

Metabolit Sekunder Sekresi Jamur *Penicillium* spp. Isolat Tanah Gambut Riau sebagai Antijamur *Candida albicans*

Yuana Nurulita*, Yuharmen, Nuryani Nenci, Ayu Octa Mellani, Titania Tjandarawati Nugroho

Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau, Pekanbaru 28293

*Penulis korespondensi: ynurulita@lecturer.unri.ac.id

DOI: <https://doi.org/10.24198/cna.v8.n3.32452>

Abstrak: Mikroba dan tanaman merupakan sumber metabolit sekunder yang aktif dieksplorasi potensinya. Laboratorium Enzim, Fermentasi dan Biomolekuler Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau telah mengisolasi beberapa jenis mikroba khususnya jamur dari tanah gambut Hutan Primer Cagar Biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB) Provinsi Riau. Beberapa isolat tersebut adalah jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 yang memiliki potensi menghasilkan enzim selulase. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengeksplorasi potensi lain dari kedua jamur isolat lokat tanah gambut Riau tersebut dalam hal ini potensi sebagai sumber antimikroba, antijamur *Candida albicans*. Produksi metabolit sekunder antijamur dilakukan dengan cara fermentasi *batch* dalam media cair yang diinokulasi dengan spora jamur (7×10^{12} spora untuk 50 mL media) selama 14 hari dengan bantuan *rotary shaker* kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring GF/C. Filtrat kemudian diekstraksi menggunakan etil asetat. Ekstrak etil asetat kemudian diuapkan dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator*. Ekstrak kasar etil asetat kemudian dilarutkan dengan metanol untuk diuji lebih lanjut. Pada penelitian ini dilakukan karakterisasi ekstrak dengan uji fitokimia, KLT, dan HPLC, serta uji antijamur *C. albicans* dengan metode difusi cakram. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa masing-masing ekstrak *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 mengandung senyawa terpenoid. Karakterisasi lebih lanjut ekstrak kasar etil asetat diuji KLT dan HPLC menunjukkan pola noda dan puncak yang berbeda. Untuk uji antijamur, hanya ekstrak *Penicillium* sp. LBKURCC29 yang memiliki aktivitas antijamur terhadap jamur *C. albicans* pada konsentrasi 5,7 mg/mL dengan diameter zona hambat sebesar 8,05 mm yang merupakan penghambatan 33,78% dibandingkan dengan kontrol positif Ketokonazol[®] (23,83 mm).

Kata kunci: antijamur, *Penicillium* spp., metabolit sekunder, uji fitokimia

Abstract: Microbes and plants are sources of secondary metabolites that potential and actively explored. The Laboratory of Enzyme, Fermentation and Biomolecular of the Department of Chemistry, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Riau University has isolated several types of microbes, especially fungi from peat soil, Primary Forest Biosphere Reserve Giam Siak Kecil Bukit Batu (GSKBB) Riau Province. Some of these isolates were the fungi *Penicillium* sp. LBKURCC29 and LBKURCC30 which have the potential to produce cellulase. The purpose of this study was to explore the another potential of the two Riau peat soil locat isolates, in this case the potential as a source of antimicrobial and anti-fungal *Candida albicans*. The production of secondary metabolites that are potential as antifungi was done by fermentation in a liquid medium inoculated with spores of *Penicillium* sp. LBKURCC29 or LBKURCC30 (7×10^{12} spores in 50 mL of media) for 14 days in rotary shaker then filtered with filter paper GF/C. The filtrate was extracted using ethyl acetate. The ethyl acetate crude extracts was evaporated using rotary evaporator. The crude extract dissolved with metanol. In this study, extract characterization was applied by phytochemical test, TLC and HPLC. Antimicrobial test was performed by the disc diffusion method toward pathogen fungi *C. albicans*. The result of phytochemicals test showed that each extract of *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 were positive for terpenoid. Further characterization revealed that the patterns of TLC and HPLC chromatograms were different. The activity to *C. albicans* showed only extract of *Penicillium* sp. LBKURCC29 has activity on concentration 5,7 mg/mL that showed clear zone of inhibition, approximately 8,05 mm equal to 33,78% inhibitions compared to Ketokonazol[®] inhibition (23,83 mm).

Keywords: antifungi, *Penicillium* spp., Secondary metabolite, phytochemical test

PENDAHULUAN

Infeksi yang disebabkan bakteri patogen masih menjadi masalah kesehatan masyarakat di dunia. Ketahanan manusia terhadap bakteri patogen merupakan tantangan besar di bidang farmasi maupun biomedis. Pengobatan infeksi menggunakan antibiotik terkadang menyebabkan dilema. Selain dapat mengobati, penggunaan antibiotik saat ini justru menimbulkan masalah baru, yaitu resistensi antibiotik dikarenakan pemakaian antibiotik yang tidak sesuai prosedur dan tidak terkontrol (Erviani 2013). Permasalahan ini mendorong terus dilakukannya eksplorasi bahan alam sebagai sumber senyawa khususnya metabolit sekunder yang strukturnya bervariasi dan memiliki aktivitas tertentu, oleh karena itu dibutuhkan eksplorasi terus menerus untuk menemukan senyawa baru yang berpotensi sebagai antibiotik.

Salah satu mikroorganisme yang diduga dapat digunakan sebagai penghasil antimikroba baru ialah *Penicillium* sp. Jamur ini dapat menghasilkan senyawa penisilin untuk membunuh atau menghentikan pertumbuhan mikroba patogen. *Penicillium* merupakan fungi filamen dengan anggota spesies yang memiliki potensi bioteknologi yang tinggi, karena kemampuan berbagai spesiesnya dalam menghasilkan enzim-enzim industri, maupun berbagai senyawa bioaktif (Barreiro *et al.* 2012). *Penicillium* penghasil enzim karbohidrase tinggi dari tanah gambut berpotensi untuk dikembangkan karena gambut yang kaya selulosa dan sisa-sisa serangga (Hoyos-Carvajal *et al.* 2009).

Tanah gambut merupakan tanah yang terbentuk dari hasil dekomposisi bahan-bahan organik dalam keadaan anaerob dan mengandung bermacam-macam mikroorganisme dengan berbagai spesies. Salah satunya adalah fungi yang sangat berperan aktif dalam memecah bahan-bahan organik (Darjamuni 2003). Gu & Karthikeyan (2008) mengatakan bahwa keberadaan asam humat pada tanah gambut menyebabkan tanah gambut berpotensi untuk penemuan mikroba penghasil metabolit sekunder yang berstruktur kompleks sebagai antimikroba. Metabolit sekunder terdiri dari beberapa senyawa seperti alkaloid, flavonoid, steroid, terpenoid dan saponin yang diyakini bersifat antimikroba (Pratiwi 2008). Senyawa antimikroba dari proses metabolisme mikroorganisme yang berasal dari kondisi yang ekstrim cenderung tahan dengan kondisi ekstrim juga (Yule & Gomez 2009), sehingga mikroorganisme dari tanah gambut yang memiliki pH dan kandungan oksigen terlarut yang rendah dengan kisaran suhu 24-32°C berpotensi sebagai sumber sekresi metabolit potensial. Di antara hutan gambut yang belum banyak dieksplorasi adalah hutan gambut zona inti cagar biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu (GSKBB) di Riau.

Dalam rangka penemuan galur lokal *Penicillium* penghasil metabolit sekunder potensial, telah diisolasi beberapa isolat fungi dari tanah gambut

hutan primer di zona inti cagar biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu, Riau. Laboratorium Biokimia-Enzim, Fermentasi dan Biologi Molekuler Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau memiliki beberapa koleksi isolat *Penicillium* sp. yang diisolasi dari tanah gambut Hutan Primer Cagar Biosfer GSKBB Provinsi Riau, salah satunya isolat *Penicillium* sp. LBKURCC34 yang telah diisolasi terbukti menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antijamur *Candida albicans* oleh Supriyanto (2017) dan antibakteri *Escherichia coli* oleh Fitri (2019). Salah satu isolat lainnya yang perlu dilakukan uji aktivitas antimikrobanya adalah *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 dan telah diuji berpotensi memiliki aktivitas selulase (Ismet 2012).

C. albicans merupakan mikroorganisme normal di tubuh manusia seperti rongga mulut, saluran pencernaan, dan mukosa vagina yang dapat menjadi patogen jika kondisi tubuh berubah dari biasa seperti perubahan ketidakseimbangan lingkungan dan penurunan pH (Wilson 2019). Jamur dapat berkembang biak dan tumbuh tak terkendali sehingga menyebabkan infeksi hingga ke darah dan jaringan yang disebut kandidiasis (Wilson 2019; Whaley *et al.* 2017). Whaley *et al.* (2017) menyatakan bahwa sebanyak 3.5% *C. albicans* ditemukan resisten terhadap fluconazole, antifungi yang umum diresepkan, dengan kisaran konsentrasi minimum inhibitor di kisaran 0.06 - \geq 128 mg/L. *C. albicans* juga dapat membentuk biofilms menempel di jaringan dan berimplikasi medis lebih parah (Wall *et al.* 2019; Lohse *et al.* 2018).

Penicillium sp. banyak digunakan untuk industri antibiotik, misalnya penisilin yang diproduksi oleh *Penicillium notatum* dan *Penicillium chrysogenum* (Erida 2010). Menurut Qomariah (2012), *Penicillium chrysogenum* yang telah diisolasi dari biji kacang merah dapat dimanfaatkan sebagai penghasil penisilin. Kemudian, Panda *et al.* (2005) menyatakan bahwa *Penicillium* sp. dapat menghasilkan senyawa antimikroba griseofulvin yang bersifat menghambat pertumbuhan fungi dengan cara mengganggu fungsi benang spindel dan mikrotubulus sitoplasma, sehingga menghambat mitosis sel fungi. Oleh karena itu, pada penelitian akan ini dilakukan produksi metabolit sekunder dengan metode *batch* untuk mengetahui potensi mikroorganisme isolat lokal Riau yang diisolasi dari tanah gambut hutan primer Cagar Biosfer GSKBB Provinsi Riau sebagai penghasil antifungi *C. albicans* yang diuji aktivitas antimikrobanya dengan beberapa mikroba patogen menggunakan metode difusi cakram, kemudian dilakukan karakteristik ekstrak dengan uji fitokimia, analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dan HPLC.

BAHAN DAN METODE

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Autoclave All America* model 1925/KY-23D,

spektrofotometer UV-Vis (Genesys 10S UV-VIS v4.002 2L9N175013, Madison, USA), *vortex mixer* Genie 2TM, *rotary shaker*, *waterbath*, *vacuum rotary evaporator* Heidolph WB 2000, *UV hand lamp*, kertas saring GF/C *Whatman* (No. Katalog 1882055), kertas cakram Durchmesser (No. Katalog 52355 Duren, Germany), jangka sorong (Vernier Caliper, 150×0,05mm, China), HPLC (Shimadzu LC solution seri UFLC, Kyoto, Japan), timbangan analitik dan alat-alat standar laboratorium lainnya sesuai prosedur kerja.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kultur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 koleksi Laboratorium Enzim, Fermentasi dan Bio Molekuler FMIPA Universitas Riau, mikroba patogen jamur *C. albicans*, Amoxsan[®] dan Ketokonazol[®] sebagai Kontrol positif uji antimikroba, *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Nutrient Agar* (NA) (Merck Cat. No. 1.05450), *Nutrient Broth* (NB) (Merck Cat. No. 1.06649), Plat Kromatografi Lapis Tipis (KLT) *Silica Gel* 60F₂₅₄ (Merck Cat. No. 1.05554.0001) (Porositas 60 Å, ukuran partikel 10-12 µm), etil asetat, heksana, metanol, asam sulfat, kloroform, dan aquades steril.

Produksi Metabolit Sekunder Kandidat Senyawa Antijamur dari *Penicillium* spp.

Produksi senyawa antimikroba dilakukan mengikuti metode Lee *et al.* (2001) dan Saputra *et al.* (2013) dengan modifikasi. Koloni *Penicillium* spp. yang telah diremajakan selama 7 hari dibilas dengan air salin (NaCl 0,8%) lalu digerus dengan jarum ose. Suspensi jamur disaring dengan *glass wool* steril dan densitas optik pada λ 660 nm (OD_{660nm}) diukur untuk menentukan konsentrasi spora. Suspensi jamur kemudian diinokulasi ke dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dengan jumlah spora yakni 7×10^{12} spora (*Optical Density* - OD 0,34) ke dalam 50 mL media PDB. Inokulum diinkubasi pada suhu ruangan selama 7 hari pada *rotary shaker* dengan kecepatan 150 rpm. Setelah 7 hari, inokulum di media PDB seluruhnya dipindahkan ke dalam 1000 mL media cair produksi antimikroba Lee *et al.* (2001) dengan cara melarutkan 20 gram glukosa, 5 gram *yeast extract*, 0,5 gram MgSO₄, 5 gram pepton dan 1 gram KH₂PO₄ dalam 0,9 L akua DM. Kemudian larutan media diukur pH sebesar 5,6, jika pH >5,6 ditambahkan HCl 0,1 N dan jika pH <5,6 maka ditambahkan NaOH 0,1 N hingga tepat pH 5,6. Larutan media diencerkan menggunakan akua DM setelah pH tepat 5,6 hingga 1 L. Larutan media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 15 lb selama 15 menit. Media produksi antimikroba yang sudah mengandung inokulum awal diinkubasi lebih lanjut dengan menggunakan *rotary shaker* 150 rpm selama 14 hari pada suhu ruang.

Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder

Setelah 14 hari fermentasi, miselium dan media dipisahkan dengan cara disaring pada kertas saring

whatman GF/C dengan corong *buchner*. Setiap 1 Liter media produksi antimikroba diekstraksi dua kali dengan etil asetat bervolume 500 mL (perbandingan media 2:1 pelarut). Ekstrak etil asetat ditambahkan dengan Na₂SO₄ anhidrat sampai jenuh, kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* pada suhu kamar. Residu yang diperoleh dari evaporasi dilarutkan kembali dengan metanol. Maka diperoleh ekstrak kasar etil asetat yang berasal dari ekstrak lapisan etil asetat. Ekstrak ini dapat disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.

Uji Terpenoid/Steroid

Ekstrak etil asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan kloroform. Kemudian dipipet bagian kloroformnya, ditambahkan reagen Lieberman-Burchard dan dibiarkan hingga pelarutnya menguap. Warna merah coklat menunjukkan positif terpenoid, warna hijau biru menunjukkan positif steroid.

Uji Alkaloid

Ekstrak etil asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan kloroform beramoniak, kemudian dipipet bagian atasnya, ditambahkan H₂SO₄ kemudian lapisan asam diambil dan diteteskan ke dalam plat tetes kemudian ditambahkan pereaksi Dragendorff dan pereaksi Mayer. Adanya alkaloid ditandai dengan terjadinya perubahan warna menjadi jingga setelah penambahan Dragendorff dan setelah penambahan pereaksi Mayer terjadi perubahan warna menjadi warna putih.

Uji Fenolik

Ekstrak etil asetat diteteskan ke dalam plat tetes dan ditambahkan larutan besi (III) klorida. Hasil positif di nyatakan dengan adanya perubahan warna larutan menjadi biru-hitam.

Uji Flavonoid

Ekstrak etil asetat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan etanol 70% kemudian dipanaskan. Campuran ini ditambahkan lempeng logam magnesium dan setetes asam klorida pekat. Apabila terjadi perubahan warna larutan menjadi merah muda, hasil dinyatakan positif. Selain cara di atas dapat juga dilakukan dengan melarutkan ekstrak etil asetat dengan larutan etanol 70% dan dipanaskan dengan penangas air kemudian ditambahkan dengan beberapa tetes NaOH 10% terjadinya warna kuning menandakan adanya flavonoid.

Uji Saponin

Ekstrak etil asetat ditambahkan akua DM kemudian dipanaskan hingga mendidih. Kemudian larutan di kocok kuat dan apabila terbentuk busa yang stabil selama ±10 menit maka ekstrak etil asetat dinyatakan mengandung saponin.

Analisis KLT

Ekstrak etil asetat dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 yang dilarutkan dengan metanol dianalisis dengan KLT pada plat KLT SiO₂ (Merck Cat. No. 1.05554.0001) menggunakan variasi eluen heksana : etil asetat dengan perbandingan yang disesuaikan. Noda dideteksi dengan penyinaran sinar UV 366 dan 254 nm serta penyemprotan 0,5% *p*-anisaldehid dalam larutan metanol : H₂SO₄ : asam asetat dengan perbandingan 90:5:5 (v/v/v) dan dipanaskan dalam oven dengan suhu 110°C selama 3 menit. Indikator memperlihatkan keberadaan peptaibol dari ekstrak tersebut apabila terjadi noda berwarna merah terang (Chutrakul *et al.* 2008). KLT ini difoto dan nilai Rf dari noda ditentukan dengan jarak migrasi noda dibagi jarak migrasi eluen. Pemaparan dengan sinar UV 366 dan 254 nm dilakukan sebelum penyemprotan untuk mendeteksi noda-noda lain yang berfloresensi.

Analisis HPLC

Ekstrak etil asetat dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 juga dianalisis menggunakan HPLC (Shimadzu LC solution seri UFLC, Kyoto, Japan) fase terbalik. Ekstrak etil asetat dalam metanol disaring dengan penyaring *Grace* 0,45 µm. Filtrat sebanyak 20 µL diinjeksikan ke dalam kolom HPLC *Shim-pack* VP-ODS (250 x 4,6 mm). Sampel dianalisis selama 20 menit menggunakan perbandingan pelarut air : asetonitril (20:80) dengan sistem elusi bergradien (Tabel 1). Detektor sinar UV digunakan pada panjang gelombang 210 nm dan 254 nm. Pemilihan panjang gelombang ini berdasarkan pengukuran pendahuluan menggunakan spektrofotometer UV. Analisis HPLC dilakukan di Jurusan Kimia FMIPA Universitas Riau.

Tabel 1. Sistem gradien elusi pada analisis kemurnian dengan HPLC

No	Waktu (menit)	Komposisi Fase Gerak (asetonitril : air)
1	0,01	70 : 30
2	1	70 : 30
3	10	90 : 10
4	12	90 : 10
5	14	70 : 30
6	20	Stop

Uji Aktivitas Senyawa Antijamur terhadap *Candida albicans*

Ekstrak etil asetat diuji aktivitas antijamur terhadap jamur patogen (*C. albicans*). Pengenceran jamur uji dengan larutan NaCl 0,8% dilakukan bila nilai OD_{600nm} setelah inkubasi 24 jam lebih besar dari 0,1. Jamur diinokulasikan sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang mengandung media PDA cair sebanyak 15 mL (45°C) dan dihomogenkan dengan *vortex*. Media ini kemudian dituangkan ke dalam

cawan petri dan dibiarkan memadat. Ekstrak metanol metabolit sekunder *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 yang telah diperoleh kemudian diuji aktivitas antijamur dengan metode difusi agar dengan beberapa 3 variasi konsentrasi: 5,7 mg/mL, 3,8 mg/mL, dan 1,9 mg/mL. Hasil uji direkam dengan fotografi digital. Uji aktivitas antijamur dari ekstrak metanol metabolit sekunder dilakukan dengan mengaplikasikan 10 µL pada kertas cakram 6 mm dan didiamkan 1-2 menit hingga pelarutnya menguap. Pada uji ini yang bertindak sebagai kontrol positif adalah 10 µL Amoxsan[®] dan Ketokonazol[®] dengan konsentrasi 3 µg/µL (b/v) dan kontrol negatif adalah 10 µL metanol. Kertas cakram yang pelarutnya telah menguap diletakkan pada cawan petri yang sudah diinokulasi bakteri dan jamur uji. Cawan kemudian diinkubasi selama 1 hari pada suhu ruang untuk uji antijamur dengan membalikkan cawan petri. Diameter zona bening diukur setelah diinkubasi selama 3-7 hari untuk jamur patogen.

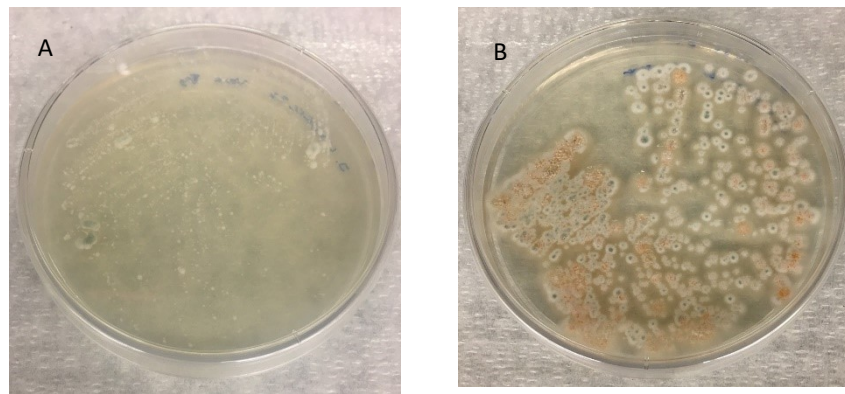
HASIL DAN PEMBAHASAN

Pertumbuhan Jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 dan Ekstraksi

Pada peremajaan jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30, jamur dibiakkan pada media PDA pada suhu 30°C. Miselia jamur mulai tumbuh pada hari ketiga yang ditandai dengan tumbuhnya spora berwarna hijau tua yang memiliki ciri khas pada ujung konidioforanya berbentuk seperti sapu lidi. Pertumbuhan *Penicillium* sp. LBKURCC29 lebih lambat dibandingkan *Penicillium* sp. LBKURCC30, terlihat pada hari ke-4, plate *Penicillium* sp. LBKURCC30 lebih banyak mengandung spora berwarna hijau dibandingkan *Penicillium* sp. LBKURCC29 (Gambar 1).

Produksi Metabolit Sekunder Jamur, Ekstraksi, dan Evaporasi

Metode produksi metabolit sekunder yang digunakan adalah metode fermentasi *batch*. Metode fermentasi merupakan metode yang digunakan untuk memproduksi metabolit sekunder dan metabolit primer pada suatu mikroorganisme dengan kondisi lingkungan yang dikendalikan, dalam hal ini pengendalian komposisi media, suhu, suplai oksigen dan jumlah mikroba. Pada penelitian ini menggunakan *Penicillium* spp. isolat lokal tanah gambut Riau dengan metode fermentasi *batch* dimana nutrisi hanya dimasukkan di awal proses fermentasi. Beberapa penelitian dilakukan untuk memproduksi antimikroba/antibiotik menggunakan mikroorganisme seperti Supartono *et al.* (2011) memproduksi antibiotika menggunakan *Bacillus subtilis* M10 dalam media urea-sorbitol, Prihanto (2012) memproduksi antibakteri miselia dan media *Penicillium notatum* ATCC28089 dan *Penicillium* sp. R1M dengan metode fermentasi, sedangkan Tanuwijaya (2015) memproduksi penicilin dari *Penicillium chrysogenum* dengan penambahan fenilalanin.



Gambar 1. Jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 (A) dan LBKURCC30 (B) pada media PDA setelah 4 hari inokulasi.



Gambar 2. Proses produksi metabolit sekunder jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29. (1) Fermentasi setelah 14 hari inkubasi di media produksi, (2) Hasil penyaringan media produksi dan miselium jamur, (3) Hasil ekstraksi media produksi dengan etil asetat dimana (3a) adalah lapisan air dan (3b) adalah lapisan etil asetat.

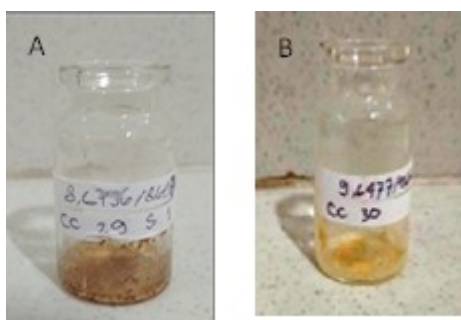
Komposisi media produksi yang digunakan pada penelitian ini mengikuti komposisi media antibiotik pada penelitian Lee *et al.* (2001) dan Hendra *et al.* (2013) dengan beberapa modifikasi. Komposisi media memiliki komposisi nutrisi yang lengkap untuk produksi antibiotik. Kompleksitas suatu media pada hakikatnya merupakan kondisi kritis dimana mikroorganisme umumnya akan menghasilkan senyawa metabolit sekunder untuk mempertahankan hidupnya (Kumala *et al.* 2007). Komposisi dari media produksi yang digunakan antara lain glukosa, ekstrak ragi, pepton, $MgSO_4$, dan KH_2PO_4 . Masing-masing komposisi media yang ditambahkan memiliki peranan yang berbeda dalam proses fermentasi senyawa antimikroba. Fungsi glukosa adalah sebagai sumber energi dan karbon utama. Ekstrak ragi berfungsi sebagai penyedia asam-asam amino tunggal, dan sebagai penyedia berbagai vitamin yang dibutuhkan sel. $MgSO_4$ berfungsi sebagai sumber Mg^{2+} yang berperan di dalam ribosom, stabilisasi membran dan dinding sel, serta berfungsi sebagai kofaktor enzim, sedangkan KH_2PO_4 menyumbangkan unsur K^+ yang juga berfungsi sebagai kofaktor enzim, dan sumber unsur P yang berguna untuk sintesis asam nukleat, ATP, fosfolipid, dan senyawa yang mengandung fosfor lainnya. Pepton berperan sebagai

sumber nitrogen, vitamin, mineral, asam amino esensial untuk pertumbuhan (Saputra 2013). Penghitungan jumlah spora yang diinokulasikan ke media *starter* jamur untuk proses fermentasi dengan metode turbidimetri (OD) bertujuan untuk memastikan persamaan perlakuan terhadap setiap inokulum.

Pada saat inkubasi proses fermentasi, media produksi yang mula-mula berwarna kuning pada hari pertama berubah menjadi berwarna kuning keruh dengan miselia jamur yang telah tumbuh hingga hari ke-14. Lapisan jamur yang menempel di bagian atas dan dinding Erlenmeyer menandakan bahwa mikroorganisme telah tumbuh dan mensekresikan metabolit sekunder (Gambar 2). Inkubasi pada suhu ruang sesuai suhu optimum pertumbuhan jamur. Media digoyang menggunakan bantuan *rotary shaker* berfungsi untuk mempermudah difusi oksigen pada media.

Media produksi kemudian dipisahkan dengan miselinya menggunakan corong *buchner* dan didapatkan filtrat berwarna kuning keruh tanpa adanya miselia. Filtrat diekstraksi dengan fase cair-cair dengan menggunakan pelarut etil asetat. Penggunaan ekstraksi langsung dengan etil asetat diketahui lebih baik dari ekstraksi yang didahului

dengan aseton karena tidak memerlukan langkah tambahan untuk menghilangkan garam-garam dari media sehingga ekstrak yang didapat lebih murni (Nugroho *et al.* 2006). Ekstrak etil asetat yang telah didapatkan diberi Na_2SO_4 anhidrat untuk mengikat air yang terdapat di dalam ekstrak, sehingga evaporasi dapat berlangsung lebih cepat. Evaporasi dilakukan pada suhu 30°C hingga 50°C untuk menjaga senyawa agar tidak rusak. Hasil evaporasi dipekatkan dan diperoleh ekstrak etil asetat hasil fermentasi yang berwarna coklat dan kuning-coklat dengan berat 96,2 dan 19,3 mg berturut-turut untuk ekstrak dari *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 (Gambar 3).



Gambar 3. Ekstrak etil asetat hasil fermentasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 (A) dan LBKURCC30 (B) setelah pengeringan dengan rotary evaporator dan dibiarkan dalam desikator beberapa waktu.

Uji Fitokimia

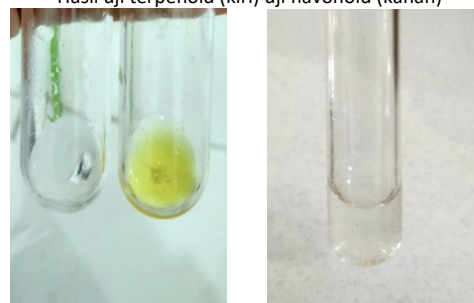
Mikroorganisme dapat menghasilkan berbagai jenis antibiotik dengan struktur dan golongan senyawa berbeda, contohnya steroid seperti viridiol (Wipf & Kerekes 2003), epiditioksopoperazin seperti gliotoksin (Avent *et al.* 1993; Lee *et al.* 2001), diketopiperazin (Chu *et al.* 1995), dipeptida termodifikasi seperti trikoderamid (Garro *et al.* 2003) dan peptaibol (Jaworski & Bruckner 2000; Berg *et al.* 2003). Oleh karena itu, penting untuk dapat mengekstraksi dan mengidentifikasi berbagai jenis metabolit dari mikroorganisme dan diuji potensinya sebagai antimikroba/antibiotik agar dapat menemukan senyawa aktif untuk mengatasi masalah resisten antibiotik.

Tabel 2 dan Gambar 4 menunjukkan ekstrak etil asetat dari isolat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 positif mengandung terpenoid yang ditandai dengan perubahan warna menjadi coklat. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Kebanyakan terpenoid di alam mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih (Harborne 1987).

Penelitian yang dilakukan oleh Sari (2016) menunjukkan bahwa *Penicillium oxalicum* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *B. subtilis* dan *E. coli* dan ekstrak dari jamur ini mengandung senyawa terpenoid dan polifenol yang



Hasil uji terpenoid (kiri) uji flavonoid (kanan)



Uji fenolik (kiri) alkaloid (kanan)

Uji saponin

Gambar 4. Hasil uji fitokimia

Tabel 2. Kesimpulan uji fitokimia ekstrak etil asetat hasil fermentasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30

No	Uji Fitokimia	Ekstrak etil asetat hasil fermentasi jamur	
		<i>Penicillium</i> sp. LBKURCC29	<i>Penicillium</i> sp. LBKURCC30
1.	Terpenoid	Positif (Coklat)	Positif (Coklat)
2.	Steroid	Negatif	Negatif
3.	Alkaloid	Negatif	Negatif
4.	Fenolik	Negatif	Negatif
5.	Flavonoid	Negatif	Negatif
6.	Saponin	Negatif	Negatif

telah diuji melalui uji fitokimia dan $^1\text{H-NMR}$. Gunawan *et al.* (2008) juga telah meneliti bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Menurut Gunawan *et al.* (2008), senyawa terpenoid mempunyai kemampuan dalam menghambat bakteri. Mekanisme penghambatan senyawa terpenoid sebagai antibakteri ialah bereaksi dengan porin pada membran luar dinding sel bakteri dan membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin mengakibatkan masuknya senyawa yang akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri akan kekurangan nutrisi dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati.

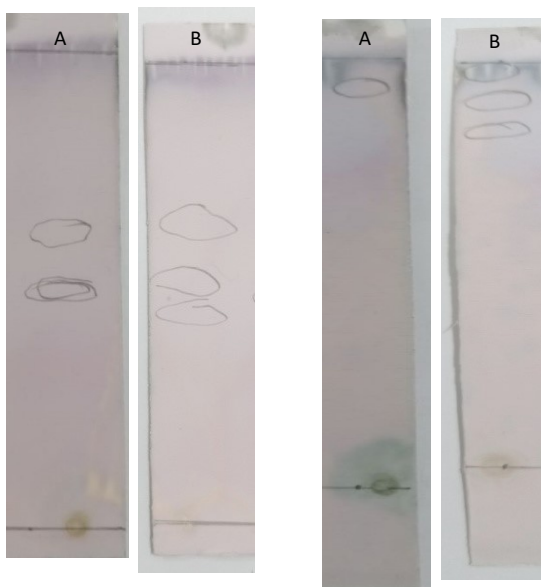
Kromatografi Lapis Tipis

Pemeriksaan awal komponen yang terdapat pada ekstrak etil asetat dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 dilakukan dengan metode KLT. Ekstrak dilarutkan dengan metanol ditotolkan di plat KLT dan dielusi dengan berbagai eluen dengan campuran dan perbandingan tertentu.

Tabel 3. Nilai Rf dari Ekstrak etilasetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30

Nama Ekstrak Etilasetat	Nilai Rf dengan eluen EtOAc : Hex		Keterangan
	6:4	9:1	
<i>Penicillium</i> sp. LBKURCC29	0,00	-	Berfluorens di bawah UV 366
	0,53	-	Berfluorens di bawah UV 366
	0,63	-	Berfluorens di bawah UV 366
	-	0,00	Berfluorens di bawah UV 366 dan hijau kekuningan dg penyemprotan 5% p-anisaldehyd
	-	0,93	Berfluorens di bawah UV 366
<i>Penicillium</i> sp. LBKURCC30	0,46	-	Berfluorens di bawah UV 366
	0,61	-	Berfluorens di bawah UV 366
	0,66	-	Berfluorens di bawah UV 366
	-	0,83	Berfluorens di bawah UV 366
	-	0,90	Berfluorens di bawah UV 366
	-	0,98	Berfluorens di bawah UV 366
	-	-	-

Hasil KLT menunjukkan fase terbaik yaitu etil asetat dan heksana dengan perbandingan 6:4 dan 9:1 (Gambar 5 dan Tabel 3). Dari 2 ekstrak tersebut, kandungan senyawa berbeda, terlihat dengan karakteristik noda dan Rf berbeda-beda. Dilihat dari perbandingan eluen yang menunjukkan pemisahan noda dengan baik adalah eluen non polar - semi polar, terlihat bahwa senyawa-senyawa dari ekstrak etil asetat kedua jamur *Penicillium* spp. adalah senyawa-senyawa non polar. Dari hasil penyemprotan dengan 0,5% p-anisaldehyd, tidak terlihat ada noda yang memberikan hasil positif peptaibol.



etil asetat : Heksana (6:4) etil asetat : Heksana (9:1)

Gambar 5. Hasil kromatogram KLT ekstrak menggunakan eluen etil asetat : heksana dengan perbandingan yang berbeda. (A) adalah ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan (B) adalah ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC30.

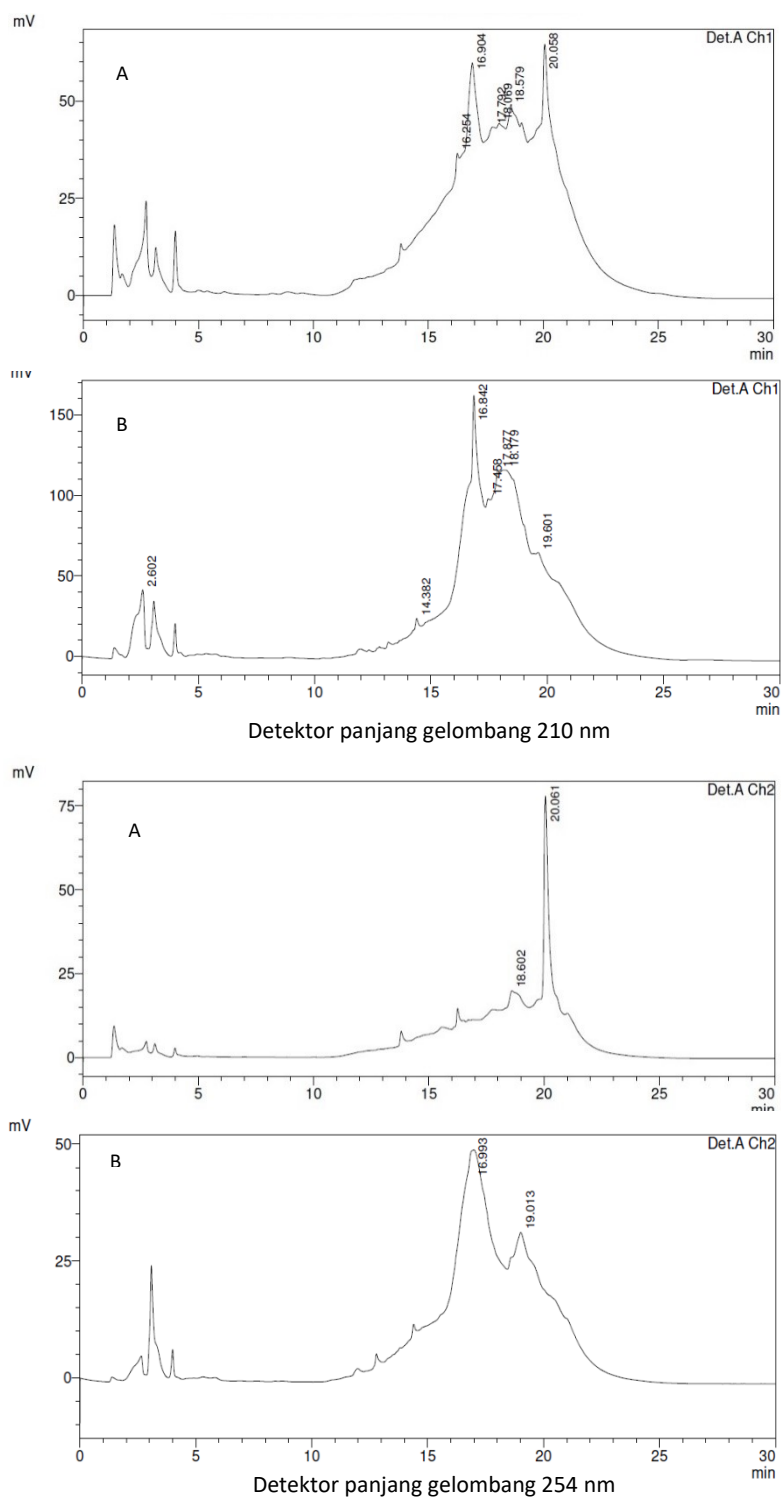
Analisis HPLC

Analisis HPLC diawali dengan melarutkan ekstrak etil asetat dengan methanol kemudian menentukan panjang gelombang maksimum untuk ekstrak yang akan dianalisis. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis, berdasarkan analisis UV-Vis, maka didapat panjang gelombang maksimum untuk ekstrak tersebut yaitu 210 nm dan 254 nm. Setelah diketahui panjang gelombang maksimum, kemudian dilakukan analisis HPLC dengan menggunakan fase terbalik dengan perbandingan pelarut air asetonitril bergradien. Hasil kromatogram ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 menunjukkan kedua ekstrak memiliki pola yang berbeda, kemungkinan mengandung komposisi dan senyawa metabolit sekunder berbeda.

Kromatogram HPLC kedua ekstrak (Gambar 6) memperlihatkan bahwa umumnya puncak muncul di menit-menit awal (menit ke 1 hingga 4) dan banyak puncak dominan di menit-menit tengah (menit ke-12 hingga 22). Dengan pola puncak dominan yang berbeda, tapi pada kisaran yang sama terlihat senyawa-senyawa ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 adalah sedikit senyawa-senyawa polar dan dominan senyawa-senyawa semi polar.

Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat fermentasi *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram. Ekstrak etil asetat dilarutkan dengan menggunakan metanol dengan 3 variasi konsentrasi 5,7 mg/mL, 3,8 mg/mL, dan 1,9 mg/mL berdasarkan perhitungan dosis penggunaan amoksisilin (Amoxsan[®]) yaitu 3,8 mg/mL lalu konsentrasi dibesarkan dua kali dan dikecilkan setengah kali. Berdasarkan hasil uji aktivitas antimikroba, didapat bahwa hanya ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 yang memiliki



Gambar 6. Kromatogram HPLC ekstrak metabolit sekunder jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 (A) dan LBKURCC30 (B)

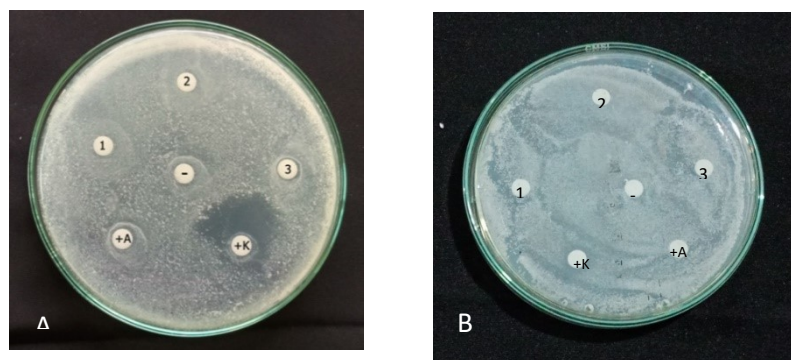
aktivitas antijamur terhadap jamur *C. albicans* (Tabel 4 dan Gambar 7).

Dari hasil pengamatan, diketahui bahwa hanya ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 hanya dapat menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans* pada konsentrasi uji tertinggi yaitu 5,7 mg/mL dengan diameter zona

bening 8,05 mm. Zona hambat untuk kontrol positif Ketokonazol[®] memiliki diameter 23,83 mm. Jika dibandingkan, maka ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 memiliki aktivitas sekitar 33,78% dibandingkan kontrol positif Ketokonazol[®]. Hasil ini lebih kecil daripada penelitian Nabilah (2016) yang memproduksi

Tabel 4. Daya hambat uji aktivitas antimikroba dari ekstrak etil asetat fermentasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30

Nama Ekstrak	Konsentrasi Cakram (mg/ml)	Diameter daya hambat (mm)			Rata-rata
		1	2	3	
Ekstrak Etilasetat <i>Penicillium</i> sp. LBKURCC29	1,9	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
	3,8	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
	5,7	8,05	8,10	8,00	8,05 ± 0,05
Kontrol positif ketokonazol	3,8	24,10	25,40	22,00	23,83 ± 1,71
Kontrol positif amoksan	3,8	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
Kontrol negatif methanol	-	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
Ekstrak Etilasetat <i>Penicillium</i> sp. LBKURCC30	1,9	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
	3,8	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
	5,7	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
Kontrol positif ketokonazol	3,8	10,86	9,80	9,80	10,15 ± 0,61
Kontrol positif amoksan	3,8	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00
Kontrol negatif methanol	-	0,00	0,00	0,00	0,00 ± 0,00



Gambar 7. Uji antijamur *C. albicans* dari ekstrak etil asetat fermentasi jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 (A) dan LBKURCC30 (B)

senyawa aktif dari *Penicillium lagena* diketahui dapat menghambat pertumbuhan fungi patogen yang diuji yaitu *Phenillus lamaoensis* yang memiliki zona hambat sebesar 197,9% jika dibandingkan dengan kontrol positif nistanin. Walaupun aktivitas masih relatif rendah dibandingkan kontrol positif Ketokonazol®, peluang mendapatkan senyawa aktif potensial tetap besar karena ekstrak masih dalam bentuk crude, terdiri dari banyak senyawa. Isolasi senyawa aktif misalnya dengan isolasi dengan *guided assay* akan mengerucut ke senyawa murni konsentrasi lebih rendah dengan aktivitas potensial.

Ekstrak etil asetat dengan konsentrasi rendah yang diuji (1,9 mg/mL dan 3,8 mg/mL) dan kontrol positif Amoxsan® dan kontrol negatif metanol tidak memiliki aktivitas, yang berbeda secara nyata dengan kontrol positif Ketokonazol®. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 1,9 mg/mL dan 3,8 mg/mL belum mampu menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans*. Menurut David & Stout (1971) aktivitas penghambatan dikategorikan kuat jika diameter daerah hambat berukuran lebih dari 20 mm. Sedangkan diameter daerah hambat berukuran 10-20 mm dikategorikan kuat, 5-10 mm dikategorikan sedang dan kurang dari 5 mm dikategorikan lemah.

Berdasarkan hasil uji fitokimia, diketahui ekstrak etil asetat mengandung senyawa terpenoid. Keberadaan senyawa terpenoid inilah berpeluang untuk berperan sebagai penghambat pertumbuhan jamur *C. albicans* yang diuji. Mekanisme kerja dari senyawa terpenoid bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran dan atau dinding sel, membran dan atau dinding sel tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Kurniawan & Aryana 2015).

KESIMPULAN

Fermentasi *batch* dari jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 dan LBKURCC30 dalam media produksi antibiotik sebanyak 2 L menghasilkan ekstrak etil asetat berturut-turut sebanyak 96,2 dan 19,3 mg. Metabolit sekunder yang dihasilkan dari fermentasi jamur ini teridentifikasi golongan senyawa terpenoid. Pola noda dan puncak pada kromatogram KLT dan HPLC menunjukkan kedua ekstrak kemungkinan mengandung senyawa berbeda. Uji aktivitas antijamur *C. albicans*, hanya ekstrak etil asetat jamur *Penicillium* sp. LBKURCC29 mampu menghambat pertumbuhan jamur *C. albicans* pada konsentrasi 5,7 mg/mL (konsentrasi tertinggi yang diuji) yang memiliki aktivitas 33,78% jika

dibandingkan dengan kontrol positif Ketokonazol®. Penelitian ini perlu dilanjutkan untuk menentukan senyawa aktif yang dimiliki sehingga dapat berkontribusi mengatasi resistansi antimikroba.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didukung dari Dana Penelitian DIPA LPPM Universitas Riau, Skema Penelitian Unggulan Universitas No. 998/UN.19.5.1.3/PP/2017 a.n. Yuana Nurulita.

DAFTAR PUSTAKA

- Ayent, A.G., Hanson, J.R. & Truneh, A. (1992). Metabolites of *Gliocladium flavofuscum*. *Phytochemistry*. **32(1)**: 197-198.
- Berg, A., Grigoriev, P.A., Degenkolb, T., Neuhof, T., Härtl, A., Schlegel, B. & Gräfe, U. (2003). Isolation, structure elucidation and biological activities of trichofumins A, B, C and D, new 11 and 13mer peptaibols from *Trichoderma* sp. HKI 0276. *Journal of Peptide Science*. **9(11-12)**: 810-816.
- Barreiro, C., Martin, J. F. & Garcia-Estrada, C. (2012). Proteomics shows new faces for the old penicillin produces *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. **20(2)**: 1-15.
- Chu, M., Truumees, I., Rothofsky, M.L., Patel, M.G., Gentile, F., Das, P.R., Puar, M.S. & Lin, S.L. (1995). Inhibition of c-fos proto-oncogene induction by Sch 52900 and Sch 52901, novel diketopiperazines produced by *Gliocladium* sp. *The Journal of Antibiotics*. **48(12)**: 1440-1445.
- Chutrakul, C., Alcocer, M., Bailey, K. & Peberdy, J.F. (2008). The production and characterization of trichotoxin peptaibols, by *Trichoderma asperellum*. *Chemistry and Biodiversity*. **5(2)**: 1694-1706.
- Darjamuni. (2003). *Siklus Nitrogen di Laut*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- David, W.W. & Stout, T.R. (1971). Disc plate methods of microbiological assay. *Jurnal Microbiology*. **1(22)**: 659-665.
- Erida, Y. (2010). Karakterisasi enzim ekstraseluler dan produk biosolubilisasi batubara hasil iridiasi gamma oleh kapang *Penicillium* sp. dan *Trichoderma* sp. Skripsi. UIN Syari Hidayatullah. Jakarta.
- Erviani, A.E. (2013). Analisis multidrug resistensi terhadap antibiotik pada *Salmonella typhi* dengan teknik multiplex PCR. *Biogenesis*. **1(1)**: 51-60.
- Fitri, A. (2019). Fraksinasi metabolit sekunder dan uji antimikroba media fermentasi batch *Penicillium* sp. LBKURCC34. Skripsi. Universitas Riau. Pekanbaru
- Garo, E., Starks, C.M., Jensen, P.R., Fenical, W., Lobkovsky, E. & Clardy, J. (2003). Trichodermanides A and B, cytotoxic modified dipeptides from the marine-derived fungus *Trichoderma virens*. *Journal of Natural Products*. **66(3)**: 423-426.
- Gu, C. & Karthikeyan, K.G. (2008). Sorption of the antibiotik tetracycline to humic-mineral complexes. *Journal of Environmental Quality*. **37(2)**: 704-711.
- Gunawan, I.W.G., Bawa, I.G.A.G. & Sutrisnayanti, N.L. (2008). Isolasi dan identifikasi senyawa terpenoid yang aktif antibakteri pada herba meniran (*Phyllanthus niruri* Linn). *Jurnal Kimia*. **2(1)**: 31-39.
- Harborne, J.B. (1987). *Metoda Fitokimia Penuntun Cara Menganalisa Tumbuhan*. Penerbit ITB. Bandung.
- Hoyos-Carvajal, L., Orduz, S. & Bissett, J. (2009). Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropic regions. *Fungal Genetics and Biology*. **4(6)**: 615 - 631.
- Ismet, R.S. (2012). Isolasi Fungi Selulolitik dari Tanah Hutan Primer Pangkalan Bukit Cagar Biosfer Giam Siak Kecil-Bukit Batu, Riau. Skripsi. Universitas Riau. Riau.
- Jaworski, A. & Bruckner, H. (2000). New sequences and new fungal producers of peptaibol antibiotics antimicrobials. *Journal of Peptide Science*. **6(4)**: 149-167.
- Kumala, S., Utji, R., Sudarmono, P. & Kardono, L.B.S. (2007). Cytotoxic secondary metabolites from fermentation broth of *Brucea javanica* endophytic fungus 1.2.11. *Research Journal of Microbiology*. **2(8)**: 625-631.
- Kurniawan, B. & Aryana, W.F. (2015). Binahong (*Cassia alata* L) as inhibitor of *Escherichia coli* growth. *Journal Majority*. **4(4)**: 100-104.
- Lee, H.J., Lee, J.H., Hwang, B.Y., Kim, H.S. & Lee, J.J. (2001). Suppressing *Erwinia carotovora* pathogenicity by projecting N-acyl homoserine lactonase onto the surface of *Pseudomonas putida* cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **21(2)**: 1330-1335.
- Lohse, M. B., Gulati, M., Johnson, A. D. & Nobile, C. J. (2018). Development and regulation of single-and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nature Reviews Microbiology*. **16(1)**: 19-31.
- Nabilah, S. (2016). Optimasi media produksi senyawa aktif *Penicillium lagenae* sebagai antifungi patogen *Phellinus lamaoensis* dengan menggunakan Response Surface Technology. Tesis. Insitut Pertanian Bogor. Bogor.
- Nugroho, T.T., Jasril., Chainulfiffah, A.M., Saryono., Tanzil, M.R. & Muzeliati (2006). Perbandingan dua metode ekstraksi antibiotik dari media fermentasi *Gliocladium* sp. TNC7. *Jurnal Natur Indonesia*. **9**:16-21.
- Panda, D., Rathinasamy, K., Santra, M.K. & Wilson, L. (2005). Kinetic suppression of microtubule dynamic instability by griseofulvin: implications for its possible use in the treatment

- of cancer. *Journal of Science and Technology*. **102(28)**: 9878-9883.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prihanto, A.A. (2012). Perbandingan aktivitas antibakteri *Penicillium notatum* ATCC 28089 dengan *Penicillium* sp. R1M yang diisolasi dari mangrove *Sonneratia caseolaris*. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. **15(1)**: 66-70.
- Qomariah, U.K.N., Hastuti, U.S. & Witjoro, A. (2012). Isolasi dan identifikasi spesies kapang kontaminan pada biji kacang merah di pasar tradisional kota Malang. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA. Yogyakarta, 2 Juni 2012.
- Saputra, H. Puspita, F. & Nugroho, T.T. (2013). Production of an antibacterial compound against the plant pathogen *Erwinia carotovora* subs. *carotovora* by the biocontrol strain *Gliocladium* sp. T.N.C73. *Journal of Agricultural Technology*. **9(5)**: 1157 – 1165.
- Sari, N.P.D.P. (2016). Aktivitas antimikroba jamur endofit *Penicillium oxalicum* dari spons genus *Homaxinella*. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Supartono W.N., Herlina, L. & Ratnaningsih, E. (2011). Produksi antibiotika oleh *Bacillus subtilis* M10 dalam media urea-sorbitol. *Reaktor*. **13(3)**: 185-193.
- Supriyanto. (2017). Produksi antimikroba dari *Penicillium* sp. LBKURCC34 isolat tanah gambut hutan primer cagar biosfer Giam Siak Kecil Bukit Batu Riau. Skripsi. Univeristas Riau. Pekanbaru.
- Tanuwijaya, V.A., Siharta, B.B.R. & Pranata, S. (2015). Produksi penicilin oleh *Penicillium chrysogenum* dengan penambahan fenilalanin. *Jurnal Fakultas Teknobiologi Universitas Atmajaya*. **1(1)**: 1-21.
- Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B.V., Lopez-Ribot, J.L. & Uppuluri, P. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. **52**: 1-6.
- Whaley, S.G., Berkow, E.L., Rybak, J.M., Nishimoto, A.T., Barker, K.S. & Rogers, P.D. (2017). Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-albicans *Candida* species. *Frontiers in Microbiology*. **7**: 2173
- Wilson, D. (2019). *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. **27(2)**: 188-189
- Wipf, P. & Kerekes, A.D. (2003). Structure reassignment of the fungal metabolite TAEMC161 as the phytotoxin viridiol. *Journal of Natural Products*. **66(5)**: 716-718.
- Yule, C.M. & Gomez, L.N. (2009). Leaf litter decomposition in a tropical peat swamp forest in Peninsular Malaysia. *Wetlands and Ecology Management*. **17(3)**: 231-241.
-