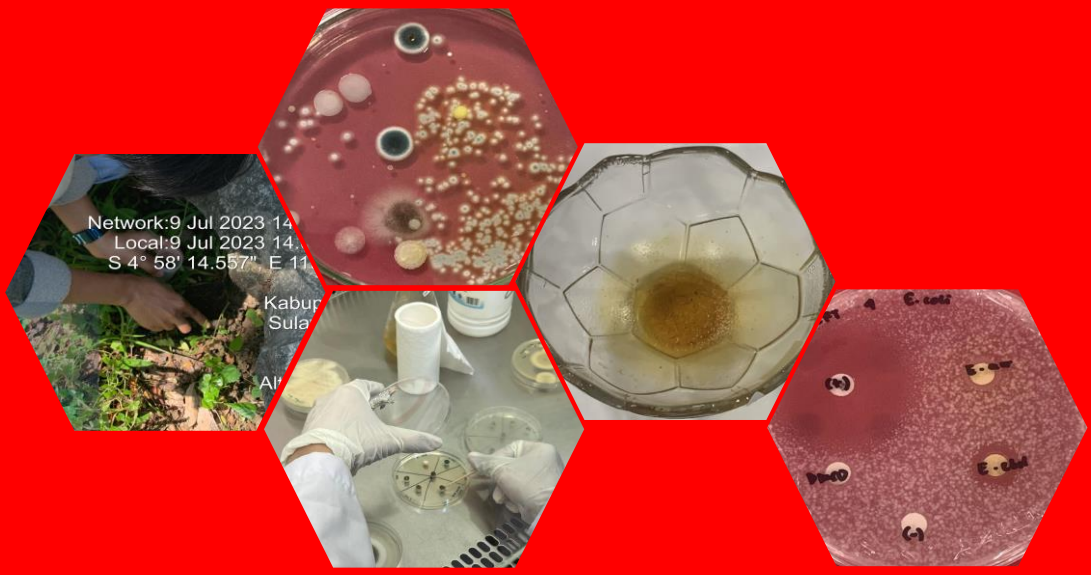
ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*



ALTCE DWI PUTRI
N011201051

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

ALTCE DWI PUTRI
N011201051

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

ALTCE DWI PUTRI
N011201051

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

iii

SKRIPSI

ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*

ALTCE DWI PUTRI
N011201051

Skripsi

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada 04 Desember 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan pada

Program Studi Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama	Pembimbing Pendamping
Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.	Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt.
NIP. 19771125 200212 2 003	NIP. 19611111 198703 2 001

Ketua Program Studi S1 Farmasi,
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin

Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si., M.Pharm.Sc, Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

Scanned with CamScanner

iv

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Herlina rante, S.Si., M.Si., Apt. dan Prof. Dr. sartini, M.Si., Apt.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 04-12-2024

Altce Dwi Putri
N011201051

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji dan syukur kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga penyelesaian tugas akhir ini dapat terlaksana dengan baik. Penulis menyadari bahwa skripsi ini dipengaruhi oleh keterbatasan penulis, sehingga tanpa dorongan dan dukungan dari berbagai pihak, penulisan skripsi ini tidak akan selesai dengan baik. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing utama dan Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. selaku pembimbing pendamping atas semua bimbingan serta ilmu yang diberikan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Ucapan terima kasih juga diberikan kepada Ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt. dan Ibu Dra. Rosany Tayeb, M.Si., Apt. selaku penguji yang telah memberikan masukan, saran, serta bantuan dalam penyempurnaan penyelesaian skripsi ini. Ucapan terima kasih juga penulis berikan kepada Ibu Rina Agustina, S.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt. selaku pembimbing akademik penulis yang telah membimbing selama masa studi penulis. Penghargaan juga penulis berikan kepada Dekan, seluruh dosen, dan staff Fakultas farmasi Universitas Hasanuddin atas kontribusinya dalam meningkatkan kualitas dan fasilitas, serta urusan persuratan dan administrasi selama masa studi hingga penyelesaian tugas akhir penulis. Tidak lupa ucapan terimakasih juga penulis berikan kepada Ibu Haslia, S.Si., selaku laboran Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah membantu dalam proses penelitian.

Demikian pula penulis menyampaikan terimakasih kepada teman seperjuangan penulis, Gita, Sugesti, Mutiara, Verelio, serta teman-teman HE20IN, Micro crew'20 yang selalu saling mendukung dan membantu dalam perkuliahan bahkan dalam penelitian dan penyelesaian skripsi ini. Tidak lupa ucapan terima kasih khususnya kepada Rico, Intan dan teman-teman "Luvley" yang senantiasa membantu dan memberikan dukungan kepada penulis.

Akhirnya, penghargaan yang besar penulis juga berikan kepada kedua orang tua tercinta, Daniel Dayus Mangalik, S.Th., dan Ibu Alfrida Marante, serta saudara penulis Elsye Ersita, S.Th., dan Lustyanti Marante, S.Th. yang telah memberikan doa, motivasi, serta pengorbanan dan dukungan moral maupun materi kepada penulis dalam menyelesaikan pendidikan.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, diharapkan saran dan kritik dari para pembaca. Namun, kiranya skripsi ini dapat memberikan informasi, pengetahuan baru, dan manfaat bagi pembaca.

Penulis,

Altce Dwi Putri

ABSTRAK

ALTCE DWI PUTRI. **ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*** (dibimbing oleh Herlina Rante dan Sartini).

Latar belakang. Pencarian senyawa bioaktif dari mikroba rizosfer saat ini telah banyak dilakukan, termasuk senyawa bioaktif sebagai antibakteri. Rizosfer merupakan daerah di sekitar perakaran tumbuhan yang menjadi daerah ideal bagi perkembangbiakan mikroba tanah. Keberagaman mikroba dari rizosfer ditentukan oleh jenis tanah dan tumbuhan yang berada di sekitarnya. Ekosistem karst menyimpan potensi keberagaman hayati yang sangat tinggi, karena karst memiliki konsentrasi kalisum yang sangat tinggi karena terbentuk dari endapan sisa mahkluk hidup. **Tujuan**. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat fungi rizosfer dari tumbuhan Suruhan di kasawan Karst Bantimurung. **Metode**. Isolasi fungi rizosfer dilakukan menggunakan metode sebar pada media *Potato Dextrose Agar* yang ditambahkan 0,005% kloramfenikol, kemudian dilakukan skrining antibakteri menggunakan metode agar blok. Isolat yang aktif terhadap bakteri uji difermentasi menggunakan metode fermentasi bawah permukaan (*submerged fermentation*) dengan kecepatan 120 rpm selama 14 hari. Hasil fermentasi kemudian diekstraksi menggunakan metode ekstraksi cair-cair dan diuji aktivitas antibakterinya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* menggunakan metode difusi. **Hasil**. Diperoleh 7 isolat yang berhasil diisolasi dan terdapat satu isolat dengan kode KRT 4 yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi etil asetat mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji dengan konsentrasi ekstrak 4 mg/disk sebesar 7,14 $\pm$ 0,27 mm terhadap bakteri uji *E. coli* dan 9,67$\pm$ 2,81 mm terhadap bakteri uji *S. aureus.* **Kesimpulan**. Isolat fungi tanah rizosfer ekosistem karst dari tumbuhan Suruhan menghasilkan senyawa bioaktif dengan aktivitas antibakteri.

Kata kunci: *Peperomia pellucida* L; tanah rizosfer; karst; fungi; antibakteri.

ABSTRACT

ALTCE DWI PUTRI. **ISOLASI DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FUNGI RIZOSFER TUMBUHAN SURUHAN (*Peperomia pellucida* L.) DARI EKOSISTEM KARST TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*** (dibimbing oleh Herlina Rante dan Sartini).

Background. Currently, the search for bioactive compounds from rhizosphere microbes has been widely carried out, including bioactive compounds as antibacterials. The rhizosphere is the area around plant roots which is an ideal area for the reproduction of soil microbes. The diversity of microbes in the rhizosphere is determined by the type of soil and plants around it. Karst ecosystems have the potential for very high biodiversity, because karst has a very high concentration of potassium because it is formed from deposits of the remains of living things. **Aim**. This research aims to determine the antibacterial activity of rhizosphere fungi isolats from Suruhan plants in Bantimurung Karst area. **Method.** Isolation of rhizosphere fungi was carried out using the spread method on Potato Dextrose Agar media to which 0.005% chloramphenicol was added, then antibacterial screening was carried out using the agar block method. Isolates that were active against the test bacteria were fermented using the submerged fermentation method at a speed of 120 rpm for 14 days. The fermentation results were then extracted using the liquid-liquid extraction method and tested for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria using the diffusion method. **Results**. Seven isolates were successfully isolated and there was one isolate with the KRT code 4 which showed antibacterial activity against the test bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The results of the antibacterial activity test of the ethyl acetate fraction were able to inhibit the growth of the test bacteria with an extract concentration of 4 mg/disk of 7.14 ± 0.27 mm against the test bacteria *E. coli* and 9.67 ± 2.81 mm against the test bacteria *S. aureus*. **Conclusion**. Isolats of rhizosphere soil fungi from Suruhan plants produce bioactive compounds with antibacterial activity.

Keywords: Peperomia pellucida L; rhizosphere soil; karst; fungi; antibacterial.

DAFTAR ISI

Halaman
HALAMAN JUDUL....i
PERNYATAAN PENGAJUAN....ii
HALAMAN PENGESAHAN.... **Error! Bookmark not defined.**
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.... **Error! Bookmark not defined.**
UCAPAN TERIMA KASIH....v
ABSTRAK....vi
DAFTAR ISI.... viii
DAFTAR TABEL.... ixx
DAFTAR GAMBAR....x
DAFTAR LAMPIRAN....xi
BAB I....1
PENDAHULUAN....1
1.1 Latar Belakang....1
1.2 Rumusan Masalah....2
1.3 Tujuan Penelitian....2
BAB II....3
METODE PENELITIAN....3
2.1 Alat dan Bahan....3
2.2 Metode Kerja....3
BAB III....6
HASIL DAN PEMBAHASAN....6
3.1 Hasil....6
3.2 Pembahasan....11
BAB IV....14
KESIMPULAN DAN SARAN....14
4.1 Kesimpulan....14
4.2 Saran....14
DAFTAR PUSTAKA....15
LAMPIRAN....18

DAFTAR TABEL

Nomor urut Halaman

1. Hasil uji antagonis ……....8
2. Karakteristik isolat fungi rizosfer ……8
3. Hasil uji aktivitas antibakteri ……..10
4. Komposisi medium *Potato Dextrose Agar* ……19
5. Komposisi medium *Potato Dextrose Broth + Yeast* ……19
6. Komposisi medium *Nutrient Agar* ……..19
7. Komposisi medium *Mueller Hinton Agar* ……..19
8. Diameter zona hambat terhadap bakteri uji *Staphylococcus aureus* ……..20
9. Diameter zona hambat terhadap bakteri uji *Escherichia coli* ……20

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut Halaman

1. Hasil pertumbuhan fungi rizosfer pada media PDAC…….…… 6
2. Hasil isolasi dan pemurnian fungi rizosfer ……. 7
3. Hasil uji antagonis isolat fungi rizosfer…….,…….…….8
4. Hasil fermentasi isolat KRT 4……..…….9
5. Hasil uji aktivitas antibakteri ……..……...10
6. Diagram diameter zona hambat ekstrak fungi rizosfer…….…10
7. Proses pengambilan sampel ……..…20
8. Proses pemurnian fungi rizosfer ……..…….. 20
9. Proses pengujian antagonis ……. 20
10. Proses fermentasi ……..…20
11. Proses sonikasi hasil fermentasi ……..…….. 20
12. Proses ekstraksi hasil fermentasi ……..……..21
13. Proses penguapan pelarut ekstrak ……..……...21
14. Ekstrak hasil ekstraksi ……..…….21
15. Replikasi hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* ……..21
16. Replikasi hasil uji aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* ……..…21

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut Halaman

1. Skema kerja penelitian ……..18
2. Komposisi medium ……..19
3. Perhitungan …… 19
   3a Konsentrasi ekstrak ……..19
   3b Diameter zona hambat ……20
4. Dokumentasi penelitian ……20

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh mikroba patogen yang masuk ke dalam tubuh yang menyebabkan gejala dan tanda inflamasi (radang) atau disfungsi (Nasronudin, 2011). Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* merupakan contoh mikroflora normal yang terdapat pada tubuh manusia dan juga paling sering menyerang tubuh manusia sehingga menyebabkan infeksi. Penggunaan antibiotik merupakan penanganan infeksi yang terus dilakukan sehingga tidak jarang terjadinya kasus resistensi antibiotik akibat penggunaan antibiotik yang kurang tepat. Diperkirakan bahwa pada tahun 2019 terdapat lebih 4,9 juta orang meninggal di 204 negara secara langsung atau tidak langsung karena infeksi bakteri yang resisten terhadap antibiotik (*World Health Organization*, 2022). Oleh karena itu, diperlukan beberapa alternatif pengobatan terkait infeksi bakteri, seperti penemuan obat baru sintetik maupun obat yang berasal dari bahan alam.

Tumbuhan mengandung senyawa bioaktif, dimana sebagian besar metabolit sekunder yang dihasilkan bertanggung jawab atas aktivitas antimikroba. Kelompok utama fitokimia yang bersifat antimikroba yaitu polifenol (flavonoid, kuinon, tannin, kumarin), terpenoid, alkaloid, lektin, dan peptida (Ginovyan, *et al*., 2019). Tumbuhan suruhan (*Peperomia pellucida* L.) merupakan salah satu tumbuhan dengan kandungan senyawa bioaktif yang dapat dijadikan sebagai antibakteri. Menurut studi literatur yang dilakukan oleh Rahmawatiani *et al* (2020), ekstrak suruhan mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, saponin, fenol, tannin, dan alkaloid yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif.

Selain senyawa bioaktif yang diperoleh dari jaringan tumbuhan, senyawa bioaktif yang banyak digunakan saat ini adalah senyawa bioaktif yang berasal dari mikroba simbion. Beberapa fungi hidup dan bersimbiosis dengan organisme lain melalui organisme yang disebut simbion. Salah satu contohnya adalah fungi rizosfer, yaitu fungi yang hidup pada perakaran tanaman (Widyanti, *et al.,* 2022). Kebanyakan mikroba penghasil antibiotik seperti Actinomycetes, Micromospora, dan Penicillium berasal dari mikroba tanah yang sebagian besar merupakan bakteri dan jamur (Sethi *et al*., 2013; Nurulita, *et al*., 2020). Tanah, khususnya rizosfer menjadi media pertumbuhan dan perkembangan yang sangat baik bagi mikroorganisme. Pencarian senyawa bioaktif dari mikroba rizosfer saat ini telah banyak dilakukan, termasuk senyawa bioaktif sebagai antibakteri, Rizosfer merupakan daerah di sekitar perakaran tumbuhan yang mengelilingi akar tumbuhan dan menjadi daerah ideal bagi perkembangbiakan mikroba tanah (Tambingsilia, 2016). Fungi rizosfer yang terdapat pada daerah rizosfer merupakan salah satu faktor biotik yang mampu

menginduksi ketahanan tumbuhan terhadap penyakit dan meningkatkan kesuburan pertumbuhan tumbuhan sehingga digolongkan sebagai biofertilizer (Fety, *et al*., 2015). Sudah terdapat banyak penelitian yang membuktikan bahwa fungi rizosfer menghasilkan bahan organik yang dapat mendorong pertumbuhan tumbuhan dan memiliki kemampuan antagonis dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Meiniwati *et al.,* (2014) menunjukkan hasil isolasi jamur *Aspergillus flavus, A. fumigatus, A. niger, Curvularia* sp., dan *Trichoderma harzianum* dari rizosfer tanaman padi (*Oryza Sativa* L.) yang memiliki kemampuan antagonis dalam menghambat pertumbuhan jamur patogen *Pyricularia grisea.* Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Farooq *et al.,* (2023) juga menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari *Rhizopus* yang diisolasi dari rizosfer *Mentha piperita* terhadap *Klebsiella* dan *S. epidermidis.*

Pada penelitian ini, tumbuhan suruhan diambil dari ekosistem karst Bantimurung. Ekosistem karst menyimpan potensi keberagaman hayati yang sangat tinggi baik di permukaan maupun di dalam gua. Karst memiliki konsentrasi kalsium (Ca) yang sangat tinggi karena terbentuk dari endapan sisa mahkluk hidup (Sudarmadji, *et al*., 2013).

Berdasarkan uraian yang telah disebutkan, perlu dilakukan penelitian terhadap fungi tanah rizosfer dari tumbuhan suruhan asal ekosistem karst daerah Bantimurung, Kabupaten Maros, Sulawesi Selatan untuk memperoleh isolat fungi rizosfer yang dapat menghasilkan senyawa antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah isolat fungi rizosfer dari tumbuhan Suruhan di ekosistem Karst Bantimurung memiliki aktvitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari isolat fungi rizosfer dari tumbuhan Suruhan di ekosistem Karst Bantimurung terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu autoklaf (*All American Model* 25*X*-2®), *Biosafety Cabinet* (*Thermo Scientific*®), *centrifuge* (*Tomy* MX-305®), inkubator (*Memmert*®), *Laminar Air Flow* (*Labolytic*®), *shaker* (IKA®), oven (*Ecocell*®), *rotary evaporator* (*Banchll*®), sonikator (*Delta68H*®), timbangan analitik (*Ohaus*®), pipet mikro (*Dragonlab*®), jangka sorong (*Tricle Brand*®), dan alat gelas laboratorium lainnya.

2.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu sampel tanah rizosfer tumbuhan Suruhan (*Peperomia pellucida* L.), bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, media *Nutrient Agar* (*Merck*®), media *Potato Dextrose Agar* (*Merck*®), media *Potato Dextrose Broth* (*Difco*®), esktrak *yeast* (*Pronadisa*®), aquadest, metanol, kloramfenikol, amoxicillin *disk* (*Oxoid*®), kloramfenikol *disk* (*Oxoid*®), *paper disk blank* (*Oxoid*®) etil asetat, dan lain-lain.

2.2 Metode Kerja

2.2.1 Penyiapan alat

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih terlebih dahulu menggunakan sabun kemudian dibilas menggunakan air mengalir lalu dikeringkan, setelah itu alat dibungkus kemudian disterilkan. Alat-alat gelas yang memiliki skala disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit, sedangkan alat-alat gelas yang tidak berskala dan alat lain yang tahan terhadap pemanasan disterilkan menggunakan oven pada suhu 170℃ selama 2 jam.

2.2.2 Penyiapan medium

Medium *Potato Dextrose Agar* Chloramphenicol (PDAC) dibuat dengan menimbang 5,85 g serbuk PDA dan 0,0075 g kloramfenikol, kemudian dilarutkan dengan 150 ml ke dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan hingga larut. Setelah larut, media dicukupkan hingga mencapai batas volume yang diinginkan kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit

Medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dibuat dengan menimbang 9,75 g serbuk PDA, kemudian dilarutkan menggunakan 250 ml akuades ke dalam labu erlenmeyer kemudian dipanaskan hingga larut. Setelah larut, media dicukupkan hingga mencapai batas volume yang diinginkan kemudian disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121℃ selama 15 menit.

Medium *Potato Dextrose Broth* + *Yeast* (PDBY) sebagai starter dibuat dengan menimbang 1,92 g serbuk PDB, kemudian ditambahkan 1% ekstrak *yeast* dan dilarutkan menggunakan 80 ml akuades di dalam erlenmeyer hingga homogen, setelah itu dicukupkan volumenya hingga mencapai volume yang diinginkan.

2.2.3 Preparasi sampel

Pengambilan sampel tanah dilakukan pada Ekosistem Karst Bantimurung di sekitar perakaran tumbuhan suruhan dilakukan pada 3 titik tempat tumbuh tumbuhan. Sampel tanah diambil pada kedalaman 0-5 cm dari akar tumbuhan sebanyak 100 g kemudian sampel tanah yang diambil dari beberapa titik dicampurkan dan dimasukkan ke dalam pot sampel steril lalu dibawa ke laboratorium untuk dilakukan pengujian.

2.2.4 Isolasi fungi rizosfer

Isolasi fungi rizosfer tumbuhan suruhan dilakukan menggunakan metode pengenceran dengan cara menimbang komposit tanah rizosfer sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam vial yang telah berisi 9 ml akuades steril lalu dihomogenkan. Sampel tanah kemudian diencerkan dengan tingkat pengenceran 10^{-1}, 10^{-2}, 10-^{3}, kemudian hasil pengenceran dicuplik menggunakan spoit sebanyak 0,1 ml, kemudian disebar di atas media PDAC dan diinkubasi selama 5 hari hari pada suhu ruang (Tambingsia, 2020). Setelah itu, dilakukan pemurnian pada fungi yang sebelumnya telah tumbuh pada media dengan cara memindahkan satu koloni fungi ke medium PDA steril yang baru dan diinkubasi kembali selama 3 hari. Permurnian dilakukan berulang kali hingga diperoleh koloni tunggal.

2.2.5 Penyiapan suspensi bakteri uji

Penyiapan suspensi biakan bakteri uji dilakukan dengan meremajakan biakan murni bakteri uji dalam medium NA yang selanjutnya diinkubasi pada suhu 37℃ selama 1x24 jam, kemudian hasil peremajaan diambil 1 ose untuk diencerkan menggunakan larutan NaCl steril 0,9% hingga memiliki kekeruhan yang sesuai dengan standar Mc. Farland 0,5 (10^{8} CFU/m). Setelah itu, dilakukan pengenceran dengan mencuplik 0,1 ml suspensi bakteri (10^{8} CFU/ml) dan dimasukkan ke dalam larutan 9,9 ml NaCl steril 0,9% kemudian di homogenkan sehingga diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^{6} CFU/ml) (Sari, *et al.,* 2016).

2.2.6 Uji antagonis

Uji antagonis dilakukan dengan menumbuhkan isolat fungi rizosfer yang telah dimurnikan dan diinkubasi selama 7 hari pada cawan petri yang berisi medium NA yang sebelumnya telah digoreskan bakteri uji kemudian diinkubasi pada suhu 37℃ selama 1 hari. Isolat dengan zona hambat paling besar kemudian dilanjutkan untuk proses fermentasi.

2.2.7 Fermentasi isolat fungi rizosfer dan ekstraksi metabolit sekunder

Fermentasi dilakukan menggunakan metode cair terhadap isolat fungi yang telah aktif terhadap mikroba uji dengan cara memindahkan isolat yang ditumbukan pada medium PDA ke dalam medium PDY 20 ml untuk diinkubasi pada suhu 25℃ selama 3 hari sebagai *starter*. Setelah itu disiapkan 180 ml medium PDY dalam labu erlenmeyer, lalu ditambahkan 20 ml medium PDY yang berisi isolat yang sebelumnya telah diinkubasi, lalu dihomogenkan menggunakan shaker pada kecepatan 150 (putaran/menit) dengan suhu 25℃ selama 11 hari. Setelah selama 11 hari, dilanjutkan dengan sonikator selama 4 x 15 menit kemudian disentrifugasi

hingga supernatan dan biomassa terpisah. Supernatan yang diperoleh kemudian dipartisi 1 kali menggunakan etil asetat dengan perbandingan 1:1 dalam corong pisah selama 15 menit, kemudian ekstrak yang diperoleh diuapkan untuk menghilangkan sisa pelarutnya (Rante, et al., 2017)

2.2.8 Uji aktivitas antibakteri fungi rizosfer

Ekstrak hasil fermentasi yang diperoleh kemudian diuji aktivitasnya terhadap mikroba uji dengan metode difusi agar menggunakan paper disk. Masing-masing sebanyak 1 swab bakteri uji S. aureus dan E.Coli diinokulasikan ke media MHA yang telah memadat. Hasil ekstraksi dicuplik sebanyak 20 µL kemudian diteteskan di atas kertas cakram (diameter 6 mm). Prosedur yang sama dilakukan untuk paper disk amoxicillin dan kloramfenikol sebagai kontrol positif, serta etil asetat dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif lalu diangin-anginkan untuk menghilangkan pelarut. Kertas cakram ditempelkan pada media lalu diinkubasi selama 1x24 kemudian diamati zona hambatnya (Rahman, et al. 2022).