylethylidene)-bisphenol from an Endophytic Fungus *Cladosporium oxysporum* derived from *Aglaiia odorata*. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia*, 14(2), Article 2. <https://doi.org/10.20961/alchemy.14.2.12974.193-201>
- Song, T., Chen, M., Ge, Z.-W., Chai, W., Li, X.-C., Zhang, Z., & Lian, X.-Y. (2018). Bioactive Penicypyrrodiether A, an Adduct of GKK1032 Analogue and Phenol A Derivative, from a Marine-Sourced Fungus *Penicillium* sp. ZZ380. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(21), 13395–13401. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02172>

- Surjowardojo, P., Susilorini, T. E., & Sirait, G. (2015). Daya Hambat Dekok Kulit Apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas* sp. Penyebab Mastitis pada Sapi Perah. *J. Ternak Tropika*, *Vol. 16*, 40–48.
- Tan, S., & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Medical Journal*, *56*(07), 366–367. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015105>
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria—A Review. *Antibiotics*, *11*(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C. (Chrysa), Tsakris, Z., Rozos, G., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2022). Interactions between Medical Plant-Derived Bioactive Compounds: Focus on Antimicrobial Combination Effects. *Antibiotics*, *11*(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081014>
- Wahab, M. A., Asolkar, R. N., Inderbitzin, P., & Fenical, W. (2007). Secondary metabolite chemistry of the marine-derived fungus *Massarina* sp., strain CNT-016. *Phytochemistry*, *68*(8), 1212–1218. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.01.020>
- Wu, B., Ohlendorf, B., Oesker, V., Wiese, J., Malien, S., Schmaljohann, R., & Imhoff, J. F. (2015). Acetylcholinesterase inhibitors from a marine fungus *Talaromyces* sp. Strain LF458. *Marine Biotechnology (New York, N.Y.)*, *17*(1), 110–119. <https://doi.org/10.1007/s10126-014-9599-3>
- Xu, W., Gavia, D. J., & Tang, Y. (2014). Biosynthesis of fungal indole alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, *31*(10), 1474–1487. <https://doi.org/10.1039/C4NP00073K>
- Yao, G., Chen, X., Zheng, H., Liao, D., Yu, Z., Wang, Z., & Chen, J. (2021). Genomic and Chemical Investigation of Bioactive Secondary Metabolites From a Marine-Derived Fungus *Penicillium steckii* P2648. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 600991. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.600991>