



SYMBIOTIC: Journal of Biological Education and Science

Journal homepage: <http://symbiotic.iainkerinci.ac.id>

Published by: Institut Agama Islam Negeri Kerinci, Indonesia.

E-ISSN: 2721-8988 P-ISSN: 2721-8600



Profil GC-MS dan Aktivitas Antagonis Kandidat *Bacillus* sp. Rizosfer De Djawatan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Putu Tika Indira Mustika^{1*}, Retno Kawuri¹, Sang Ketut Sudirga¹, Anak Agung Sagung Alit Sukmaningsih K¹

¹Program Studi Biologi, Universitas Udayana, Bali, Indonesia.

*e-mail korespondensi: tikaindira123@gmail.com

ABSTRACT

Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* remain a major clinical concern and require exploration of alternative antibacterial sources. This study evaluated the antibacterial potential of candidate *Bacillus* sp. isolated from the rhizosphere of De Djawatan Forest, Banyuwangi, Indonesia. Soil samples were collected from five locations, and 13 candidate *Bacillus* sp. isolates were obtained. Antagonistic activity against *P. aeruginosa* was assessed using the dual culture method, while the filtrate of the most active isolate was evaluated using a disk diffusion assay at different concentrations. GC-MS analysis was performed to characterize the chemical profile of the active filtrate. Candidate *Bacillus* sp. 8 showed the highest inhibition zone among the isolates, with a mean diameter of 19.75 mm. Its ethyl acetate filtrate retained inhibitory activity at concentrations as low as 5% (v/v). GC-MS profiling detected 13 compounds, with the highest relative abundance observed for hexadecanoic acid, methyl ester (65.8%) and octadecanoic acid, methyl ester (7.7%). These findings indicate that candidate *Bacillus* sp. from the De Djawatan rhizosphere has in vitro antibacterial activity against *P. aeruginosa*, although further molecular identification, compound isolation, and bioactivity validation are required.

Keyword: Antimicrobial, Candidate *Bacillus* sp., Dual Culture, GC-MS, *Pseudomonas aeruginosa*

ABSTRAK

Infeksi nosokomial akibat *Pseudomonas aeruginosa* resisten multidrug masih menjadi tantangan klinis dan mendorong pencarian sumber antibakteri alternatif. Penelitian ini bertujuan mengevaluasi potensi antibakteri kandidat *Bacillus* sp. yang diisolasi dari rizosfer Hutan De Djawatan, Banyuwangi, Indonesia. Sampel tanah diambil dari lima lokasi, dan diperoleh 13 isolat kandidat *Bacillus* sp. Aktivitas antagonis terhadap *P. aeruginosa* diuji menggunakan metode dual culture, sedangkan filtrat dari isolat paling aktif dievaluasi menggunakan metode difusi cakram pada beberapa variasi konsentrasi. Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) dilakukan untuk mengetahui profil senyawa pada filtrat aktif. Kandidat *Bacillus* sp. 8 menunjukkan diameter zona hambat tertinggi dibandingkan isolat lainnya, yaitu 19,75 mm. Filtrat etil asetat kandidat *Bacillus* sp. 8 masih menunjukkan aktivitas hambat hingga konsentrasi 5% (v/v). Hasil GC-MS mendeteksi 13 senyawa, dengan kelimpahan relatif tertinggi pada hexadecanoic acid, methyl ester (65,8%) dan octadecanoic acid, methyl ester (7,7%). Temuan ini menunjukkan bahwa kandidat *Bacillus* sp. dari rizosfer De Djawatan memiliki aktivitas antibakteri in vitro terhadap *P. aeruginosa*, tetapi identifikasi molekuler, isolasi senyawa, dan validasi bioaktivitas masih diperlukan untuk mengonfirmasi potensinya secara lebih lanjut.

Kata Kunci: Antimikroba, *Bacillus* sp., Dual Culture, GC-MS, *Pseudomonas aeruginosa*



This work is licensed under a [Creative Commons Attribution-ShareAlike 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial merupakan masalah kesehatan global yang serius, yang sering kali diperparah oleh *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri patogen oportunistik yang resisten terhadap berbagai antibiotik (Ramadhan et al., 2025). Infeksi ini sangat berisiko bagi pasien dengan gangguan sistem imun atau mereka yang menggunakan perangkat medis seperti ventilator dan kateter (Fitriatunnisa et al., 2025). Peningkatan tren resistensi antibiotik, yang didorong oleh penggunaan antibiotik yang tidak rasional dan transfer gen horizontal, menuntut eksplorasi sumber antimikroba baru secara mendesak (Sadli et al., 2025).

Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah pencarian mikroorganisme yang mampu memproduksi senyawa antimikroba alami. Anggota genus *Bacillus* merupakan bakteri Gram-positif penghasil spora yang dikenal mampu mensintesis berbagai molekul bioaktif, termasuk antibiotik dan enzim protease yang dapat merusak protein patogen (Haeruddin et al., 2025). Meskipun potensi antibakteri *Bacillus* telah banyak dipelajari, eksplorasi berkelanjutan pada relung lingkungan yang unik tetap penting untuk menemukan isolat atau galur baru yang berpotensi menghasilkan senyawa antibakteri (Feliatra et al., 2020).

Hutan De Djawatan di Banyuwangi dikenal memiliki keanekaragaman hayati yang kaya, menjadikan tanahnya sebagai reservoir yang sangat prospektif untuk galur *Bacillus* penghasil senyawa bioaktif (Rosyidah et al., 2024). Namun, penelitian yang dilakukan di kawasan ini masih berfokus pada aspek vegetasi dan biodiversitas tumbuhan, sementara eksplorasi komunitas mikroba tanah, khususnya bakteri genus *Bacillus*, masih sangat terbatas. Berdasarkan penelusuran literatur yang dilakukan penulis, belum ditemukan laporan yang secara khusus mengkaji isolasi *Bacillus* sp. dari rizosfer vegetasi bawah pada area naungan kanopi trembesi di Hutan De Djawatan maupun evaluasi aktivitas antagonisnya terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Sebagian besar penelitian mengenai *Bacillus* penghasil senyawa antimikroba dilakukan pada habitat lain seperti tanah pertanian, lingkungan perairan, maupun rizosfer tanaman budidaya (Feliatra et al., 2020; Boulahouat et al., 2023). Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi *Bacillus* sp. dari rizosfer unik Hutan De Djawatan dan mengevaluasi efektivitas antibakterinya terhadap *P. aeruginosa*. Investigasi ini menggunakan metode skrining *dual culture*, uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), dan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) untuk memprofilkan metabolit bioaktif spesifik yang berperan dalam aktivitas antibakteri tersebut.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksploratif-deskriptif dengan desain eksperimental laboratorik. Tahap eksploratif dilakukan melalui pengambilan sampel tanah rizosfer dari lima lokasi berbeda di Hutan De Djawatan, Banyuwangi, untuk memperoleh isolat kandidat *Bacillus* sp. Tahap eksperimental laboratorik dilakukan melalui isolasi, karakterisasi awal, pengujian aktivitas antagonis terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, pengujian daya hambat filtrat berdasarkan variasi konsentrasi, serta analisis profil senyawa menggunakan GC-MS. Lokasi pengambilan sampel ditentukan berdasarkan keberadaan vegetasi bawah

pada area naungan kanopi trembesi (*Samanea saman*) dan didokumentasikan dalam bentuk peta lokasi penelitian.

Pengambilan Sampel Tanah dan Isolasi *Bacillus* sp.

Sampel tanah dikumpulkan pada kedalaman 5-10 cm dari lima lokasi berbeda di Hutan De Djawatan. Pengambilan sampel secara spesifik difokuskan pada kedalaman 5-10 cm karena stratifikasi ini merupakan zona perakaran aktif (*active rhizosphere*) yang memiliki akumulasi sekresi eksudat akar tertinggi. Kondisi mikroklimat ini menunjang proliferasi endospora *Bacillus* sp. secara optimal dibandingkan area permukaan yang rentan terhadap fluktuasi sinar UV ekstrem (Ling et al., 2022). Kelima lokasi sampel mewakili rizosfer dari jenis vegetasi tumbuhan bawah yang mendominasi ekosistem tersebut. Parameter lingkungan, termasuk pH tanah, ketinggian, dan suhu, dicatat secara in situ. Sampel dikeringanginkan selama 24 jam. Isolasi dilakukan menggunakan metode pengenceran berseri hingga 10^{-3} , dilanjutkan dengan perlakuan kejutan panas (*heat-shock*) pada suhu 45°C selama 30 menit untuk menyeleksi endospora tahan panas. Suspensi dikultur pada media *Yeast Extract Malt Agar* (YEMA) menggunakan metode cawan tuang (*pour plate*) dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Koloni yang dicurigai dimurnikan dan disimpan pada media miring *Nutrient Agar* (NA) pada suhu 4°C.

Identifikasi Bakteri dan Persiapan Patogen

Isolat murni diidentifikasi berdasarkan morfologi makroskopis koloni dan evaluasi mikroskopis melalui pewarnaan Gram. Uji katalase dilakukan menggunakan larutan H_2O_2 3%. Identifikasi awal mengacu pada karakter fenotipik yang dijelaskan dalam Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Li et al., 2023). Karena identifikasi molekuler melalui sekuensing gen 16S rRNA belum dilakukan, isolat yang diperoleh dalam penelitian ini dinyatakan sebagai kandidat *Bacillus* sp. berdasarkan kemiripan karakter morfologi, sifat Gram positif, dan reaksi katalase positif. Di sisi lain, koloni *Pseudomonas aeruginosa* diremajakan dalam 5 mL Nutrient Broth (NB) dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Suspensi bakteri diencerkan menggunakan larutan NaCl 0,9% steril hingga sesuai dengan standar McFarland 0,5 (sekitar 10^8 CFU/mL).

Uji Aktivitas Hambat (Metode *Dual Culture*)

Potensi antagonis kandidat *Bacillus* sp. terhadap *Pseudomonas aeruginosa* diuji menggunakan metode *dual culture*. Isolat kandidat *Bacillus* sp. diinokulasikan pada salah satu sisi media Nutrient Agar (NA), sedangkan suspensi *P. aeruginosa* yang telah disesuaikan dengan standar McFarland 0,5 diinokulasikan pada sisi berlawanan dengan jarak tertentu dari isolat kandidat *Bacillus* sp. Cawan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antagonis diamati berdasarkan terbentuknya zona bening atau area hambatan pertumbuhan *P. aeruginosa* di antara kedua isolat. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan milimeter (mm). Larutan Ciprofloxacin 1% digunakan sebagai kontrol positif. Pengujian dilakukan dalam tiga ulangan biologis, dan setiap ulangan biologis dianalisis dalam tiga ulangan teknis. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong digital pada dua arah tegak lurus,

kemudian nilai rata-ratanya digunakan sebagai diameter akhir. Data zona hambat yang dilaporkan merupakan nilai rata-rata $\pm$ standar deviasi dari seluruh ulangan.

Data diameter zona hambat dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan aktivitas antagonis antar isolat kandidat *Bacillus* sp. terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Data terlebih dahulu diuji normalitasnya menggunakan uji Shapiro-Wilk dan homogenitas variansnya menggunakan Levene test. Apabila data berdistribusi normal dan homogen, analisis dilanjutkan menggunakan One-Way ANOVA pada taraf signifikansi 5% ($p < 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD apabila terdapat perbedaan yang signifikan. Apabila data tidak memenuhi asumsi normalitas atau homogenitas, maka digunakan uji Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan uji Dunn. Data disajikan dalam bentuk rata-rata $\pm$ standar deviasi (SD).

Uji Daya Hambat Berdasarkan Variasi Konsentrasi

Efektivitas filtrat kandidat *Bacillus* sp. terbaik diuji menggunakan metode difusi cakram. Kertas cakram steril berdiameter 5 mm ditetesi dengan 20 μ L filtrat kandidat *Bacillus* sp. pada berbagai konsentrasi, yaitu 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 60%, 80%, dan 100% (v/v). Ciprofloxacin 1% digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan etil asetat digunakan sebagai kontrol negatif. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, aktivitas antibakteri diamati berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram. Konsentrasi terendah filtrat yang masih menunjukkan aktivitas hambat terhadap *P. aeruginosa* dicatat sebagai konsentrasi efektif terendah pada pengujian ini.

Ekstraksi dan Analisis GC-MS

Isolat *Bacillus* sp. terpilih dikultur dalam NB pada suhu 30°C selama 48 jam dengan pengocokan (150 rpm). Metode pelarut organik menggunakan etil asetat (rasio 1:1) diaplikasikan karena terbukti optimal dalam mengekstraksi struktur antimikroba dari metabolit sekunder *Bacillus* (Mohammad et al., 2025). Supernatan bebas sel diekstraksi cair-cair menggunakan etil asetat (rasio 1:1). Fase organik dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* (40°C) (Sujitha et al., 2024). Ekstrak dianalisis menggunakan GC-MS dengan suhu oven diprogram dari 60°C hingga 300°C (10°C/menit). Pendekatan GC-MS ini merupakan metode tervalidasi yang sangat efektif untuk memprofilkan senyawa volatil dan metabolit sekunder bioaktif dari filtrat kultur *Bacillus* (Ali et al., 2024). Spektrum massa dibandingkan dengan basis data *National Institute of Standards and Technology* (Daim et al., 2024).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolasi dan Parameter Lingkungan

Proses isolasi dari rizosfer tumbuhan di ekosistem Hutan De Djawatan mengkonfirmasi keberadaan *Bacillus* sp. dengan tingkat kelimpahan yang bervariasi di setiap titik pengambilan sampel (Tabel 1). Perbedaan jumlah isolat yang ditemukan pada tiap lokasi ini diduga kuat dipengaruhi oleh karakteristik mikrohabitat setempat, terutama terkait jenis vegetasi tumbuhan inang yang mempengaruhi komposisi eksudat akar di area rizosfer. Area rizosfer ini dikenal sebagai zona interaksi kritis yang memiliki

keragaman mikroba yang jauh lebih tangguh dan metabolit yang lebih kaya dibandingkan tanah non-rhizosfer (Zhao et al., 2024).

Tabel 1. Distribusi isolat *Bacillus* sp. di Hutan De Djawatan

No	Lokasi	Jumlah Isolat	Jenis Tanaman
1	L1	3	<i>Alternanthera dentata</i>
2	L2	2	<i>Parietaria debilis</i>
3	L3	3	<i>Alpinia caerulea</i>
4	L4	2	<i>Rivina humilis</i>
5	L5	3	<i>Typhonium flagelliforme</i>

Hasil pengukuran parameter lingkungan secara *in situ* (Tabel 2) menunjukkan bahwa tingkat keasaman (pH) tanah dan fluktuasi suhu di seluruh lokasi pengamatan berada pada rentang yang sangat ideal untuk mendukung proliferasi bakteri tanah. Kondisi lingkungan yang netral hingga sedikit asam dengan suhu tropis yang hangat memberikan keuntungan ekologis bagi *Bacillus* sp. untuk membentuk endospora maupun berkolonisasi secara aktif (Sari et al., 2020).

Tabel 2. Parameter Lingkungan di Lokasi Pengambilan Sampel

No	Lokasi	pH	Ketinggian (mdpl)
1	L1	6,4	90
2	L2	6,4	85
3	L3	6,8	76
4	L4	6,2	80
5	L5	7,0	90

Karakterisasi awal lebih lanjut melalui uji biokimia dan pewarnaan mengonfirmasi bahwa seluruh isolat yang diperoleh menunjukkan reaksi katalase positif dan merupakan bakteri Gram positif, yang memperkuat identitasnya sebagai genus *Bacillus*.

Aktivitas Penghambat *Bacillus* sp.

Evaluasi potensi antagonis isolat terhadap patogen *P. aeruginosa* melalui metode dual culture memperlihatkan kemampuan penghambatan yang bervariasi antar isolat (Tabel 3). Berdasarkan hasil pengukuran diameter zona hambat, kandidat *Bacillus* sp. 8 menunjukkan nilai rata-rata zona hambat tertinggi dibandingkan isolat lainnya, yaitu sebesar $19,75 \pm 0,53$ mm. Hasil analisis One-Way ANOVA menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada aktivitas antagonis antar isolat kandidat *Bacillus* sp. terhadap *P. aeruginosa* ($p < 0,05$). Uji lanjut Tukey HSD menunjukkan bahwa kandidat *Bacillus* sp. 8 berbeda signifikan dibandingkan isolat lainnya, sehingga isolat ini dapat dinyatakan sebagai kandidat dengan aktivitas antagonis paling kuat berdasarkan diameter zona hambat dan hasil analisis statistik. Sebaliknya, beberapa isolat lain hanya mampu memberikan efek hambat tingkat sedang, dan sebagian sisanya tidak menunjukkan aktivitas antibakteri sama sekali. Variasi aktivitas hambat antar isolat

ini mengindikasikan bahwa kemampuan produksi senyawa antimikroba dapat berbeda pada masing-masing isolat, yang diduga berkaitan dengan profil genetik spesifik dan adaptasi terhadap tekanan seleksi di mikrohabitat asalnya (Kocatepe et al., 2024). Secara spesifik, tingginya daya hambat kandidat *Bacillus* sp. 8 yang diisolasi langsung dari rizosfer umumnya dikaitkan dengan kemampuan produksi enzim hidrolase serta kompetisi nutrisi dan ruang yang agresif terhadap patogen (Boulahouat et al., 2023). Selain itu, mekanisme penghambatan ini diduga kuat berkaitan dengan kapasitas *Bacillus* dalam mengintervensi sistem quorum sensing dan menekan ekspresi faktor virulensi dari *P. aeruginosa* (Jiang et al., 2023).

Tabel 3. Uji Aktivitas Hambat *Bacillus* sp. Terhadap *P.aeruginosa*

No	Spesies	Lokasi	Diameter Zona Hambat (mm)
1	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 1	L1	0,00 ± 0,00 ^d
2	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 2	L1	10,17 ± 0,36 ^c
3	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 3	L1	10,58 ± 0,37 ^c
4	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 4	L2	0,00 ± 0,00 ^d
5	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 5	L2	0,00 ± 0,00 ^d
6	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 6	L3	14,17 ± 0,46 ^b
7	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 7	L3	0,00 ± 0,00 ^d
8	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 8	L3	19,75 ± 0,53 ^a
9	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 9	L4	10,42 ± 0,43 ^c
10	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 10	L4	0,00 ± 0,00 ^d
11	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 11	L5	10,42 ± 0,33 ^c
12	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 12	L5	0,00 ± 0,00 ^d
13	Kandidat <i>Bacillus</i> sp. 13	L5	0,00 ± 0,00 ^d
14	Kontrol Positif (Ciprofloxacin)	-	39,10 ± 0,50

Analisis Daya Hambat Berdasarkan Variasi Konsentrasi

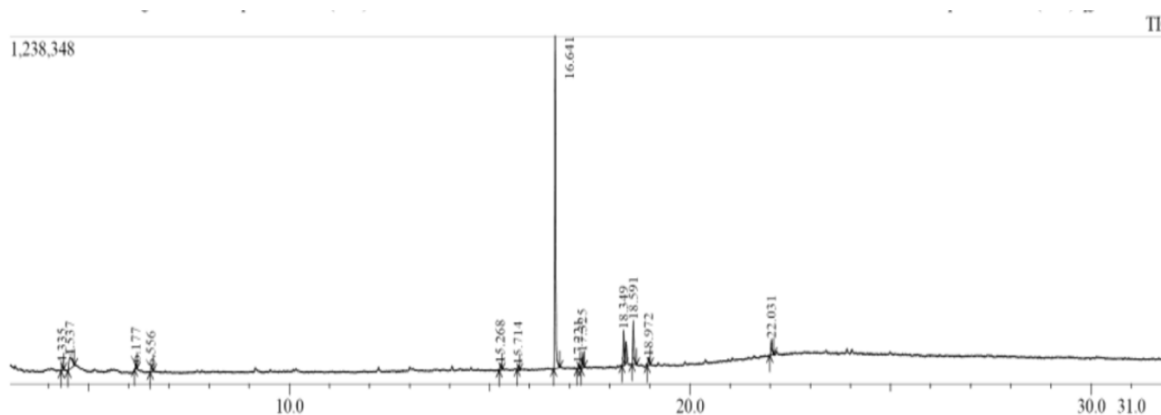
Efektivitas filtrat etil asetat dari isolat terpilih (kandidat *Bacillus* sp. 8) dievaluasi lebih jauh melalui uji daya hambat berdasarkan variasi konsentrasi filtrat. Berdasarkan Tabel 4, terdapat kecenderungan penurunan diameter zona hambat seiring dengan menurunnya konsentrasi filtrat. Meskipun mengalami penurunan daya hambat seiring dengan proses pengenceran, ekstrak ini masih mampu mempertahankan aktivitas antibakterinya hingga pada tingkat konsentrasi terendah yang diujikan, yaitu 5% (v/v). Dengan demikian, konsentrasi 5% (v/v) dapat dinyatakan sebagai konsentrasi terendah filtrat kandidat *Bacillus* sp. 8 yang masih menunjukkan aktivitas hambat terhadap *P. aeruginosa*. Kontrol negatif yang tidak memicu terbentuknya zona hambat menunjukkan bahwa pelarut etil asetat tidak memberikan pengaruh dominan terhadap aktivitas penghambatan yang diamati. Namun, hasil ini belum dapat digunakan untuk memastikan mekanisme lisis sel maupun menyimpulkan bahwa seluruh aktivitas antibakteri hanya berasal dari metabolit sekunder tertentu, sehingga diperlukan analisis lanjutan untuk mengonfirmasi mekanisme kerja senyawa aktif tersebut.

Tabel 4. Daya Hambat Filtrat Kandidat *Bacillus* sp. 8 Berdasarkan Variasi Konsentrasi Terhadap *P. aeruginosa*

No	Konsentrasi Filtrat (% v/v)	Diameter Zona Hambat (cm)
1	100	3,15
2	80	2,60
3	60	2,26
4	40	2,06
5	30	1,70
6	20	1,34
7	10	0,86
8	5	0,64
9	Kontrol Positif	3,91
10	Kontrol Negatif	0

Identifikasi Senyawa Bioaktif Melalui GC-MS

Untuk menelusuri aktor biokimiawi dibalik kuatnya daya hambat isolat *Bacillus* sp. 8, filtrat diekstrak dan dianalisis menggunakan GC-MS. Kromatogram yang dihasilkan (Gambar 1) dan analisis spektrum massa berhasil memetakan diversitas senyawa turunan organik yang terekstraksi (Tabel 5).

**Gambar 1.** Kromatogram uji GC-MS filtrat etil asetat *Bacillus* sp. 8.**Tabel 5.** Uji Aktivitas Hambat *Bacillus* sp. Terhadap *P.aeruginosa*

No	Nama Senyawa	Waktu Retensi	Area (%)
1.	Phenol	4,333	2,902
2.	Decane (CAS) <i>n</i> -Decane	4,536	6,564
3.	Undecane	6,175	4,341
4.	Octanoic acid, methyl ester	6,556	1,947
5.	3-Eicosene, (E)- (CAS)	15,267	0,584
6.	Cyclooctasiloxane	15,714	0,842
7.	Hexadecanoic acid, methyl ester	16,641	65,808
8.	Octadecamethyl Cyclo Nonasilox	17,223	0,725
9.	Hexadecanoic acid, ethyl ester	17,324	2,245

No	Nama Senyawa	Waktu Retensi	Area (%)
10	9-Octadecenoic acid, methyl ester	18,349	2,810
11	Octadecanoic acid, methyl ester	18,590	7,799
12	9-Octadecenoic acid (Z)-, ethyl ester	18,971	0,520
13	Docosanoic acid, methyl ester	22,029	2,913

Berdasarkan persentase area, profil molekuler ekstrak ini menunjukkan dominasi relatif turunan *Fatty Acid Methyl Esters* (FAMES), khususnya kelompok asam palmitat metil ester (*Hexadecanoic acid, methyl ester*) sebesar 65,8% dan asam stearat metil ester (*Octadecanoic acid, methyl ester*) sebesar 7,7%. Namun, persentase area pada analisis GC-MS hanya menggambarkan kelimpahan relatif senyawa yang terdeteksi, sehingga tidak dapat secara langsung digunakan untuk menyimpulkan bahwa senyawa dengan area terbesar merupakan penyebab utama aktivitas antibakteri. FAMES diketahui memiliki karakter lipofilik dan telah dilaporkan berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antimikroba melalui interaksi dengan struktur membran sel bakteri (Casillas-Vargas et al., 2021). Pada bakteri Gram-negatif seperti *P. aeruginosa*, senyawa lipofilik berpotensi berinteraksi dengan lapisan lipid pada membran luar, termasuk komponen lipopolisakarida, sehingga dapat mengganggu integritas membran. Akan tetapi, mekanisme tersebut dalam penelitian ini masih bersifat dugaan berdasarkan literatur, karena belum dilakukan fraksinasi, pemurnian senyawa, maupun uji bioaktivitas terarah terhadap masing-masing fraksi atau senyawa tunggal. Oleh karena itu, aktivitas antibakteri filtrat kandidat *Bacillus* sp. 8 lebih tepat ditafsirkan sebagai hasil potensial dari kombinasi beberapa senyawa bioaktif yang terdeteksi, bukan sebagai efek tunggal dari senyawa dengan persentase area tertinggi.

Dominasi Keberadaan kelompok asam lemak dan senyawa fenolik dalam ekstrak ini mengindikasikan adanya beberapa kandidat senyawa yang berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri filtrat kandidat *Bacillus* sp. 8 terhadap *P. aeruginosa*. Namun, potensi kontribusi tersebut belum dapat dinyatakan sebagai efek sinergis secara pasti karena penelitian ini belum melakukan pengujian kombinasi senyawa, fraksinasi, maupun *bioassay-guided isolation*. Lebih lanjut, deteksi senyawa berbasis silikon turunan siloksan seperti *cyclooctasiloxane* perlu ditafsirkan secara hati-hati, karena senyawa siloksan sering dilaporkan dapat muncul sebagai kontaminan dalam analisis GC-MS, baik dari kolom, septa, maupun bahan laboratorium. Oleh karena itu, keberadaan *cyclooctasiloxane* dalam penelitian ini belum dapat langsung dikaitkan dengan aktivitas antibakteri atau kemampuan penghambatan biofilm tanpa adanya kontrol pelarut, blanko instrumen, dan validasi lanjutan. Dengan demikian, profil GC-MS yang diperoleh lebih tepat dipahami sebagai gambaran awal komposisi senyawa dalam filtrat, sedangkan hubungan langsung antara masing-masing senyawa dan aktivitas antibakteri kandidat *Bacillus* sp. 8 masih memerlukan konfirmasi melalui fraksinasi, pemurnian senyawa, serta uji bioaktivitas terhadap fraksi atau senyawa tunggal.

Meskipun profil GC-MS dan pengujian *in vitro* menunjukkan potensi antibakteri yang sangat kuat, penelitian ini memiliki batasan ruang lingkup pada tahap evaluasinya. Uji daya hambat dilakukan secara

eksklusif dalam lingkungan *in vitro*, sehingga stabilitas dan kinetika farmakologis metabolit bioaktif *Bacillus* sp. 8 saat berinteraksi dengan sistem imun secara *in vivo* belum terpetakan. Oleh karena itu, margin keamanan (*safety margin*) untuk aplikasi terapeutik klinis masih membutuhkan investigasi independen pada tahap riset lanjutan (Kowalska-Krochmal & Dudek-Wicher, 2021).

KESIMPULAN

Penelitian ini menunjukkan bahwa rizosfer vegetasi bawah di Hutan De Djawatan berpotensi menjadi sumber isolat kandidat *Bacillus* sp. yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa*. Dari 13 isolat yang diperoleh dari lima lokasi pengambilan sampel, kandidat *Bacillus* sp. 8 menunjukkan aktivitas antagonis tertinggi terhadap *P. aeruginosa* berdasarkan diameter zona hambat. Pengujian filtrat etil asetat menunjukkan bahwa filtrat kandidat *Bacillus* sp. 8 masih mampu menghasilkan zona hambat hingga konsentrasi 5% (v/v). Analisis GC-MS mengidentifikasi 13 senyawa yang terdeteksi dalam filtrat, dengan kelimpahan relatif tertinggi pada *Hexadecanoic acid, methyl ester* (65,8%) dan *Octadecanoic acid, methyl ester* (7,7%). Senyawa-senyawa tersebut berpotensi berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri, namun hubungan langsung antara senyawa tertentu dan aktivitas hambat masih memerlukan konfirmasi lebih lanjut. Oleh karena itu, temuan ini masih bersifat awal dan terbatas pada pengujian *in vitro* terhadap satu patogen uji. Penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan identifikasi molekuler isolat melalui sekuensing 16S rRNA, pengujian terhadap lebih banyak patogen, penentuan aktivitas antibakteri dengan metode yang lebih terstandar, fraksinasi berbasis bioaktivitas, serta uji sitotoksitas dan uji *in vivo* untuk mengevaluasi potensi aplikasinya secara lebih komprehensif.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Udayana, atas fasilitasi sarana dan prasarana laboratorium yang diberikan selama jalannya penelitian ini. Apresiasi setinggi-tingginya juga ditujukan kepada tim dosen penasihat dan rekan sejawat di Jurusan Biologi atas bimbingan, telaah kritis, serta diskusi ilmiah yang konstruktif dalam penyusunan manuskrip ini. Selain itu, penulis berterima kasih kepada pengelola kawasan Hutan De Djawatan, Banyuwangi, atas izin dan bantuan teknis yang diberikan selama proses pengambilan sampel tanah di lapangan.

DAFTAR RUJUKAN

- Ali, S. K., El-Masry, S. S., El-Adl, K., Abdel-Mawgoud, M., Okla, M. K., Abdel-Raheem, H. E. F., Hesham, A. E. L., Aboel-Ainin, M. A., & Mohamed, H. S. (2024). Assessment of antimicrobial activity and GC-MS using culture filtrate of local marine *Bacillus* strains. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 59(7). <https://doi.org/10.1080/03601234.2024.2357465>
- Casillas-Vargas, G., Ocasio-Malavé, C., Medina, S., Morales-Guzmán, C., Del Valle, R. G., Carballeira, N. M., & Sanabria-Ríos, D. J. (2021). Antibacterial fatty acids: An update of possible mechanisms of action and implications in the development of the next-generation of antibacterial agents. In *Progress in Lipid Research* (Vol. 82). <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101093>

- Daim, T., Yalcin, H., Mermoud, A., & Mulder, V. (2024). Exploring cybertechnology standards through bibliometrics: Case of National Institute of Standards and Technology. *World Patent Information*, 77. <https://doi.org/10.1016/j.wpi.2024.102278>
- Feliatra, F., Setiaji, J., Teruna, H. Y., Lukistiyowati, I., Suharman, I., Muchlisin, Z. A., & Johan, T. I. (2020). Antibacterial activity in secondary metabolite extracts of heterotrophic bacteria against *Vibrio alginolyticus*, *Aeromonas hydrophila*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *F1000Research*, 9. <https://doi.org/10.12688/f1000research.26215.1>
- Fitriatunnisa, Masriadi, & Gafur, A. (2025). Kepatuhan Cuci Tangan Dokter dan Perawat dengan Kejadian Infeksi Nosokomial di ICU RSUD Haji Makassar. *Journal of Aafiyah Health Research (JAHR)* 2025, 6(1).
- Haeruddin, R. A., Rares, F. E. S., & Homenta, H. (2025). Pola Bakteri Aerob dan Uji Sensitivitas Antibiotik pada Urin Pasien dengan Kateter Uretra di Instalasi Rawat Inap RS Dr. J. H. Awaloei. *Cerdika: Jurnal Ilmiah Indonesia*, 5(4). <https://doi.org/10.59141/cerdika.v5i4.2519>
- Jiang, B., Wu, C., Liang, Y., Li, X., Li, J., & Song, G. (2023). *Bacillus* Co-culture Inhibits Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiology*, 80(4). <https://doi.org/10.1007/s00284-023-03218-y>
- Kowalska-Krochmal, B., & Dudek-Wicher, R. (2021). The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens10020165>
- Ling, N., Wang, T., & Kuzyakov, Y. (2022). Rhizosphere bacteriome structure and functions. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28448-9>
- Mohammad, M. K., Hussain, S. S., & Mahdi, A. S. (2025). GC-MS Characterization of Antibacterial Compounds from *Bacillus thermoamylovorans* Isolated from Human Skin Microbiome. *International Journal of Design and Nature and Ecodynamics*, 20(9). <https://doi.org/10.18280/ij dne.200908>
- Nabi, M., Tabassum, N., & Ganai, B. A. (2022). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Skimmia anquetilia* N.P. Taylor and Airy Shaw: A first study from Kashmir Himalaya. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.937946>
- Ramadhan, M. A., Alioes, Y., Eka Putra, A., Suharti, N., Aliska, G., & Hasmiwati, H. (2025). Daya Hambat Ekstrak Etanol Biji Petai terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Ilmu Kesehatan Indonesia*, 6(2). <https://doi.org/10.25077/jikesi.v6i2.1402>
- Rosyidah, A., Hidayah, E., & Lindasari, L. (2024). The Essential of Trembesi in Djawatan: Identifikasi Persebaran Pohon Trembesi sebagai Penentu Biodiversitas di Kawasan Hutan Djawatan. *Biocaster : Jurnal Kajian Biologi*, 4(3). <https://doi.org/10.36312/biocaster.v4i3.291>
- Sadli, N. K., Halimah, E., Winarni, R., & Widyatmoko, L. (2025). Pola Resistensi Antibiotik Pasien Infeksi Pneumonia Nosokomial: Tantangan Dalam Pengelolaan Infeksi Di RSUP Dr.Hasan Sadikin Bandung. *Jurnal Ilmu Kedokteran Dan Kesehatan*, 12(9). <https://doi.org/10.33024/jikk.v12i9.19748>
- Sari, N. A., Fauziah, R. N., & Nurbaety, A. T. (2020). Pengaruh Suhu dan Salinitas Terhadap Viabilitas Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Bacillus* sp. *Bogor Agricultural University*, 1(1).
- Sujitha, J. W. R., Senthilkumar, D., & Nandhagopal, M. (2024). Antimicrobial Potential of Secondary Metabolites Produced by *Bacillus* sp. and Their Gas Chromatography (GC)-Mass Spectrometry (MS) Analysis. *Cureus*. <https://doi.org/10.7759/cureus.70472>

- Syeda, A. M., & Riazunnisa, K. (2020). Data on GC-MS analysis, in vitro anti-oxidant and anti-microbial activity of the *Catharanthus roseus* and *Moringa oleifera* leaf extracts. *Data in Brief*, 29. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2020.105258>
- Zhao, R., He, F., Zhou, Y., He, Z., Xu, H., Wang, J., Hou, J., Xia, L., Huang, W., & Wang, Y. (2024). The rhizosphere of the pioneer plant *Dicranopteris dichotoma* (Thunb.) Bernh. contains powerful and robust rhizosphere growth-promoting bacteria. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 38(1). <https://doi.org/10.1080/13102818.2024.2374506>