

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR UREOLITIK DARI LUKISAN PRASEJARAH
ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**



**DONI
H041 20 1041**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

**DONI
H041 20 1041**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

DONI
H041 20 1041

Skripsi

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR UREOLITIK DARI LUKISAN
PRASEJARAH ASAL KAWASAN KARST MAROS-PANGKEP**

DONI

H041 20 1041

Skripsi,

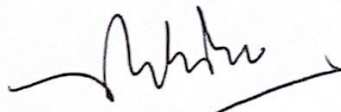
Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada "03 Juli 2024"
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada


Program Studi Biologi
Departemen Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

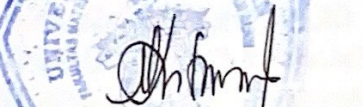
Pembimbing Utama,


Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si.
NIP. 196801291997022001

Pembimbing/Pertama,


Drs. As'adi Abdullah, M.Si.
NIP. 196203031989031007

Mengetahui:
Ketua Program Studi


Dr. Magdalena Litaay, M. Sc.
NIP. 196409291989032002



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul “Isolasi dan Identifikasi Jamur Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep” adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Dr. Nur Haedar, M.Si. sebagai Pembimbing Utama dan Drs. As’adi Abdullah, M.Si. sebagai Pembimbing Pertama). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

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

Makassar, 3 Juli 2024




Doni
H041 20 1041

UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan berkat dan rahmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian ini dan menyusun skripsi yang berjudul **Isolasi dan Identifikasi Jamur *Ureolitik* dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep**. Shalawat dan salam penulis haturkan kepada Rasulullah Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan kita sepanjang zaman. Skripsi ini bertujuan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan pendidikan dan memperoleh gelar Sarjana Sains di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Selain itu, skripsi ini juga diharapkan dapat memberikan manfaat bagi pembaca dan peneliti lain untuk menambah wawasan dalam bidang biologi khususnya mikrobiologi.

Proses penyelesaian skripsi ini merupakan suatu rangkaian perjuangan yang cukup panjang bagi penulis. Berbagai hambatan penulis alami dalam penyusunan skripsi ini. Berkat bantuan, dukungan dan bimbingan dari berbagai pihak sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada keluarga besar terkhusus kepada kedua orang tua terkasih Bapak Beddu dan Ibu Nuka serta saudara(i) penulis. Terima kasih atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun materil serta lantunan doa yang selalu dicurahkan kepada penulis. Semoga Allah SWT senantiasa memberikan kesehatan, keberkahan, nikmat iman, serta karunia di dunia maupun akhirat.

Penulis menyampaikan penghargaan setinggi-tingginya dan banyak terima kasih kepada Ibu Dr. Nur Haedar, M.Si. selaku pembimbing utama dan Bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si. selaku pembimbing pertama atas kesediannya yang telah meluangkan banyak waktu, tenaga dan pikiran dalam memberikan bimbingan dan motivasi kepada Penulis, mulai dari awal penyusunan sampai penyelesaian skripsi ini. Pada kesempatan ini pula, dengan segala kerendahan hati Penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Rektor Universitas Hasanuddin beserta jajarannya.
2. Bapak Dr. Eng Amiruddin, M.Sc. selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin beserta seluruh staf yang telah membantu penulis dalam hal akademik dan administrasi.
3. Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. selaku Ketua Departemen Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Penulis mengucapkan terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
4. Bapak Dr. Andi Ilham Latunra, M.Si. selaku Penasehat Akademik (PA) dan penguji yang senantiasa memberikan arahan, dukungan dan bimbingan dari awal masa studi hingga penyusunan skripsi ini.

5. Ibu Dr. Mustika Tuwo, S.Si., S.Pd., M.Sc. dan Ibu Andi Evi Erviani, S.Si., M.Sc. selaku dosen penguji, terima kasih atas segala arahan dan saran yang diberikan kepada Penulis demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya kepada Penulis, baik pada waktu perkuliahan maupun pada saat penelitian dan penyelesaian skripsi ini.
7. Kak Fuad Gani, S.Si, Kak Heriadi, S.Si., M.Si. Kak Nenis Sardiani, S.Si dan Kak Syafrian Nur Muhammad, S.Si yang telah banyak memberikan bantuan terhadap penelitian ini baik ilmu, bimbingan, kritik maupun saran yang sangat berguna bagi penulis.
8. Kak Nur Afifah Zhafirah, S.Si., M.Si, Kak Faisal, S.Si dan Kak Nur Husnul Khotimah, S.Si yang telah memberikan dukungan dan motivasi dalam proses penyusunan skripsi penulis.
9. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2020, terima kasih atas do'a, dukungan, bantuan dan kebersamaannya selama perkuliahan, terkhusus kepada Sarwan, Ahmad Nurfakhry Salim, Andi Alfhito Ardiansyah, Muhammad Rizal Udin, Dzulkifli, Annisa, Ainun Saputri, Anisa Iriani, Corezy Filadelfi A.S, Intan Ramadhani, Siti Rofiqoh Athiyyah, Siti Aulia Adila yang telah banyak membantu selama penelitian dan penyusunan skripsi.
10. Seluruh pihak yang telah membantu dan memberikan dukungan yang tidak dapat Penulis sebutkan satu persatu.

Penulis berharap semoga segala kebaikan yang diberikan dari berbagai pihak kepada penulis untuk menyelesaikan skripsi ini dapat bernilai ibadah di sisi Allah SWT. Akhir kata, penulis memohon maaf atas kesalahan yang disengaja maupun tidak disengaja dalam rangkaian penyusunan skripsi ini. Semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi pembaca.

Makassar,03 Juli 2024

Doni

ABSTRAK

DONI. Isolasi dan Identifikasi Jamur Ureolitik dari Lukisan Prasejarah Asal Kawasan Karst Maros-Pangkep (dibimbing oleh Nur Haedar dan As'adi Abdullah).

Latar Belakang. Jamur ureolitik merupakan jamur yang dapat menghidrolisis urea menjadi NH_3 dan H_2CO_3 . NH_3 memicu peningkatan pH yang berperan dalam pembentukan CaCO_3 . Terbentuknya CaCO_3 tersebut dapat menutupi lukisan prasejarah pada gua karst. **Tujuan.** Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan dan mengetahui jenis isolat jamur ureolitik asal kawasan Karst Maros-Pangkep. **Metode.** Penelitian dimulai dengan tahap isolasi jamur yang kemudian diseleksi menggunakan media Christensen Urea Agar. Hasil seleksi kemudian ditumbuhkan pada media SDB U/Ca untuk uji produktivitas isolat jamur ureolitik. Identifikasi jamur menggunakan marka molekuler gen 18S rRNA. **Hasil.** Diperoleh 12 isolat jamur positif ureolitik hasil swab dari gua Sumpang Bitu, gua Leang Timpuseng dan gua Leang Pettae. Hasil pengukuran peningkatan konsentrasi amonia diperoleh dua isolat yang memiliki kemampuan paling tinggi dalam menghasilkan amonia yaitu isolat LPE 2a sebesar 574,688 ppm dan isolat LTP 1b sebesar 404,564 ppm. **Kesimpulan.** Hasil identifikasi molekuler diperoleh isolat LPE 2a termasuk jenis *Xylaria feejeensis* strain 4-F25 dan isolat LTP 1b termasuk jenis *Schizophyllum commune*.

Kata kunci: karst, maros-pangkep, konsentrasi amonia, jamur ureolitik, biomassa sel, pH, urea

ABSTRACT

DONI. **Isolation and Identification of Ureolytic Fungi from Prehistoric Paintings from Maros-Pangkep Karst Area** (supervised by Nur Haedar and As'adi Abdullah)

Background. Ureolytic fungi are fungi that can hydrolyse urea into NH_3 and H_2CO_3 . NH_3 triggers an increase in pH which plays a role in the formation of CaCO_3 . The formation of CaCO_3 can cover prehistoric paintings in karst caves. **Aims.** This study aims to obtain and determine the type of isolates of ueolithic fungi from the Maros-Pangkep Karst area. **Methods.** The research began with the isolation stage of the fungus which was then selected using Christensen Urea Agar media. The selection results were then grown on SDB U/Ca media to test the productivity of ureolytic fungal isolates. identification of fungi using molecular markers of the 18S rRNA gene. **Results.** There were 12 positive ureolytic fungal isolates from Sumpang Bitu cave, Leang Timpuseng cave and Leang Pettae cave. The results of measuring the increase in ammonia concentration obtained two isolates that have the highest ability to produce ammonia, namely isolate LPE 2a at 574.688 ppm and isolate LTP 1b at 404.564 ppm. **Conclusion.** The results of molecular identification obtained isolate LPE 2a including *Xylaria feejeensis* strain 4-F25 and isolate LTP 1b including *Schizophyllum commune*.

Keywords: karst, maros-pangkep, ammonia concentration, ureolytic fungi, cell biomass, ph, urea

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGANTAR	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
LEMBAR PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vii
<i>ABSTRACT</i>	<i>viii</i>
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Tujuan	3
1.3 Manfaat	3
BAB II METODE PENELITIAN	4
2.1 Tempat dan Waktu	4
2.2 Alat dan Bahan	4
2.2.1 Alat	4
2.2.1 Bahan	4
2.3 Metode Kerja	4
2.3.1 Pengambilan Sampel	4
2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan	4
2.3.3 Pembuatan Media	5
2.3.4 Isolasi Jamur	5
2.3.5 Seleksi Jamur Ureolitik	5
2.3.6 Karakterisasi Jamur Ureolitik	5
2.3.7 Uji Produktivitas Jamur Ureolitik	6
2.3.8 Identifikasi Molekuler dan Analisis Filogenik Isolat Jamur Ureolitik Berbasis Gen 18S rRNA	6
2.4 Analisis Data	8

BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	9
3.1 Lokasi Pengambilan Sampel	9
3.2 Isolasi Jamur	10
3.3 Seleksi Jamur Ureolitik	10
3.4 Karakterisasi Jamur Ureolitik	12
3.4.1 Karakterisasi Makroskopis	12
3.4.2 Karakterisasi Mikroskopis	15
3.5 Uji Produktivitas Jamur Ureolitik	18
3.5.1 Uji Kadar Amonia	18
3.5.2 Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel Jamur	19
3.5.3 Pengukuran pH	20
3.6 Hasil Analisis Filogenik Isolat Jamur Ureolitik Berbasis Gen 18S rRNA	21
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	24
4.1 Kesimpulan	24
4.2 Saran.....	24
DAFTAR PUSTAKA	25
LAMPIRAN.....	31

DAFTAR TABEL

Nomor Urut	Halaman
1. Seleksi Jamur Ureolitik dari Kawasan Karst Maros-Pangkep	11
2. Pengamatan Makroskopis Morfologi Koloni Jamur Ureolitik.....	12
3. Hasil BLAST Isolat Jamur Ureolitik	22

DAFTAR GAMBAR

Nomor Urut	Halaman
1. Peta Pulau Sulawesi (a), Lokasi Pengambilan Sampel Jamur Ureolitik dari Lukisan Prasejarah asal Kawasan Karst Maros – Pangkep di Gua Sumpang Bitu, Gua Leang Timpuseng dan Gua Leang Pettae (b).....	9
2. Penampakan Lukisan yang Tertutupi Endapan Kapur.....	10
3. Penampakan Pertumbuhan Jamur Ureolitik pada Media Christensen Urea Agar	11
4. Pengamatan Morfologi Koloni Jamur Ureolitik pada Medium Malt Extract Agar, SPB (Sumpang Bitu), LPT (Leang Pettae) dan LTP (Leang Timpuseng).....	14
5. Pengamatan Morfologi Sel Jamur Ureolitik Menggunakan Mikroskop Perbesaran 400x, (A) Konidia, (B) Konidiofor, (C) Sel Hidup, (D) Sel Mati. SPB (Sumpang Bitu), LPT (Leang Pettae) dan LTP (Leang Timpuseng).	16
6. Hasil Uji Kadar Amonia Jamur Ureolitik.	18
7. Hasil Perhitungan Berat Biomassa Sel Jamur Ureolitik	19
8. Hasil Pengukuran Peningkatan pH Isolat Jamur Ureolitik.....	20
9. Hasil amplifikasi Gen 18S rRNA dengan Primer ITS1 dan ITS4 isolat LPE 2a dan LTP 1b pada 600 bp	22
10. Pohon Filogeni Isolat LPE 2a dan LTP 1b dengan Metode UPGMA	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Penelitian	31
2. Skema Kerja Pengambilan Sampel, Isolasi dan Seleksi Jamur Ureolitik.....	32
3. Skema Kerja Uji Produktivitas Jamur Ureolitik.....	33
4. Skema Kerja Pengukuran Pengukuran Kadar Amonia yang dihasilkan Jamur Ureolitik.....	34
5. Skema Kerja Isolasi DNA Jamur	35
6. Skema Kerja Amplifikasi ITS dengan PCR	36
7. Skema Kerja Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis	37
8. Tempat Pengambilan Sampel	38
9. Uji Produktivitas Jamur Ureolitik.....	39
10. Berat Kering Biomassa Sel Jamur Ureolitik	40
11. Hasil Perhitungan Uji Kadar Amonia	41
12. Hasil Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel Jamur Ureolitik	42
13. Hasil Pengukuran pH.....	42
14. Hasil Identifikasi Jenis Jamur Ureolitik Menggunakan Marka Molekuler	43
15. Foto Prosedur Penelitian	45

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Karst merupakan salah satu bentang alam paling menakjubkan di dunia yang tersusun atas batuan karbonat. Kawasan karst dinilai indah karena selain memiliki bentuk yang unik terdapat pula gua-gua/*endokarst* yang memiliki situs sejarah di dalamnya (Zhang et al. 2023). Karst berasal dari bahasa Jerman yang diturunkan dari bahasa Slovenia (*Kras*) yang berarti lahan gersang berbatu. Karst dapat diartikan sebagai kawasan yang dicirikan dengan adanya pelarutan pada batuan oleh air atau disebut proses karstifikasi. Bentang alam karst memiliki ciri fisik dengan keterdapat batugamping yang mengandung kalsium karbonat (CaCO_3) lebih dari 50% dengan kandungan batu gamping kalsit dan dolomit. Kawasan karst adalah kawasan yang berkembang akibat dominannya proses pelarutan dan ditandai dengan terbentuknya gua, terowongan, sumur, dan sungai bawah tanah (Gunn, 2004; Utama dan Anindya, 2023). Indonesia sendiri merupakan negara dengan bentang karst dengan perkiraan kawasan seluas 15,4 juta Ha, yang tersebar pada pulau-pulau besar seperti Jawa, Kalimantan dan Sulawesi. (Magetanapuung et al. 2023; Pranata et al. 2023; Rosari et al. 2017).

Salah satu kawasan karst yang paling menyita perhatian yaitu kawasan wisata karst Maros-Pangkep di Sulawesi Selatan. Maros-Pangkep termasuk salah satu daerah di Sulawesi Selatan yang memiliki kawasan karst yang menarik karena memiliki tipologi berbentuk menara sehingga mendapat sebutan "towerkarst" atau menara karst dan merupakan jenis karst yang sama dengan yang ada di Cina Selatan dan Vietnam. Kawasan karst ini terbentuk oleh proses iklim, tektonik dan litologi. Kawasan karst Maros-Pangkep tersusun oleh batuan karbonat Eosen-Miosen dari Formasi Tonasa (40 Juta hingga 15 juta tahun yang lalu). Secara astronomis terletak pada S 4°42'49"-5°06'42" dan E 119°55'13". Luas kawasan karst Maros-Pangkep secara keseluruhan adalah 43.750 ha. Selain dimanfaatkan sebagai bahan galian untuk bahan bangunan & bahan baku semen, dimanfaatkan nilai jasa lingkungannya seperti sumberdaya air, keanekaragaman hayati, keunikan bentang alam, obyek wisata alam, situs arkeologi, dan areal peribadatan (Ahmad & Hamzah, 2016; Magetanapuung et al. 2023).

Berdasarkan Keputusan Menteri Kehutanan Republik Indonesia Nomor tahun 2004, kawasan karst Maros-Pangkep ditetapkan sebagai Taman Nasional Bantimurung-Bulusaraung dan telah menjadi kawasan konservasi. Kawasan karst ini menjadi tempat tinggal manusia pada masa lampau, yang ditandai dengan ditemukannya artefak batu, sisa-sisa fauna, tembikar, rangka manusia serta lukisan atau gambar cadas seperti cap tangan, figur manusia dan fauna (Alif et al. 2023; Hakim et al. 2023). Gambar cadas (*rock art*) merupakan lukisan atau tanda yang sengaja dibuat oleh manusia dipermukaan batu. Secara umum gambar cadas dibuat pada suatu permukaan yang keras, seperti dinding gua, ceruk, tebing atau bongkahan besar. *Rock image*, *rock picture*, *rock marking*, *rock trace*, dan *rock glyph*, *rock art*, lukisan goa merupakan beberapa istilah yang sering digunakan

dalam penyebutan karya seni tertua tersebut. Menurut Sope dan Mahirta (2023), gambar cadas merupakan salah satu bukti bahwa manusia *Homo sapiens* telah memiliki kemampuan dalam berimajinasi yang diwujudkan dalam bentuk gambar pada dinding. Gambar-gambar tersebut mengandung informasi tentang kehidupan prasejarah, kepercayaan dan pengetahuan, serta cerminan budaya terhadap lingkungan.

Lukisan/gambar cadas yang dibuat dengan mineral dan zat organik cenderung mudah rusak, sehingga beberapa lukisan prasejarah telah hilang secara signifikan maupun secara perlahan-lahan karena pengelupasan yang diakibatkan oleh berbagai faktor antropogenik, alam/lingkungan dan mikroorganisme (Bayarri et al. 2023; Somba, 2011). Kerusakan antropogenik berupa aktifitas vandalisme seperti mencoret-coret lukisan. Kerusakan akibat faktor alam/lingkungan biasanya disebabkan karena faktor cuaca dan iklim yang berubah-ubah. Sedangkan, kerusakan lain yang umum terjadi karena pelapukan fisik (retak, pecah, dan lain-lain), proses inkristasi (pengendapan kapur), pelapukan biologis (pertumbuhan *algae*, *moss*, *lichen*) temperatur yang tinggi dan kelembaban yang tinggi (*highly moisture*). Tingginya kelembaban pada gua menjadi salah satu pemicu kerusakan lukisan akibat biodeteriorasi oleh mikroorganisme seperti jamur untuk tumbuh dan berkembang lebih cepat daripada biasanya (Mulyadi et al. 2016; Suhartono, 2012).

Kerusakan gambar cadas oleh jamur terbagi atas dua, yaitu kerusakan fisik dan kimia. Kerusakan fisik diakibatkan oleh pertumbuhan hifa di atas dan di bawah lapisan permukaan gambar cadas. Sedangkan kerusakan kimia karena adanya metabolit yang dihasilkan oleh jamur seperti produksi enzim yang berhubungan dengan proses pengendapan kalsium karbonat oleh jamur ureolitik. Jenis jamur tersebut menggunakan urea pada substrat sebagai sumber nutrisinya. Umumnya urea yang terdapat di dalam gua berasal dari kotoran hewan seperti kelelawar, mamalia atau hewan lain maupun hasil dekomposisi hewan yang sudah mati. Selain itu, sumber urea juga biasanya berasal dari aktivitas manusia. Jamur ureolitik adalah jamur yang mampu menghasilkan enzim urease. Enzim tersebut akan menghidrolisis urea menjadi amonia dan asam karbonat. Amonia hasil hidrolisis akan bereaksi dengan air sehingga membentuk ion amonium dan ion hidroksida. OH⁻ tersebut hadir dalam kondisi basa yang mampu memicu peningkatan pH. Ion karbonat akan bereaksi dengan ion kalsium yang ada pada substrat sehingga membentuk kalsium karbonat. Sehingga besar kontribusi jamur ureolitik pada pembentukan atau stabilitas dari CaCO₃ (Habibi et al. 2020; Mekonnen et al. 2021).

Selain itu, Jamur ureolitik juga berpotensi dalam bioremediasi, teknologi pengendapan kalsium karbonat yang dapat digunakan dalam industri konstruksi atau proteksi beton. Beberapa kelompok jamur ureolitik yang mampu menghasilkan endapan kapur diantaranya yaitu *Colletotrichum acutatum*, *Penicillium chrysogenum*, *Fusarium cerealis*, *Phoma herbarum*, *Mucor hiemali*, *Neurospora crassa*, *Penicillium chrysogenum*, *Pestalotiopsis* sp. dan *Myrothecium gramineum* (Akoijam et al. 2021; Carter et al. 2023; Li dan Gadd, 2017). Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai produktivitas jamur ureolitik dan hubungannya dengan kerusakan lukisan prasejarah pada dinding gua karst Maros-Pangkep.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat jamur ureolitik yang berasal dari lukisan dinding gua karst Maros-Pangkep.
2. Mengetahui produktivitas jamur ureolitik asal kawasan karst Maros-Pangkep.
3. Mengetahui jenis jamur ureolitik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua karst Maros-Pangkep.

1.3 Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk memperoleh isolat jamur ureolitik yang berasal dari lukisan dinding gua karst Maros-Pangkep.
2. Untuk mengetahui produktivitas jamur ureolitik asal kawasan karst Maros-Pangkep.
3. Untuk mengetahui jenis jamur ureolitik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua karst Maros-Pangkep.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Riset Biologi Terpadu, Departemen Biologi dan Laboratorium Penelitian dan Pengembangan Sains (LPPS) FMIPA, Universitas Hasanuddin. Makassar, pada bulan Desember 2023 - April 2024.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu gelas kimia, gelas ukur, cawan petri, erlenmeyer, tabung reaksi, objek *glass*, *cover glass*, batang pengaduk, batang L, batang V/U, tabung *eppendorff*, ose bulat, bunsen, spoit, tabung sentrifus, spatula, sendok tanduk, *cotton swab*, rak tabung, *cool box*, kamera, *magnetic stirrer*, timbangan analitik, spektrofotometer UV-Vis, mikroskop, *rotary shaker*, *oven*, *hot plate*, pH meter, *vortex*, inkubator, lemari pendingin, sentrifugasi, *laminar air flow*, autoklaf.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu sampel swab lukisan karst, medium Malt Extract Agar (MEA), medium Christensen Urea Agar (CUA), medium Sabauroud Dextrose Broth (SDB), NaCl, CaCl₂, *Lactophenol cotton blue*, *malachite green*, urea, *aquades*, *aluminium foil*, *cling wrap*, alkohol 70%, *tissue*, kapas, kertas label, kertas saring, *phenol red*, agar, peptone, dextrose, larutan GA buffer, larutan GB buffer, larutan GD buffer, larutan TE buffer, larutan TAE buffer 1x, larutan lysozyme, DNA *template*, agarosa, proteinase K, ddH₂O, kit ekstraksi tiangen, miselium, primer *forward ITS1* (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), primer reverse ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3').

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel penelitian diambil dari lokasi kawasan karst Maros-Pangkep, yaitu gua Sumpang Bitu, gua Leang Timpuseng, dan gua Leang Pettae. Sampel diambil menggunakan *cotton swab* pada bagian batu kawasan karst, lalu dimasukkan ke dalam larutan *pepton water* dan disimpan dalam *cool box*. Proses isolasi dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi dengan metode panas kering untuk alat-alat gelas seperti tabung reaksi, cawan petri, dan objek *glass* menggunakan oven dengan pada suhu 180°C selama 2 jam. Sterilisasi dengan metode panas kering menggunakan nyala api bunsen hingga panas membara untuk jarum ose. Sterilisasi dengan metode panas basah menggunakan autoklaf untuk medium dan akuades pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

2.3.3 Pembuatan Media

Medium malt extract agar (MEA). Ditimbang sebanyak 4,8 gr medium Malt Extract Agar, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 100 ml aquades. Selanjutnya dihomogenkan menggunakan *hot plate*. Seteleah homogen, media didiamkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah itu, mulut erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* untuk disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Medium christensen urea agar (CUA) (Akoijam et al. 2021). Ditimbang sebanyak 2,4 gr medium Christensen Urea Agar, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 95 ml aquades. Lalu dihomogenkan dengan dipanaskan di atas *hot plate*. Seteleah homogen, media didiamkan hingga mencapai suhu ruang. Setelah itu, mulut erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* untuk disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm. Ditambahkan 5 ml larutan urea 40% yang telah disterilisasi.

Medium sabauroud dextrose broth (SDB). Ditimbang sebanyak 2 gr medium Sabauroud Dextrose Broth, kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam 100 ml aquades. Medium dilarutkan menggunakan batang pengaduk dan kemudian mulut erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil*. Selanjutnya, disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

2.3.4 Isolasi Jamur

Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam larutan 9 ml NaCl fisiologi dan divortex. 1 swab sampel diinokulasikan secara merata ke permukaan cawan petri yang berisi medium Malt Extract Agar. Kemudian diinkubasi pada suhu 34°C selama 3x24 jam, lalu diamati pertumbuhan jamur dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh. Setiap koloni tunggal yang berbeda diinokulasikan pada medium yang sama hingga diperoleh isolat murni.

2.3.5 Seleksi Jamur Ureolitik (Akoijam et al. 2021; Zhao et al. 2022)

Sebanyak 1 swab isolat murni hasil isolasi ditumbuhkan pada medium Christensen Urea Agar dengan cara digores sinambung pada agar miring medium dan diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 34°C. Kandungan phenol red pada medium bertindak sebagai indikator warna dimana jamur ureolitik mampu menghidrolisis urea yang terkandung pada media menghasilkan amonia yang ditandai dengan perubahan warna medium dari kuning menjadi merah mudah.

2.3.6 Karakterisasi Jamur Ureolitik

Karakterisasi jamur ureolitik meliputi pengamatan morfologi koloni secara makroskopis, pengamatan morfologi sel secara mikroskopis.

Karakterisasi Makroskopis. Pengamatan makroskopis adalah identifikasi jamur berdasarkan sifat-sifat morfologi koloni, seperti warna koloni, bentuk koloni, bentuk tepi koloni dan warna balik koloni.

Karakterisasi Mikroskopis. Pengamatan morfologi sel secara mikroskopis dilakukan dengan pembuatan *slide culture* yang diamati dibawah mikroskop. *Slide culture* dibuat dengan mengambil isolat jamur menggunakan *swab* secara aseptik, kemudian diinokulasikan pada media MEA di atas gelas objek yang sebelumnya

media tersebut ditetaskan pada permukaan gelas objek hingga memadat. Disiapkan cawan petri berisi kertas saring steril yang dibasahi dengan air suling steril lalu dimasukan *slide culture* secara perlahan. Selanjutnya *slide culture* diinkubasi pada suhu 28°C selama 2x24 jam. Terakhir, *slide culture* jamur ditetesi dengan *lactophenol cotton blue* dan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x.

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan di bawah mikroskop untuk melihat konidia atau spora, miselium, bentuk konidia dan warna konidia, hifa (bersekat/tidak bersekat), alat tambahan dan konidiofor.

2.3.7 Uji Produktivitas Jamur Ureolitik

Uji produktivitas jamur ureolitik dilakukan dengan tujuan untuk melihat kemampuan jamur ureolitik dalam menghidrolisis urea menjadi karbonat secara spontan untuk membentuk amonia dan asam karbonat. Diinokulasikan 3 ml suspensi jamur (75% T) ke dalam 100 ml medium SDB U/Ca dan diinkubasi pada *shaker rotary* (150 rpm) pada suhu 30°C selama 14 hari. Pengujian dilakukan pada hari akhir inkubasi meliputi analisa kadar amonia, jumlah biomassa sel jamur dan pH.

Uji Kadar Amonia. Pengujian kadar amonia dilakukan untuk mengetahui produk hasil hidrolisis urease. Pengukuran dilakukan dengan menyaring kultur jamur menggunakan kertas saring. Di masukkan kedalam labu ukur 50 ml filtrat yang telah disaring sebanyak 1 ml, kemudian ditera dengan aquades hingga mencapai 50 ml. Diambil 5 ml dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi yang kemudian ditambah dengan larutan Na-fenol dan NaOCl masing-masing 0,5 ml. Selanjutnya divortex hingga homogen dan didiamkan selama 5 menit. Kadar amonia jamur diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang 640 nm. Konsentrasi amonia (x) dihitung dengan meregresikan nilai absorbansi (y) dan konstanta (a, b) dengan persamaan $y=ax+b$.

Berat Kering Biomassa Sel Jamur. Perhitungan berat biomassa sel jamur dilakukan untuk mengetahui jumlah pertumbuhan jamur ureolitik selama proses waktu inkubasi dalam menghidrolisis urea. Biomassa sel jamur diperoleh dengan cara disaring menggunakan kertas saring yang telah dikeringkan di dalam oven. Perhitungan berat biomassa sel dihitung dengan menggunakan rumus; $W_b = W_{ab} - W_a$, dimana (W_a) berat kertas saring, (W_b) berat biomassa sel jamur dan (W_{ab}) berat kertas saring + biomassa sel jamur.

pH. Pengukuran pH dilakukan pada hari akhir inkubasi. Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui isolat jamur yang memiliki nilai pH tertinggi berbanding lurus dengan jumlah kadar amonia serta biomassa sel yang di hasilkan isolat jamur. Pengukuran pH diukur menggunakan pH meter.

2.3.8 Identifikasi Molekuler dan Analisis Filogenik Isolat Jamur Ureolitik dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 18S rRNA

Isolasi DNA. Isolasi DNA dilakukan menggunakan Kit Ekstraksi Tiangen. Miselium sebanyak 0,3 g dikerik dari cawan petri menggunakan ose bulat dan dimasukkan ke dalam 1,5 ml tube mikrosentrifugasi, kemudian disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm lalu supernatan dibuang.

Dimasukkan 200 µl buffer GA dan ditambahkan 200 µl lysozyme ke dalam sampel, lalu divortex hingga *lysozyme* benar-benar larut. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, dilakukan pembalikan setiap 10 menit. Setelah itu, ditambahkan 20 µl proteinase K, kemudian divortex sampai proteinase K benar-benar larut. Kemudian dimasukkan 200 µl buffer GB dalam sampel kemudian dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*. Diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit untuk hasil yang homogen. Selama inkubasi dilakukan pembalikan setiap 3 menit. Setelah itu, ditambahkan 200 µl ethanol (96%-100%) kemudian divortex selama 15 detik agar tercampur rata.

Semua campuran dipindahkan ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Dibuang semua cairan dan ditempatkan *spin column* ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan 500 µl buffer GD ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, lalu dibuang semua cairan dan ditempatkan *spin column* CB3 ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan 600 µl buffer PW ke *spin column* CB3 dan disentrifugasi kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, buang semua cairan dan ditempatkan pada *spin column* CB3 ke dalam tabung pengumpul. Diulangi langkah tersebut, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit hingga membran kering sempurna. Kemudian *spin column* CB3 ditempatkan ke dalam tabung *ependorff* 1,5 ml yang baru dan pipet 50-200 µl buffer TE, diinkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 rpm. Supernatan yang tertampung pada tabung *ependorff* adalah ekstrak DNA.

Amplifikasi ITS dengan PCR. Amplifikasi ITS dilakukan dengan menggunakan campuran reaksi PCR volume 50 µl dan menggunakan primer universal ITS1 dan ITS4. Komponen campuran reaksi PCR meliputi 7 µl DNA *template*, 2,5 µl primer *forward*, 2,5 µl primer *reverse*, 13 µl ddH₂O, 25 µl PCR mix. Primer *forward* yang digunakan adalah ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'), sedangkan primer *reverse* yang digunakan adalah ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). Amplifikasi dilakukan dengan tahapan denaturasi awal selama 3 menit sebanyak satu siklus. Selanjutnya 35 siklus yang terdiri atas: denaturasi 94°C selama 1 menit, penempatan 56°C selama 2 menit dan pemanjangan 72°C selama 1 menit 30 detik. Kemudian diakhiri dengan tahap tiga sebanyak 1 siklus pada suhu 72°C selama 7 menit.

Elektroforesis DNA. Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,56 gr serbuk agarosa ke dalam 100 ml TAE buffer 1x di erlenmeyer, kemudian dipanaskan ke dalam microwave selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 µl Ethidium Bromida. Cairan gel didinginkan di suhu kamar. Setelah agak dingin, cairan gel dituang ke dalam gel elektroforesis dengan menggunakan sisir gel dengan jumlah sisir 17 sumur. Sebanyak 5 µl produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dalam tangki yang berisi TAE buffer. Kemudian, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV.

Sekuensing. Proses sekuensing produk PCR dilakukan menggunakan jasa sekuensing PT. Genetika Science Indonesia berdasarkan metode Sanger.

Analisis Sekuens DNA. Dengan menggunakan program MEGA-XI, hasil sekuensing diverifikasi, diubah, dan dihubungkan. Hasil verifikasi dan editing disejajarkan dengan BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> untuk mengidentifikasi spesies jamur terdekat.

2.4 Analisis Data

Analisis kuantitatif data hasil perhitungan uji produktivitas jamur ureolitik dalam menghidrolisis urea dilakukan dan disajikan dalam bentuk histogram. Sementara itu, hasil identifikasi isolat jamur dilakukan menggunakan program MEGA-XI untuk menunjukkan kekerabatan melalui analisis sekuensing berbasis gen 18S rRNA yang dibuat dalam pohon filogeni.