

TESIS

ISOLASI DAN IDENTIFKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) DARI DAERAH BANTAENG, SULAWESI SELATAN, INDONESIA YANG BERPOTENSI SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

MOLECULAR IDENTIFICATION AND ACTIVITY ANTIFUNGAL SYMBIONTS *Eucheuma cottonii* FROM SOUTH SULAWESI, INDONESIA AS COMPOUNDS PRODUSEN ANTIMICROBIAL

Afifa Hikmah Isra'ini Elly

N012221028



PROGRAM STUDI PASCASARJANA

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

ISOLASI DAN IDENTIFKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) DARI DAERAH BANTAENG, SULAWESI SELATAN, INDONESIA YANG BERPOTENSI SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

Afifa Hikmah Isra'ini Elly

N012221028



**PROGRAM STUDI PASCASARJANA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2024

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND ACTIVITY ANTIFUNGAL SYMBIONTS *Eucheuma
cottonii* FROM SOUTH SULAWESI, INDONESIA AS COMPOUNDS PRODUSEN
ANTIMICROBIAL**

Afifa Hikmah Isra'ini Elly

N012221028



**PROGRAM STUDI PASCASARJANA
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

ISOLASI DAN IDENTIFKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) DARI DAERAH BANTAENG, SULAWESI SELATAN, INDONESIA YANG BERPOTENSI SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Ilmu Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

AFIFA HIKMAH ISRA'INI ELLY

N012221028

Kepada

PROGRAM STUDI PASCASARJANA

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**MOLECULAR IDENTIFICATION AND ACTIVITY ANTIFUNGAL SYMBIONTS *Eucheuma
cottonii* FROM SOUTH SULAWESI, INDONESIA AS COMPOUNDS PRODUSEN
ANTIMICROBIAL**

Thesis

As one of the requirements for achieving a magister degree

Study Program Magister of Pharmacy

Prepared and submitted by

AFIFA HIKMAH ISRA'INI ELLY

N012221028

To

**GRADUATE PROGRAM
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR, INDONESIA
2024**

TESIS

ISOLASI DAN IDENTIFKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) DARI DAERAH BANTAENG, SULAWESI SELATAN, INDONESIA YANG BERPOTENSI SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA

Yang disusun dan diajukan oleh

AFIFA HIKMAH ISRA'INI ELLY

N012221028

Telah dipertahankan di depan Panitia ujian tesis
Pada tanggal 20 Agustus 2024
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui :

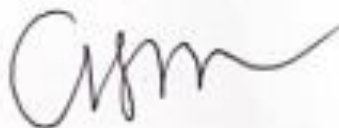
Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

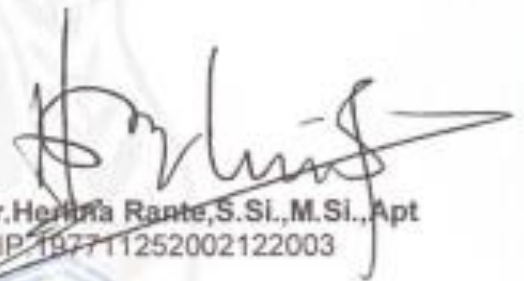


Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt
NIP. 196412311990021005

Ketua Program Studi
Magister Ilmu Farmasi

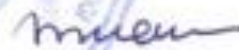


Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt
NIP.19800101 200312 1 004



Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt
NIP. 197711252002122003

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer. nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP.19670319 199203 2 002

**PERNYATAAN KEASLIAN TESIS
DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA**

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul "ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION RUMPUT LAUT (*Eucheuma cottonii*) DARI DAERAH BANTAENG, SULAWESI SELATAN, INDONESIA YANG BERPOTENSI SEBAGAI PENGHASIL SENYAWA ANTIMIKROBA" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si.,Apt. sebagai Pembimbing Utama dan Dr.Herlina Rante,S.Si.,M.Si.,Apt. sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. 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 tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 02 Agustus 2024



Afifa Hikmah Isra'ini Elly
N012221028

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji Syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanallahu wa ta'ala atas berkat, rahmat dan karunianya sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini . dalam penulisan tesis ini tentu penulis tidak terlepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak. Untuk itu, penulis menyampaikan terimakasih sebesar-besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si.,Apt, selaku pembimbing utama dan dosen penasehat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan serta motivasi kepada penulis sehingga penulis dapat menyelesaikan masa studinya di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan, serta motivasi kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
3. Bapak Prof. Subehan, M.Pharm.Sc, Ph.D,Apt, Bapak Abdul Rahim,M.Si.,Ph.D.,Apt, dan Bapak Prof. Dr. M. Natsir Djide, M.S., Apt. selaku tim penguji yang telah meluangkan waktunya untuk memberikan saran dan masukan yang membangun kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
4. Dekan, wakil dekan, seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan, dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
5. Kepada kedua orang tua yang sangat saya cintai, Mama saya Wa Hasni dan Bapak saya Baharuddin Elly. Terimakasih kepada Mama yang telah mendoakan, memotivasi, menasehati, dan mengusahakan semuanya hiingga saya bisa berada dititik ini dan menyelesaikan studi Magister, juga kepada Bapak yang sudah tenang disana, meskipun tidak berada disamping saya tetapi, saya selalu yakin disana bapak selalu mendoakan. Terimakasih juga kepada bapak sambung saya, Bapak Rusdi abidin yang telah membantu dan mendoakan sehingga saya bisa menyelesaikan kuliah ini.

6. Kepada Bang Irianto, yang selalu membantu, mendoakan, dan memotivasi saya. Terimakasih selalu menemani dari saya menyusun skripsi hingga menyusun tesis, dan kedepanya dapat menyusun hal-hal baik lain.
7. Kepada Abang, Adek, onco dan keluarga besar saya yang selalu mendoakan, membantu dan memberi kepercayaan diri yang tinggi kepada saya, sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
8. Kepada Sahabat-sahabat saya, Nanda, Dita, Lisna, Yati, Ain, Anggi yang selalu memberikan semangat kepada saya
9. Kepada teman-teman seperjuangan dalam menyelesaikan penelitian Dwi ambar, Maulidia, Akmal, Fadliana, Wulan. Terimakasih atas bantuan, dorongan dan semangatnya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tesis ini.
10. Kepada teman-teman pascasarjana angkatan 2022, yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman selama menjadi mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
11. Kepada seluruh pihak yang telah membantu dan tidak dapat saya sebutkan namanya datu persatu.
12. Terakhir kepada Afifa Hikmah Isra'ini Elly, terimakasih atas perjuangan, semangat, dan tidak pernah menyerah. Terimakasih, kamu hebat, dan kamu bisa.

Makassar,

2024

Afifa Hikmah Isra'ini Elly

ABSTRAK

Afifa Hikmah Isra'ini Elly. Isolasi dan Identifikasi Molekuler Fungi Simbion Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) dari Daerah Bantaeng, Sulawesi Selatan, Indonesia yang Berpotensi Sebagai Penghasil Senyawa Antimikroba (dibimbing oleh Gemini Alam dan Herlina Rante)

Fungi simbion dari *Eucheuma cottonii* dapat menghasilkan metabolit bioaktif baru yang berpotensi sebagai sumber antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi fungi simbion *E. cottonii* sebagai penghasil senyawa antimikroba yang dikumpulkan dari perairan laut Bantaeng, Sulawesi Selatan, Indonesia. Hasil isolasi fungi simbion diperoleh 15 isolat, kemudian diuji antagonis terhadap *Candida albicans*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*. Diperoleh 2 isolat yang menunjukkan aktivitas antimikroba terbesar yang diberi kode C. 2-1 dan C. 2-5. Kedua isolat kemudian difermentasi untuk menghasilkan metabolit sekunder. Fermentasi dilakukan menggunakan media Potato Dextrose Yeast selama 12 hari dengan kecepatan 150 rpm. Hasil fermentasi disonikasi kemudian dipisahkan antara supernatan dan biomassa. Supernatan dan biomassa diekstraksi dengan n-Heksan, kemudian dengan etil asetat (1:1 v/v). Ekstrak n-Heksan dan etil asetat yang dihasilkan dari supernatan dan biomassa diuji aktivitas antimikroba dengan metode difusi terhadap *C. albicans*, *E. coli* dan *S. aureus*. Hasil pengujian menunjukkan bahwa ekstrak n-Heksan dan etil asetat dari supernatan pada kode isolat C. 2-1 menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap *C. albicans* dan *S. aureus*. Diameter zona hambat yang diperoleh dari ekstrak n-Heksan terhadap *S. aureus* sebesar 8.77mm, sedangkan pada ekstrak etil asetat 20.01mm. Untuk *C. albicans*, diameter zona hambat yang diperoleh dari ekstrak n-Heksan adalah 14.01mm dan ekstrak etil asetat 18.77mm. Isolat fungi simbion yang menunjukkan aktivitas terbesar yaitu C. 2-1 kemudian diidentifikasi secara molekuler. Hasil identifikasi molekuler menunjukkan bahwa isolat fungi simbion C. 2-1 memiliki kesamaan sebesar 99,63% dengan *Penicillium citrinum*. Berdasarkan hasil pengujian, dapat disimpulkan bahwa fungi simbion dari *E. cottonii* memiliki potensi sebagai sumber senyawa antimikroba yang menjanjikan dan patut untuk penelitian lebih lanjut.

KATA KUNCI : *Candida albicans*; *Eucheuma cottonii*; *Penicillium citrinum* isolate A1SAB01; *Staphylococcus aureus*; Fungi Simbion; Sekuen gen 18S rRNA

ABSTRACT

Afifa Hikmah Isra'ini Elly. Molecular Identification and Activity Antifungal Symbionts *Eucheuma cottonii* From South Sulawesi, Indonesia as Compounds Produsen Antimicrobial (Supervised by Gemini Alam and Herlina Rante)

The symbiotic fungi associated with *Eucheuma cottonii* have the potential to produce novel bioactive metabolites that may serve as sources of antibiotics. This study aims to isolate and identify the fungi from *E. cottonii* as producers of antimicrobial compounds, with samples collected from seawater in Bantaeng, South Sulawesi, Indonesia. *The fungal isolation process yielded 15 isolates, which were subsequently tested for antagonistic activity against Candida albicans, Escherichia coli, and Staphylococcus aureus.* Two isolates exhibiting the highest antimicrobial activity were designated as C. 2-1 and C. 2-5. Both isolates were subjected to fermentation to produce secondary metabolites. The fermentation was carried out using potato dextrose yeast medium for 12 days at 150 rpm. Following fermentation, the mixture was separated into supernatant and biomass. The supernatant and biomass were then extracted sequentially with n-hexane and subsequently with ethyl acetate (1:1 v/v). The n-Hexane and ethyl acetate extracts obtained from the supernatant and biomass were evaluated for antimicrobial activity using diffusion methods against *C. albicans*, *E. coli*, and *S. aureus*. The results demonstrated that the n-Hexane and ethyl acetate extracts from the supernatant of the C. 2-1 isolate exhibited antimicrobial activity against *C. albicans* and *S. aureus*. The barrier zone diameter obtained from n-Hexane extract against *S. aureus* is 8.77 mm, whereas for ethyl acetate extract, it is 20.01 mm. For *C. albicans*, the barrier area diameter of n-Hexane extract is 14.01 mm and that of ethyl acid extract is 18.77 mm. The isolate fungus that exhibits the highest activity is C. 2-1, which we then proceed to identify molecularly. Molecular identification results indicate that the C. 2-1 fungal isolate exhibits 99.63% similarity to *Penicillium citrinum*. Based on these findings, it can be concluded that the fungi associated with *Eucheuma cottonii* hold potential as a promising source of antimicrobial compounds and warrant further investigation.

Keywords : *Candida albicans*, *Eucheuma cottonii*, *Penicillium citrinum* isolate A1SAB01, *Staphylococcus aureus*, Symbiotic fungi, 18S rRNA gene

DAFTAR ISI

UCAPAN TERIMAKASIH	viii
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Rumput Laut (<i>Eucheuma cottonii</i>)	6
2.2 Fungi Simbion.....	7
2.3 Isolasi Fungi Simbion.....	8
2.4 Fermentasi.....	10
2.4.1 Sistem Batch	10
2.4.2 Sistem Fed-batch	11
2.4.3 Sistem continous.....	11
2.5 Identifikasi Molekuler Fungi Simbion	12
2.5.1 Polymerase Chain Reaction	12
2.5.2 Sekuensing 18S rRNA	17
2.5.3 Filogenetik.....	17
2.6 Aktivitas Antimikroba.....	18
2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis.....	18
2.7 Kerangka Teori	19
2.8 Kerangka konsep.....	20
BAB III METODE PENELITIAN	21
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
3.2 Alat dan Bahan	21
3.2.1 Alat.....	21

3.2.2	Bahan.....	21
3.3	Prosedur kerja	22
3.3.1	Pengumpulan sampel.....	22
3.3.2	Persiapan awal.....	22
3.3.2.1	Sterilisasi alat.....	22
3.6	Identifikasi Molekuler Berdasarkan Sekuensing 18S Ribosomal RNA.	26
3.6.1	Ekstraksi DNA	26
3.6.2	Amplifikasi gen 18S rRNA Dengan Metode Polymerase Chain Reaction	27
3.6.3	Deteksi Produk Polymerase Chain Reaction Dengan Elektroforesis.....	27
3.6.4	Sekuensing 18S Ribosomal RNA.....	28
BAB IV	HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1	Isolasi Fungi Symbion Rumput Laut (<i>Eucheuma cottonii</i>).....	29
4.3	Fermentasi dan Ekstraksi Isolat Fungi Symbion	32
4.4	Uji Aktivitas Antimikroba	35
4.5	Uji Kromatografi Lapis Tipis	37
BAB V	KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1	Kesimpulan.....	45
	DAFTAR PUSTAKA	46
	LAMPIRAN	51

DAFTAR TABEL

Table 1. Hasil pengujian antagonis dan nilai zona hambat dari fungi simbion <i>E. cottonii</i>	32
Table 2. Hasil pengukuran diameter zona hambat antimikroba	37
Table 3. Nilai Rf hasil kromatografi lapis tipis ekstrak isolat fungi simbion dan ekstrak rumput laut	39
Table 4. Primer Amplifikasi	40

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Rumput Laut <i>Eucheuma cottonii</i> (Sun et al., 2022).....	6
Gambar 2. Kerangka teori	19
Gambar 3. Isolat murni sampel rumput laut <i>E. cottonii</i>	30
Gambar 4. Kurva hubungan antara lama fermentasi dengan zona hambat menggunakan medium PDY	34
Gambar 5. Hasil uji Aktivitas Antimikroba hasil fermentasi isolat fungi simbion rumput laut (<i>Eucheuma cottonii</i>)	36
Gambar 6. Profil kromatografi lapis tipis menggunakan eluen n-Heksan : Etil asetat (4:1 v/v)	38
Gambar 7. Hasil visual elektroforesis	41
Gambar 8. Filogenik Isolat Fungi Simbion dengan kode C. 2-1	42
Gambar 9. Hasil BLAST Isolat Fungi Simbion C. 2-1	44

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyebab kematian di dunia terutama di daerah tropis seperti di Indonesia, sebagian besar penyakit yang muncul dan menyebabkan infeksi pada umumnya disebabkan oleh mikroba dan bakteri patogen (Maulani *et al.*, 2019). Bakteri patogen yang resisten terhadap antimikroba menjadi masalah serius dalam masyarakat, beberapa bakteri patogen diketahui resisten terhadap lebih dari satu antibiotik atau multidrug resistance (Pringgienies *et al.*, 2020). Resistensi antibiotik pada beberapa bakteri patogen mengakibatkan penggunaan antibiotik atau obat antimikroba lainnya menjadi tidak efektif dan infeksi menjadi semakin sulit untuk diobati, oleh karena itu para ilmuwan berupaya untuk penemuan antibiotik baru dengan mengembangkan sumber daya laut, karena sebagian besar sumber daya laut belum dimanfaatkan secara maksimal (Palanisamy *et al.*, 2019).

Perairan laut Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang tinggi akan organisme lautnya, seperti makroalga. Ditemukan 555 spesies dari 8.000 spesies makroalga yang ada, keberagaman dan komunitas makroalga dipengaruhi oleh oseanografi, topografi, dan faktor-faktor biologis lainnya. Makroalga dapat diklasifikasikan menjadi tiga golongan utama, yaitu coklat (Phaeophyta), merah (Rhodophyta), dan makroalga hijau (Chlorophyta) (Warsidah *et al.*, 2022). Rumput laut menghasilkan berbagai metabolit sekunder bioaktif seperti antimikroba, anthelmintik, dan sitotoksik, dan dianggap sebagai sumber berbagai senyawa bioaktif karena aktivitas biologisnya yang tinggi (Sulistyaningsih *et al.*, 2019). Rumput laut sebagai sumber yang kaya akan bioaktif yang

secara positif dapat mempengaruhi metabolisme sel dan memberikan kondisi menguntungkan, terdapat pada ekstrak rumput laut seperti polisakarida yang mengaktifkan pertumbuhan beberapa jamur simbiosis, fukoida yang berfungsi sebagai antivirus dan antibakteri (Tuhy *et al.*, 2012).

Rumput laut *Eucheuma cottonii* termasuk dalam kelompok rumput laut merah yang dapat membentuk asosiasi kuat dengan komunitas prokariotik, terutama bakteri, bakteri yang berkolaborasi ini memiliki peran penting dalam mensintesis senyawa metabolit sekunder yang bermanfaat bagi inangnya khususnya terhadap predasi atau infeksi, meskipun *E. cottonii* telah dibudidayakan secara luas, penelitian yang melaporkan isolat bakteri dan aktivitas antibakterinya masih sangat terbatas (Purnami *et al.*, 2022). Rumput laut *E. cottonii* merupakan salah satu jenis alga merah yang diperoleh dari Sabah, yang memiliki komponen aktif utama berupa polisakarida sulfat atau k-karagenan, seperti yang ditemukan pada beberapa jenis rumput laut lainnya namun, yang membedakan *E. cottonii* mampu menghasilkan jenis karagenan tertentu yang disebut kappa-karagenan yang memberikan sifat antimikroba yang signifikan, karagenan jenis kappa ini memiliki gugus sulfat yang lebih tinggi dibandingkan dengan jenis karagenan lainnya (seperti iota dan lambda), sehingga memberikan aktivitas antimikroba lebih kuat (Diva Juno *et al.*, 2023). Rumput laut *E. cottonii* mampu dimanfaatkan sebagai sumber komponen aktif yang menghasilkan berbagai metabolit sekunder dengan aksi biologis, seperti antioksidan, antivirus, antijamur, dan antimikroba (Astriani *et al.*, 2023). Pada penelitian yang dilakukan oleh Sulistyarningsih *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa rumput laut *E. cottonii* mengandung senyawa aktif, seperti alkaloid, senyawa flavonoid, steroid/triterpenoid, saponin, tanin dan polifenol tanah yang dapat berfungsi sebagai antibakteri terhadap bakteri negatif, bakteri positif seperti *E. coli*, *S. aureus*, dan beberapa

bakteri lainya. Penelitian yang dilakukan oleh Pratiwi *et al.*, (2022) *E. cottonii* merupakan salah satu ganggang dari genus Eucheuma yang menghasilkan metabolit sekunder yang berperan sebagai antibakteri, *E. cottonii* dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*, *E. coli*, *V. cholera*, dan *S. Typhosa* (Pratiwi *et al.*, 2020).

Penemuan senyawa bioaktif baru yang diperoleh dari mikroorganisme simbion dapat dilakukan, sekitar 70.000 spesies jamur dideskripsikan sebagai mikroba simbiotik, diantaranya 1500 spesies fungi simbion berasal dari laut yang sebagian besar dari ekosistem pesisir (El-rahman *et al.*, 2020). Marine-derived fungi (MDF) yang hidup berhubungan simbiosis dengan invertebrata laut dapat menghasilkan sejumlah besar metabolit bioaktif baru seperti, antibiotik, antioksidan, antitumor, antijamur, antialga, antiserangga, dan sebagai penghambat astilkolin esterase (El-rahman *et al.*, 2020). Fungi simbion berasosiasi dengan organisme laut dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemiripan struktur dengan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh inangnya (Proksch., 2022). Hal ini disebabkan karena produsen atau penghasil utama dari biosintesis metabolit sekunder yang diisolasi dari inang laut berasal dari mikroorganisme simbionnya (El-rahman *et al.*, 2020). Oleh karena itu, mikroorganisme simbiotik memiliki potensi untuk menjadi sumber senyawa bioaktif, dan bakteri simbion lebih efektif untuk digunakan daripada ekstrak kasar makroalga (Sumanti *et al.*, 2021).

Penemuan mikroba simbion yang memiliki potensi sebagai aktivitas antibakteri harus terus dilakukan, salah satu daerah yang memiliki penghasil rumput laut *E. cottonii* terbanyak yaitu kabupaten Bantaeng Sulawesi Selatan Indonesia, luas lahan provinsi ini mendukung pengembangan rumput laut, produksi rumput laut didaerah ini mencapai 670.740 ton produk basah atau setara dengan 63.074 ton produk kering

yang persentasenya diperkirakan sekitar 36,5% (Arsal *et al.*, 2018).

Rumput laut *Eucheuma cottonii* merupakan rumput laut yang dibudidayakan sehingga pertumbuhannya menggunakan bibit unggul yang langsung berasal dari pemerintah, penanaman rumput laut juga dilakukan dengan pemilihan lokasi kedalaman, waktu panen dan aspek alam kabupaten bantaeng sangat tepat untuk dijadikan sebagai daerah penanaman rumput laut (Wardhani *et al.*, 2021). Perbedaan lingkungan tempat hidup dari rumput laut menjadi suatu faktor yang mempengaruhi kehidupan rumput laut, yaitu kondisi substrat perairan, metode budidaya, suhu, arus, salinitas, kecerahan, penyediaan bibit, dll, sehingga dapat mempengaruhi strain simbiosis mikroba yang ditemukan di inangnya (Marhayana *et al.*, 2021). Berdasarkan pada latar belakang diatas pada penelitian ini dilakukan Isolasi dan Identifikasi Molekuler Fungi Simbiosis Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) yang diperoleh dari pesisir pantai daerah Bantaeng, Sulawesi Selatan, Indonesia sebagai penghasil senyawa antimikroba.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pada latar belakang diatas maka permasalahan yang timbul adalah :

1. Apakah isolat fungi simbiosis dari rumput laut (*Eucheuma cottonii*) mampu menghasilkan senyawa antimikroba?
2. Bagaimana karakteristik molekuler dari isolat fungi simbiosis rumput laut (*Eucheuma cottonii*) berdasarkan sekuen Gen 18S rRNA?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh dan mengetahui isolat fungi simbiosis rumput laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai penghasil senyawa antimikroba
2. Mengetahui karakteristik molekuler dari isolat fungi simbiosis rumput laut (*Eucheuma cottonii*) berdasarkan sekuen Gen 18S rRNA

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menambah ilmu pengetahuan terutama di bidang mikrobiologi dan eksplorasi bahan obat dari produk alam untuk pengembangan penemuan senyawa antimikroba yang dihasilkan tanpa merusak keanekaragaman hayati dan menjaga kelestarian alam di masa yang akan datang.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*)

2.1.1 Klasifikasi

Adapun Klasifikasi rumput laut (*Eucheuma cottonii*) menurut World

Scientific News, 2019 :

Kindom : Plantae
Subkindom : Biliphyta
Phylum : Rhodophyta
Subphylum : Eurhodophytina
Class : Florideophyceae
Subclass : Rhodymeniophycidae
Order : Gigartinales
Family : Solieriaceae
Genus : *Eucheuma*
Species : *Eucheuma cottonii*



Gambar 1. Rumput Laut *Eucheuma cottonii* (Sun *et al.*, 2022)

2.1.2 Morfologi Rumput Laut

Rumput laut merupakan makroalga benthic yang hidup pada dasar perairan dan strukturnya tidak dapat dibedakan antara akar, batang dan daun, sehingga termasuk dalam golongan *thallophyta*. Rumput laut memiliki lebih dari 782 jenis yang tersebar diseluruh Indonesia, jenis-jenisnya terdiri dari 192 alga hijau, 134 alga coklat, dan 452 alga merah. Rumput laut dari genus *Eucheuma* adalah salah satu anggota kelas *Rhodophyceae* yang banyak dibudidayakan di Indonesia karena memiliki kandungan agar dan karagenan yang tinggi sekitar 62%-68% dibandingkan dengan jenis lainya (Ekaryani *et al.*, 2023).

2.1.3 Kegunaan Rumput Laut

Rumput laut (*Eucheuma cottonii*) merupakan salah satu jenis rumput laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia yang telah dibudidayakan untuk industri produk makanan dan non makanan, rumput laut *E. cottonii* terbukti memberikan aktivitas antibakteri. Indonesia merupakan produsen rumput laut terbesar kedua di dunia setelah China, rumput laut yang paling banyak diproduksi dan diekspor adalah *E. cottonii* (Sudarwati *et al.*, 2020). Penemuan aktivitas biologis metabolit rumput laut *E. cottonii* dilaporkan menunjukkan aktivitas antibakteri, sitotoksik, dan antikoagulan. Beberapa spesies rumput laut dapat dimanfaatkan untuk kesehatan karena mengandung senyawa kimia yang memiliki aktivitas biologis, senyawa kimia tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, tanin dan saponin yang dihasilkan memiliki aktivitas biologis seperti antibakteri, antijamur, dan antivirus (Ekaryani *et al.*, 2023).

2.2 Fungi Simbion

Simbiosis adalah hubungan fisik erat yang termasuk dalam dua atau lebih organisme hidup. Hubungan simbiosis dapat diketahui dari cekungan laut, terutama jika banyak invertebrata hidup dengan komunitas

mikroba. Komunitas mikroba simbiotik juga dapat menyediakan mekanisme pertahanan ke inang dimana beberapa molekul diproduksi oleh mikroba simbiotik untuk melindungi dirinya serta inang dari patogen dan predator. Banyak yang tersedia pada spons laut untuk hubungan simbiosis mereka dengan bioaktif molekul yang menghasilkan spesies bakteri (Bharathi *et al.*, 2021).

Mikroba simbion yang sering dijumpai adalah fungi, sekitar 70.000 spesies fungi telah dideskripsikan sebagai mikroba simbiosis, diantaranya 1500 spesies fungi yang berasal dari ekosistem pesisir. Produk alami bioaktif baru yang tidak ditemukan pada strain terestrial dihasilkan oleh mikroba laut, produsen atau partisipan dalam biosintesis metabolit sekunder yang diisolasi dari inang laut adalah mikroorganisme yang bersimbiosis. Fungi yang berasal dari laut telah dikenal sebagai sumber metabolit baru yang memiliki bioaktivitas kuat. Fungi yang berasal dari laut (MDF) hidup dalam hubungan simbiosis dengan invertebrate laut dan menghasilkan metabolit bioaktif baru termasuk antibiotik, antioksidan, antitumor, antijamur, antialga, antiserangga, dan inhibitor asetilkolin esterase (El-rahman *et al.*, 2020).

Rumput laut termasuk dalam biota laut yang dilaporkan telah meningkat dalam beberapa tahun terakhir, beberapa senyawa bioaktif yang diidentifikasi dari rumput laut telah menghasilkan berbagai metabolit sekunder bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, steroid/terpenoid, dan tanin, dilaporkan senyawa tersebut menunjukkan aktivitas antimikroba, antihelmentik, dan sitotoksik (Sulistyaningsih *et al.*, 2019).

2.3 Isolasi Fungi Simbion

Pengamatan terhadap mikroorganisme tertentu hanya dapat dilakukan jika mikroorganisme dipisahkan dari lingkungan dan mikroorganisme lainnya, mikroorganisme hidup bebas di lingkungan, tersebar didunia, tanah, air, bahkan mikroorganisme yang hidup didalam

tubuh manusia, hal ini dapat dilakukan dengan isolasi. Terdapat beberapa metode yang dapat digunakan dan disesuaikan dengan jenis mikroba yang akan diamati. Teknik isolasi mikroba adalah upaya untuk menumbuhkan mikroorganisme diluar lingkungan alaminya, pemisahan mikroorganisme diluar lingkungan bertujuan untuk mendapatkan biakan bakteri yang tidak lagi bercampur dengan bakteri lain yang disebut biakan murni. Prinsip dari isolasi mikroba adalah memisahkan satu jenis mikroba dengan mikroba lain yang berasal dari campiran berbagai mikroba, hal ini dilakukan dengan cara menumbuhkannya pada media padat, sel mikroba akan membentuk koloni sel yang tetap pada tempatnya.

Pemberian sampel sebagai sumber isolat mikroba dapat diperoleh dengan berbagai cara, dari bagian tumbuhan ada sampel dari produk makanan seperti susu, daging, ikan, terasi dan lainnya. Terdapat pengambilan sampel dengan melakukan proses fermentasi untuk mendapatkan indigenous mikroorganisme (MOI) yang bertujuan untuk memacu proses dekomposisi oleh mikroba, mikroba yang telah tumbuh dan berkembang dari media MOI digunakan sebagai sumber isolat untuk keperluan isolat. Pentingnya mengisolasi mikroba dari lingkungan, seperti makanan (substrat padat), minuman (substrat cair), dan diri sendiri karena banyaknya mikroba yang sulit diamati atau dibedakan secara langsung menggunakan panca indera, sehingga dengan isolasi akan memudahkan untuk melihat dan mengamati bentuk-bentuk pertumbuhan mikroba pada beberapa media serta dapat melihat morfologi mikroba yaitu inokulasi yang merupakan teknik pemindahan suatu kultur tertentu dari media lama ke media baru dengan tujuan mendapatkan kultur murni tanpa kontaminasi dari mikroba yang tidak diinginkan. Beberapa metode diketahui memperoleh kultur murni dari kultur campuran. Dua yang paling umum digunakan adalah metode scratch cup dan metode pour cup yang didasarkan pada prinsip pengenceran dengan maksud untuk memperoleh spesies individu dengan asumsi bahwa setiap koloni dapat dipisahkan

dari jenis sel yang dapat diamati. Kultur murni diperlukan dalam berbagai metode mikrobiologi, termasuk digunakan untuk mengidentifikasi mikroba. Untuk mengamati karakteristik kultur morfologi, fisiologi, dan serologi diperlukan mikroba dari satu spesies.

Isolasi dilakukan dengan pengenceran bertingkat kemudian dilanjutkan dengan metode spread plate yang dilakukan secara aseptis di Laminar Air Flow (LAF), dari pengenceran 10^{-1} sampai 10^{-5} , diambil 100 μ l larutan sampel dengan menggunakan mikropipet dan dipindahkan ke permukaan medium Nutrient Agar (NA) padat. Kemudian inokulum didiamkan dengan drigalski dan diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37oC selama 48 jam. Karakteristik isolat meliputi pengamatan mikroskopis (karakterisasi bentuk, tepi, elevasi dan warna koloni, dan pengamatan mikroskopis meliputi morfologi sel dan pewarnaan (Jufri, 2020).

2.4 Fermentasi

Fermentasi merupakan proses yang memanfaatkan mikroba dengan tujuan merubah subsrat menjadi produk tertentu sesuai dengan yang diharapkan, fermentasi sebagian besar mengacu pada proses metabolisme alami yang digerakkan oleh mikroba lain. Proses fermentasi biasanya merupakan jalur metabolisme yang menghasilkan modifikasi molekul organik berkat aksi mikroorganisme dan enzim.

Terdapat 3 sistem fermentasi yang dapat dilakukan, yaitu (Yang *et al.*, 2019) :

2.4.1 Sistem Batch

Sistem batch adalah sistem kultur tertutup yang mengandung nutrisi awal dalam jumlah yang terbatas, dalam fermentasi batch mikroorganisme diinokulasi ke volume media yang berada dalam 1 fermentor, sehingga tidak ada penambahan bahan atau pengambilan hasil selama fermentasi berlangsung. Keuntungan dari pemrosesan batch adalah kemudahan pengoperasian dan risiko kontaminasi rendah,

mudah, dan sederhana. Sedangkan kekurangannya adalah kepadatan sel relatif rendah yang dapat dicapai dan downtime yang relatif lama antar batch, karena pembersihan, pengaturan wadah, dan sterilisasi, dan sistem fermentasi ini adalah sistem yang sering digunakan dilaboratorium.

2.4.2 Sistem Fed-batch

Fermentasi fed-batch adalah versi batch yang dimodifikasi, sistem ini sama dengan sistem batch yang tidak tertutup, ini adalah metode operasi yang paling umum di industri bioproses. Sistem ini dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu, sistem volume tetap dan volume berubah. Sistem volume tetap berarti setiap penambahan medium baru ke fermentor, terdapat medium lama, produk, atau sel yang akan dikeluarkan sama jumlahnya dengan medium baru yang ditambahkan kedalam fermentor sudah tidak terdapat medium lama.

2.4.3 Sistem continous

Sistem ini biasanya digunakan dalam skala industri yang fase eksponensialnya diperpanjang atau berkelanjutan, dalam sistem ini media segar terus menerus ditambahkan kedalam fermentor, sedangkan media dan sel yang digunakan dipanen pada saat yang bersamaan. Keuntungan dari sistem ini adalah mempunyai produktivitas dan kecepatan pertumbuhan dapat dioptimalkan, proses dalam waktu lama dapat dijalankan, dapat digunakan model sel amobil, serta faktor fisis dan lingkungan mudah dianalisis. Sedangkan kerugiannya tidak sesuai dengan kaidah good Manufacturing Practice sehingga dilarang digunakan untuk memproduksi produk farmasi, resiko kontaminasi yang besar.

2.5 Identifikasi Molekuler Fungi Simbion

Identifikasi mikroorganisme dalam sampel pasien telah lama menjadi yang utama berdasarkan deteksi karakteristik fenotipik yang ditunjukkan oleh patogen yang diduga. Pewarnaan gram, morfologi koloni, pemeriksaan mikroskopik, pertumbuhan diferensial media selektif dan berbagai uji biokimia merupakan klasifikasi bakteri, ragi dan jamur yang sering digunakan. Namun, metode ini sering kali mengandalkan proses metabolisme aktif mikroorganisme yang terlibat, oleh karenanya lama masa inkubasi terkadang diperlukan. Molekuler metode diagnostik terutama sekuensing RNA ribosom 18S atau deteksi PCR real-time terhadap gen terpilih telah dilakukan dan digunakan sebagai pendekatan alternative. Namun teknik ini lebih rumit dan mahal, sehingga tidak cocok digunakan pada sebagian besar sampel yang umum dilakukan setiap hari di laboratorium mikrobiologi klinik.

2.5.1 Polymerase Chain Reaction

Reaksi rantai polimerase (PCR) merupakan teknik biologi molekuler baru yang populer untuk mereplikasi DNA secara enzimatik tanpa menggunakan organisme hidup, seperti *E. coli* atau ragi. Teknik ini memungkinkan sejumlah kecil molekul DNA untuk diperbanyak berkali-kali, secara eksponensial dengan lebih banyak DNA yang tersedia, analisis menjadi jauh lebih mudah. PCR umumnya digunakan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai tugas, seperti deteksi penyakit keturunan, identifikasi sidik jari genetik, diagnosis penyakit menular, kloning gen, pengujian paternitas, dan komputasi DNA. Teknik ini dikembangkan pada tahun 1983 oleh Kary Mullis, PCR sekarang menjadi teknik umum dan penting yang digunakan di laboratorium penelitian medis dan biologi untuk berbagai aplikasi (Rahman *et al.*, 2013).

Proses PCR umumnya dilakukan pada volume reaksi 10-200ml dalam tabung reaksi kecil (volume 0,2-0,5ml) dalam thermal cycler. Cycler thermal berfungsi untuk memanaskan dan mendinginkan tabung reaksi untuk mencapai suhu yang dibutuhkan pada setiap langkah dari reaksi tersebut. Cycler thermal modern memanfaatkan efek peltier yang memungkinkan baik pada pemanasan dan pendinginan dapat menahan blok tabung PCR cukup dengan membalikkan arus listrik. Tabung reaksi berdinding tipis memungkinkan konduktivitas termal yang baik agar cepat terjadi kesetimbangan termal (Rahman *et al.*, 2013).

Pada tahap awal dari siklus termal dimulai dengan proses yang disebut dengan inisialisasi, juga dikenal sebagai awal panas, untuk mengaktifkan polimerase. Tahap ini dilakukan pada suhu dari 94°C hingga 96°C selama 1 menit hingga 10 menit tergantung pada DNA cetakan dan jenis polimerasinya. Selanjutnya diikuti dengan proses denaturasi yang dilakukan pada suhu 93°C dan 98°C. Ikatan hidrogen dalam DNA beruntai ganda (dsDNA) terputus sehingga menghasilkan informasi dari dua molekul DNA beruntai tunggal (ssDNA) dari masing-masing dsDNA (langkah denaturasi). Suhu kemudian diturunkan ke suhu anil spesifik primer dalam kisaran dari 55°C hingga 65°C sehingga primer dianil menjadi urutan komplementer dari molekul DNA beruntai tunggal, ini disebut sebagai langkah annealing. Selanjutnya campuran PCR dipanaskan hingga suhu antara 72°C dan 80°C berdasarkan polimerase yang digunakan, selama langkah ini urutan DNA tidak lengkap diperpanjang oleh polimerase dengan adanya bebas deoxynucleotida triphosphates (dNTPS) mensintesis DNA untai ganda, ini disebut langkah ekstensi. Selanjutnya tiga langkah yaitu denaturasi, anil dan ekstensi diulang untuk menghasilkan beberapa salinan DNA asli (Sreehith *et al.*, 2018).

2.5.1.1 Kondisi Reaksi Polymerase Chain Reaction

Volume reaksi bervariasi antara 10 dan 100 μ l. Terdapat banyak formula media reaksi. Namun, untuk menentukan formula standar yang cocok untuk sebagian besar reaksi polimerisasi. Formula ini telah dipilih oleh sebagian besar produsen dan pemasok, yang juga menghadirkan larutan penyangga siap pakai dengan Taq polimerase. Dikonsentrasikan 10 kali, rumusnya sebagai berikut : 100 mM Tris-HCl, pH 9,0; 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl. Dimungkinkan untuk menambah deterjen (Tween 20, Triton X-100) atau gliserol untuk meningkatkan kondisi keketatan yang membuatnya lebih sulit dan karena itu hibridisasi primer lebih selektif. Pendekatan ini umumnya digunakan untuk mengurangi tingkat amplifikasi nonspesifik karena hibridisasi primer pada sekuens tanpa hubungan dengan sekuens yang diinginkan. Dapat juga mengurangi konsentrasi KCl sampai tereliminasi atau meningkatkan konsentrasi MgCl₂. Beberapa pasang primer bekerja lebih baik dengan larutan yang diperkaya dengan magnesium. Disisi lain, dengan konsentrasi dNTP yang tinggi, konsentrasi magnesium harus ditingkatkan karena interaksi stoikiometri antara magnesium dan dNTP yang mengurangi jumlah magnesium bebas dalam media reaksi (Nagpal *et al.*, 2020).

Deoxyribonucleoside triphosphates (dNTPs) menyediakan energi dan nukleotida yang dibutuhkan untuk sintesis DNA selama polimerase rantai. Selanjutnya digabungkan dalam media reaksi secara berlebihan, yaitu sekitar 200 μ M akhir tergantung pada volume reaksi yang dipilih. Konsentrasi primer dapat bervariasi antara 10 dan 50 pmol per sampel. DNA matriks dapat berasal dari organisme apapun dan bahan biologis kompleks yang mencakup DNA dari organisme berbeda. Namun untuk memastikan keberhasilan PCR, tetap diperlukan matriks DNA

yang tidak terlalu terdegradasi. Kriteria ini lebih penting karena ukuran urutan dari minatnya besar, juga penting bahwa ekstrak DNA tidak terkontaminasi dengan penghambat reaksi berantairpolimerase (deterjen, EDTA, fenol, protein, dll). Jumlah DNA cetakan dalam media reaksi memulai bahwa reaksi amplifikasi dapat dikurangi menjadi satu salinan kuantitas maksimum tidak boleh melebihi 2 μ g. Pada umumnya jumlah yang digunakan berkisar antara 10-500 ng DNA cetakan. Jumlah Taq polimerase per sampel umumnya antara 1 dan 3 unit. Pemilihan durasi siklus suhu dan jumlah siklus tergantung pada ukuran urutan yang diinginkan secara ukuran dan komplementaritas primer. Durasi harus dikurangi seminimal mungkin tidak hanya untuk menghemat waktu tetapi juga untuk mencegah risiko amplifikasi nonspesifik. Untuk denaturasi dan hibridisasi primer, biasanya cukup 30 detik. Untuk pemanjangan, dibutuhkan 1 menit per kilobase DNA yang diinginkan dan 2 menit per kilobase untuk siklus pemanjangan akhir. Jumlah siklus, umumnya antara 20 dan 40 berbanding terbalik dengan kelimpahan matriks DNA (Nagpal *et al.*, 2020).

2.5.1.2 Deteksi Dan Analisis Produk Polymerase Chain Reaction

Produk dari suatu PCR terdiri dari satu atau lebih fragmen DNA (urutan atau sekuens yang diinginkan). Deteksi dan analisis produk dapat dilakukan dengan sangat cepat dengan elektroforesis gel agarosa (atau akrilamida). DNA terungkap dengan pewarnaan etidium bromida. Jadi, produknya instan terlihat oleh transiluminasi ultraviolet (280-320 nm). Produk yang sangat kecil sering terlihat sangat dekat dengan bagian depan migrasi dalam bentuk pita yang kurang lebih menyebar. Mereka sesuai dengan dimer primer dan terkadang dengan primer itu sendiri tergantung pada kondisi reaksi reaksi fragmen DNA

nonspesifik dapat diamplifikasi ke tingkat yang lebih besar atau lebih kecil, membentuk pita bersih atau “smear”. Alat ini menggunakan prinsip elektroforesis kapiler. Deteksi fragmen dilakukan oleh dioda laser, ini hanya mungkin jika PCR dilakukan dengan primer digabungkan ke fluorokrom (Nagpal *et al.*, 2020).

2.5.1.3 Keuntungan Dan Keterbatasan Polymerase Chain Reaction

1. Keuntungan :

- 1) Merupakan teknik sederhana untuk dipahami, dilakukan, digunakan, dan menghasilkan hasil dengan cepat
- 2) Polymerase Chain Reaction memiliki teknik yang sangat sensitif sehingga berpotensi menghasilkan jutaan hingga miliaran eksemplar produk tertentu untuk pengurutan, kloning, dan analisis
- 3) Quantitative Polymerase Chain Reaction memiliki keuntungan dari kuantifikasi produk yang disintesis sehingga dapat digunakan untuk menganalisis perubahan tingkat ekspresi gen pada tumor, mikroba, atau keadaan penyakit lainnya.

2. Keterbatasan :

- 1) Meskipun PCR adalah teknik yang sangat baik, namun PCR memiliki keterbatasan
- 2) Karena PCR memiliki sensitivitas yang tinggi, segala bentuk kontaminasi sampel bahkan oleh jumlah jejak DNA dapat terdeteksi
- 3) Polymerase Chain Reaction hanya dapat digunakan untuk mengidentifikasi ada atau tidak adanya patogen atau gen yang diketahui
- 4) Primer yang digunakan untuk PCR dapat dianalisis secara non-spesifik ke sekuen serupa, tetapi tidak identik dengan DNA target

- 5) Nukleotida yang salah bisa jadi dimasukkan ke dalam urutan PCR oleh DNA polimerase, meskipun pada tingkat yang rendah (Green *et al.*, 2019).

2.5.2 Sekuensing 18S rRNA

Ribosomal RNA merupakan gen yang paling stabil dalam semua sel, rRNA (rDNA) telah digunakan secara ekstensif untuk menentukan taksonomi, filogeni, dan untuk memperkirakan tingkat penyebaran spesies bakteri. Gen 18S rRNA merupakan komponen kecil dari subunit ribosom sel eukariotik. Pemilihan gen 18S rRNA dalam amplifikasi dengan PCR (Polymerase Chain Reaction) disebabkan perannya sebagai marka (marker) yang penting dalam penentuan filogeni suatu spesies acak (random target) dalam suatu biodiversitas eukariotik.

2.5.3 Filogenetik

Filogeni adalah sejarah keturunan sekelompok taksa seperti spesies dari nenek moyang mereka termasuk urutan percabangan. Istilah “filogeni” berasal dari kombinasi kata-kata Yunani. Phylon berarti “suku” atau “klan” atau “ras” dan genesis berarti “asal” atau “sumber”. Istilahnya juga bisa diterapkan pada silsilah gen yang berasal dari nenek moyang sama. Dalam filogeni molekuler, hubungan antara organisme atau gen dipelajari dengan membandingkan homolog urutan DNA atau protein. Perbedaan antara urutan menunjukkan genetik divergensi sebagai hasil evolusi molekuler selama perjalanan waktu. Singkatnya, sementara pendekatan filogenetik klasik bersandar pada morfologi karakteristik suatu organisme, pendekatan molekuler tergantung pada urutan nukleotida RNA dan DNA dan urutan asam amino protein yang ditentukan dengan menggunakan teknik modern, dengan membandingkan molekul homolog dari organisme yang berbeda,

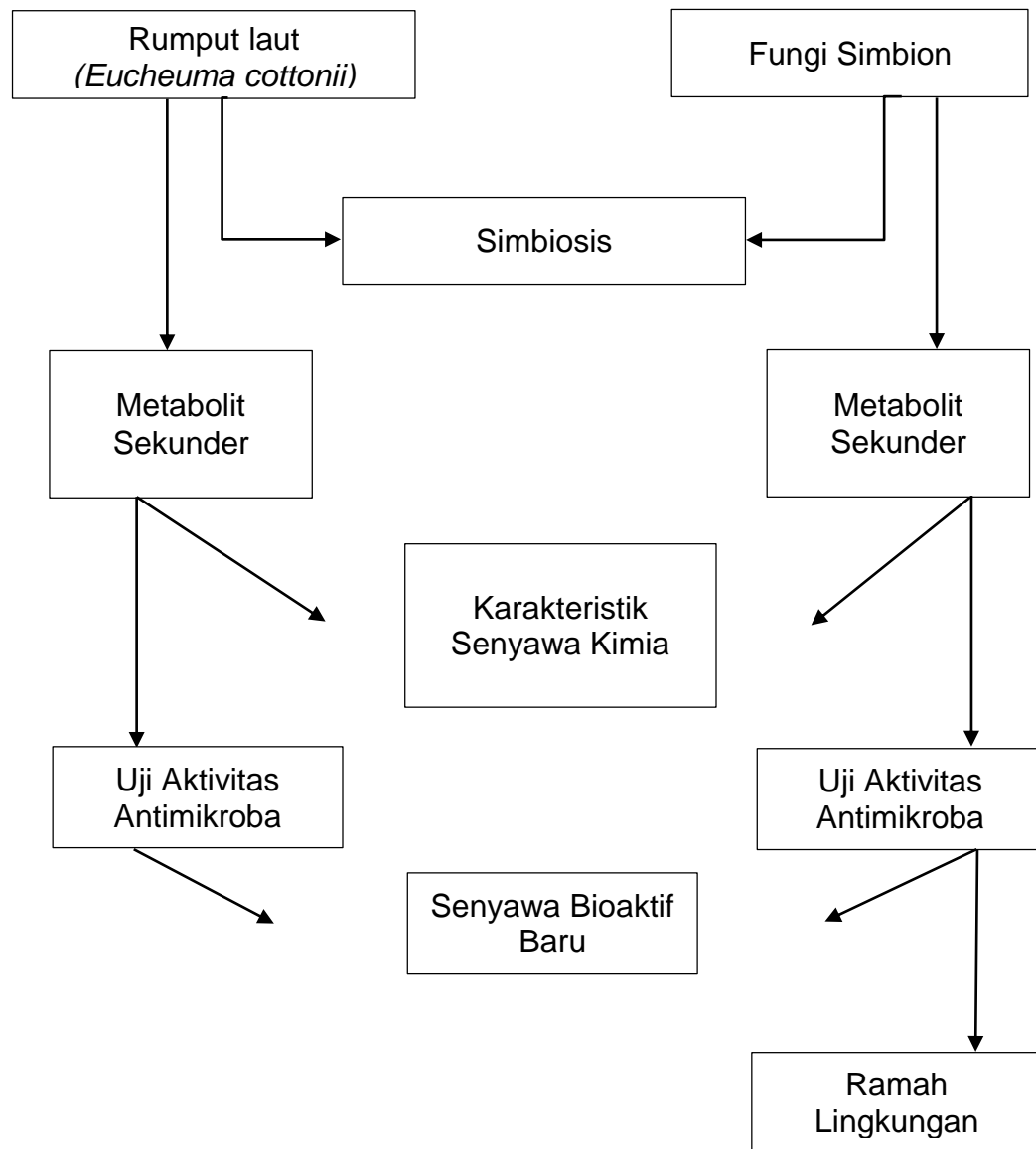
memungkinkan untuk menetapkan tingkat kesamaan merekasehingga dapat membangun atau mengungkapkan hierarki hubungan pohon filogenetik. Metode berbasis morfologi klasik dan berbasis analisis molekuler merupakan metode yang penting sebagai kerangka kerja bio- molekul dasar dari semua organisme adalah serupa dan morfologi suatu organisme sebenarnya manifestasi genom, proteom, dan profil transkriptomnya. Kombinasi dari metode ini dengan demikian memperkuat latihan penentuan hubungan filogenetik organismenya (Amit Roy, 2014).

2.6 Aktivitas Antimikroba

2.6.1 Kromatografi Lapis Tipis

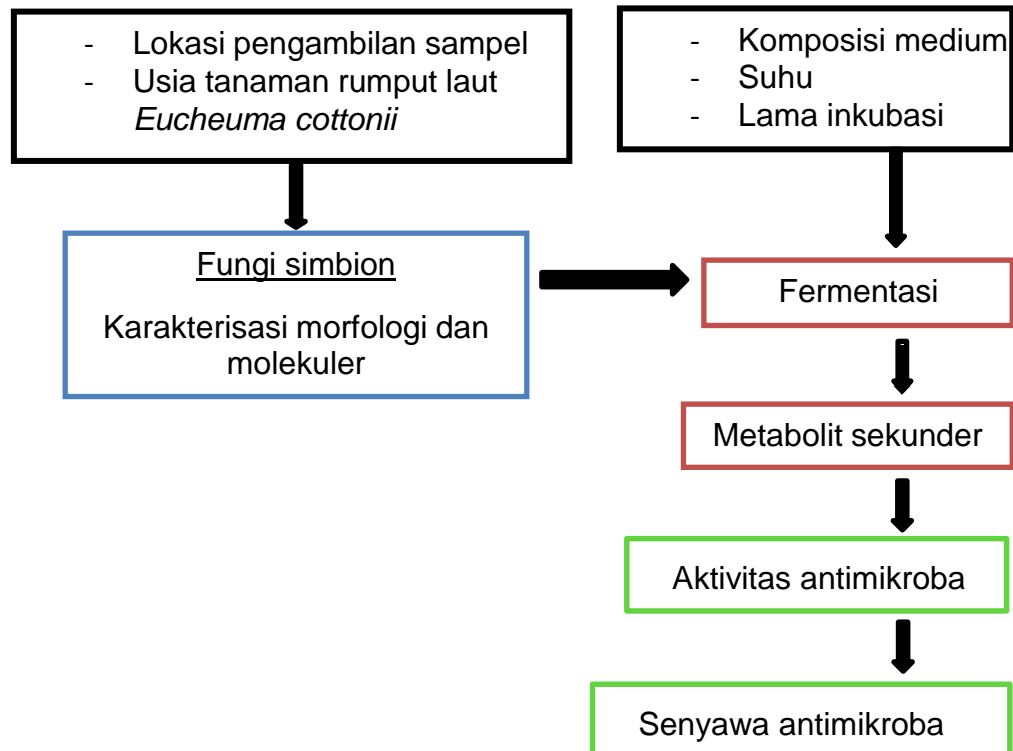
Kromatografi lapis tipis dikombinasikan dengan biologis dan metode deteksi kimia yang memiliki teknik efektif dan murah untuk mempelajari ekstrak tanaman (Masrton, 2011). Metode Kromatografi Lapis Tipis dapat memisahkan komponen-komponen berdasarkan perbedaan tingkat interaksi dalam dua fasa material pemisah. Kromatografi Lapis Tipis dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang terdapat dalam campuran secara kualitatif, yaitu dengan membandingkan Rf baku pembanding dengan Rf sampel. Selain itu, KLT merupakan teknik analisis yang sederhana, hemat biaya, mudah dilakukan, dan hanya dibutuhkan sedikit cuplikan sampel untuk analisisnya. Prinsip kerja KLT yaitu adsorpsi, desorpsi, dan elusi. Adsorpsi terjadi ketika larutan sampel ditotolkan ke fase diam (plat KLT) menggunakan pipa kapiler, komponen-komponen dalam sampel akan teradsorpsi di dalam fase diam. Desorpsi adalah peristiwa ketika komponen yang teradsorpsi di fase diam didesak oleh fase gerak (eluen), terjadi persaingan antara eluen dan komponen untuk berikatan dengan fase diam. Elusi adalah peristiwa ketika komponen ikut terbawa oleh eluen (Kamar *et al.*, 2021).

2.7 Kerangka Teori



Gambar 2. Kerangka teori

2.8 Kerangka konsep



Keterangan :

- : Variabel bebas
- : Variabel kendali
- : Variabel antara
- : Variabel terikat