

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh DARI KEPULAUAN SELAYAR SEBAGAI PENGHASIL ANTIBAKTERI

ISOLATION and MOLECULAR IDENTIFICATION of SYMBIOTIC FUNGI from *Caulerpa racemosa* (FORSSKÅL) J. AGARDH From THE SELAYAR ISLANDS, AS AN ANTIBACTERIAL PRODUCER.



NUR FADLIANA

N012221035



PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION
***Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh DARI KEPULAUAN SELAYAR**
SEBAGAI PENGHASIL ANTIBAKTERI

NUR FADLIANA

N012221035



PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**ISOLATION and MOLECULAR IDENTIFICATION of SYMBIOTIC FUNGI from
Caulerpa racemosa (FORSSKÅL) J. AGARDH From THE SELAYAR
ISLANDS, AS AN ANTIBACTERIAL PRODUCER.**

NUR FADLIANA

N012221005



**MASTER OF PHARMACY STUDY PROGRAM
FACULTY OF PHARMACY
HASANUDDIN UNIVERSITY
MAKASSAR
2024**

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh DARI KEPULAUAN SELAYAR SEBAGAI PENGHASIL ANTIBAKTERI

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

NUR FADLIANA

N012221005

kepada

PROGRAM STUDI MAGISTER FARMASI

FAKULTAS FARMASI

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

LEMBAR PENGESAHAN TESIS

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh DARI KEPULAUAN SELAYAR SEBAGAI PENGHASIL ANTIBAKTERI

NUR FADLIANA
N012221035

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada tanggal 13 bulan November tahun 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada

Program Studi Magister Farmasi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Utama

Pembimbing Pendamping

Prof. Dr. Sartini M. Si, Apt
NIP. 19611111 198703 2 001

Abdul Rahim, S. Si, M. Si, Ph. D., Apt
NIP. 19771111 200812 1 001

Ketua Program Studi

Dekan Fakultas Farmasi

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



Prof. Dr. rer-nat. Marianti A. M. 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 *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh dari Kepulauan Selayar Sebagai Penghasil Antibakteri" adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing Prof. Dr. Sartini, M.Si., Apt. sebagai pembimbing utama dan Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. sebagai pembimbing pendamping. 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 Tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Journal of Research in Pharmacy sebagai artikel dengan judul "Isolation and Molecular Identification of Symbiotic Fungi from *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh from the Selayar Islands, Indonesia, as an Antibacterial Producer".

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



Makassar, 25 November 2024

Nur Fadliana

Nur Fadliana

NIM. N012221035

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada *Allah Subhanahu wa Ta'ala* atas berkat dan Rahmat-Nya penulis dapat menyelesaikan seluruh tesis ini sebagai salah satu syarat menyelesaikan studi dan memperoleh gelar magister di Program studi Magister Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Penyusunan tesis ini tentunya tidak lepas dari dukungan, bantuan, dan bimbingan berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan penuh rasa hormat dan terima kasih, saya ingin menyampaikan rasa Syukur dan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Sartini, M.Si.,Apt. selaku pembimbing utama yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta bantuan kepada penulis selama masa pelaksanaan penelitian serta penulisan tesis.
2. Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. Selaku pembimbing pendamping yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, saran, serta bantuan bagi penulis dalam melaksanakan penelitian dan masa studi kuliah.
3. Bapak prof Gemini Alam M.Si.,Apt, Ibu Dr.Herlina Rante, M.Si., Apt dan Bapak Muh. Akbar Bahar, S.Si.,M.Pharm.Sc.,Ph.D.,Apt. selaku komisi penguji yang telah memberikan kritik dan saran yang sangat membantu dalam perbaikan dan sempurnanya tesis ini.
4. Dekan, wakil dekan, para dosen, dan seluruh staf Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin yang telah memberikan dukungan, bimbingan, dan sarana yang telah diberikan sejak awal perjalanan kuliah hingga saat ini.
5. Kedua orang tua penulis yaitu bapak Muhfar H. dan ibu Darlia, serta seluruh keluarga penulis yang selalu memberikan dukungan, motivasi, dan kasih sayang sehingga penulis mampu untuk menyelesaikan penelitian dan tesis.
6. Tim peneliti Wulandari Yusuf, Nur Aisyah, dan Rieska yang selalu memberi dukungan kepada penulis.
7. Rekan-rekan angkatan magister tahun 2022 yang telah memberi dukungan, serta motivasi selama masa studi dan penelitian peneliti.
8. Seluruh laboran laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan Administrasi magister farmasi.
9. Keluarga besar Klinik Noeni Medika yang telah memberikan motivasi dan dukungannya selama saya menjalankan penelitian dan menyelesaikan tugas akhir saya.

Semoga Tuhan Yang Maha Esa membalas segala kebaikan dan bantuan yang telah diberikan oleh semua pihak. Semoga tesis ini bermanfaat bagi pembaca dan dapat menjadi sumbangsih dalam pengembangan ilmu pengetahuan.

Makassar

Nur Fadliana

ABSTRAK

NUR FADLIANA. **Isolasi dan Identifikasi Molekuler Fungi Simbion *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh dari Kepulauan Selayar Sebagai Penghasil Antibakteri** (dibimbing oleh Sartini dan Abdul Rahim).

Caulerpa racemosa merupakan kelompok makroalga hijau (*Chlorophyta*) yang berpotensi menghasilkan senyawa bioaktif yang dikenal sebagai agen antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengidentifikasi fungi yang bersimbiosis dengan *C. racemosa* dari perairan Kepulauan Selayar, Sulawesi selatan, Indonesia, sebagai penghasil antibakteri. Sebanyak 13 fungi berhasil diisolasi dengan kode FJM-0,1-1, FJM-0,1-3, FJM-0,1-4, FJM-0,2-1 - FJM-0,2-7, dan FJM-0,3-1, - FJM-0,3-3. Setiap isolat fungi dilakukan uji antagonis untuk memperoleh isolat aktif. Dari uji antagonis menggunakan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diperoleh isolat aktif FJM-0,2-2. Isolat aktif difermentasi selama 6 (enam) hari untuk menghasilkan metabolit sekunder. Setelah proses fermentasi selesai, media fermentasi dipisahkan dengan filtrasi kemudian supernatan diekstraksi menggunakan etil asetat menghasilkan ekstrak etil asetat dan ekstrak air, sedangkan biomassa diekstraksi dengan maserasi menggunakan metanol. Ekstrak etil asetat, air, dan metanol biomassa yang diperoleh dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik dibandingkan dengan ekstrak air dan metanol biomassa dengan aktivitas penghambatan terhadap bakteri *E. coli* (19.78 ± 0.62 mm) dan *S. aureus* (14.76 ± 0.77 mm). Penapisan senyawa antibiotik secara KLT bioautografi didapatkan zona hambat pada noda dengan RF:0,71 terhadap bakteri uji. Identifikasi lebih lanjut dilakukan menggunakan pereaksi penampakan bercak vanilin-asam sulfat menunjukkan bahwa noda yang terdeteksi adalah terpenoid. Identifikasi molekuler berdasarkan gen 18S rRNA dengan menggunakan primer ITS 1 dan ITS 4 ditemukan bahwa isolat FJM-0,2-2 termasuk dalam spesies *Penicillium citrinum* dengan nilai homologi 99.81%.

Kata Kunci: Fungi simbion, *Caulerpa racemosa*, Antibakteri, Identifikasi molekuler.

ABSTRACT

NUR FADLIANA. **Isolation and Molecular Identification of Symbiotic Fungi from *Caulerpa racemosa* (Forsskål) J. Agardh in the Selayar Archipelago as Antibacterial Producer.** (supervised by Sartini and Abdul Rahim).

Caulerpa racemosa is a green macroalga (*Chlorophyta*) with potential for producing bioactive compounds known as antibiotic agents. This study aims to isolate and identify fungi that symbiotically associate with *C. racemosa* from the waters of the Selayar Archipelago, South Sulawesi, Indonesia, as sources of antibacterial compounds. A total of 13 fungi were successfully isolated with the codes FJM-0.1-1, FJM-0.1-3, FJM-0.1-4, FJM-0.2-1 - FJM-0.2-7, and FJM-0.3-1 - FJM-0.3-3. Antagonistic tests were performed on each fungal isolate to identify the active isolates. The antagonistic tests using *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* identified the active isolate FJM-0.2-2. This active isolate was fermented for six days to produce secondary metabolites. After fermentation, the medium was separated by filtration, and the supernatant was extracted using ethyl acetate, resulting in ethyl acetate and aqueous extracts. In contrast, the biomass was extracted by maceration with methanol. The diffusion method tested the ethyl acetate, aqueous, and methanol extracts for antibacterial activity. The results indicated that the ethyl acetate extract exhibited better antibacterial activity compared to the aqueous extract and methanol biomass, with inhibition zones against *E. coli* (19.78 ± 0.62 mm) and *S. aureus* (14.76 ± 0.77 mm). Antibiotic compound screening by bioautography revealed an inhibition zone with an RF of 0.71 against the test bacteria. Further identification using the vanillin-sulfuric acid reagent showed that the detected spots were terpenoids. Molecular identification based on the 18S rRNA gene with ITS 1 and ITS 4 primers determined that isolate FJM-0,2-2 belongs to *Penicillium citrinum* with a homology value of 99.81%.

Keywords: Symbiotic fungi, *Caulerpa racemosa*, Antibacterial, Molecular identification.

DAFTAR ISI

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI MOLEKULER FUNGI SIMBION	i
TESIS	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iii
PRAKATA.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	ix
DAFTAR GAMBAR	x
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB II.....	4
METODOLOGI PENELITIAN.....	4
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian	4
3.2 Alat dan Bahan	4
3.3 Prosedur Kerja.....	5
1. Pengumpulan Sampel.....	5
2. Isolasi Fungi Simbion dari <i>Caulerpa racemosa</i>	5
3. Skrining Aktivitas Antibakteri	5
4. Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Waktu Optimum Fermentasi Isolat FJM-0,2-2	6
5. Fermentasi dan Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder dari Isolat FJM-0,2-2.	6
6. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Isolat FJM-0,2-2.....	7
7. Ekstraksi Tanaman <i>Caulerpa racemosa</i>	7
8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	7
9. KLT-Biautografi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Isolat FJM-0,2-2	8

10. Identifikasi Molekuler Polimerase Chain Reaction (PCR).....	8
BAB III.....	5
HASIL PENELITIAN.....	5
3.1 Isolasi Fungi Simbion <i>Caulerpa racemosa</i>	5
3.2 Skrining Aktivitas Antibakteri.....	13
3.3 Kurva Pertumbuhan dan Waktu Optimum Fermentasi Isolat FJM-0,2-2	14
3.5 Uji Aktivitas Antibakteri Isolat FJM-0,2-2.....	15
3.6 Profil Kromatografi Lapis Tipis	16
3.7 KLT-Bioautografi dan Identifikasi Senyawa metabolit sekunder Isolat FJM-0,2-2.	17
3.8 Identifikasi Molekuler	18
BAB IV	20
PEMBAHASAN	20
BAB IV	26
KESIMPULAN DAN SARAN	26
4.1 Kesimpulan	26
4.2 Saran	26

DAFTAR TABEL

1. Karakteristik morfologi isolat fungi simbion dari <i>C. racemosa</i>	12
2. Skrining aktivitas antibakteri isolat fungi simbion dari <i>C. racemosa</i>	13
3. Hasil ekstraksi isolat FJM-0,2-2 mrnghasilkan ekstrak etil asetat, ekstrak air dan ekstrak methanol biomassa.	15
4. Aktivitas antibakteri hasil fermentasi fungi simbion isolat FJM-0,2-2.....	15
5. Nilai Retencion Factor (RF) dari masing-masing ekstrak tanaman <i>C.racemosa</i> , ekstrak etil asetat isolat FJM-0,2-2 dan ekstrak air FJM-0,2-2.	16
6. Identifikasi golongan senyawa antibakteri isolat FJM-0,2-2.....	17
7. Hasil kuntifikasi DNA menggunakan Nanodrop	18

DAFTAR GAMBAR

1. Hasil isolasi fungi simbion <i>C. racemosa</i> pada media PDA.....	5
2. Isolat fungi simbion <i>C.racemosa</i> pada media PDA.....	12
3. Hasil uji antagonis isolat fungi simbion <i>C. racemosa</i> terhadap bakteri uji (A) <i>S. aureus</i> dan (B) <i>E. coli</i>	13
4. (A). Kurva pertumbuhan isolat FJM-0,2-2 dan (B) Pengaruh lama fermentasi isolat FJM-0,2-2 (hari) terhadap diameter zona hambat (mm)	14
5. Uji aktivitas isolat FJM-0,2-2 ekstrak etil asetat (EE), ekstrak air (EA), ekstrak metanol (ME), kontrol positif (<i>Chloramphenicol</i>) dan kontrol negatif (etil asetat).	15
6. profil senyawa kromatogram ekstrak etil asetat dari <i>C.racemosa</i> dan ekstra metabolit sekunder isolat FJM-0,2-2 menggunakan fase gerak Metanol:Air (5:1 v/v) pada TLC Silica gel gel 60 RP-18 F254 ^S	16
7. Hasil elektroforesis – produk amplifikasi (1) sampel, (M) DNA ladder dan (NTC) kontrol negatif.....	18
8. Hasil top 10 Hit BLAST terhadap NCBI.....	19
9. Pohon filogenetik isolat FJM-0,2-2 memiliki kemiripan yang tinggi terhadap <i>Penicillium citrinum</i>	19

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang menginvasi tubuh dan mengakibatkan efek berbahaya pada jaringan tubuh serta dapat menyebabkan kematian (Weston, 2022). Penyakit infeksi dapat diobati dengan menggunakan serangkaian bahan kimia yang dikenal sebagai antibiotik yang dapat menghambat atau membunuh bakteri patogen, namun penggunaan antibiotik yang meluas dan berlebihan menyebabkan terjadinya resistensi (Michael *et al.*, 2014). Resistensi antibiotik telah mendorong berbagai penelitian untuk mengeksplorasi dan menemukan senyawa bioaktif baru. Penemuan senyawa bioaktif baru telah banyak dilakukan terhadap berbagai sumber di alam, salah satunya adalah biota laut *Caulerpa racemosa* (Sari *et al.*, 2021).

C. racemosa adalah makroalga hijau yang menjadi salah satu penghasil senyawa bioaktif alami seperti senyawa tanin, flavonoid, saponin, fitosterol, terpenoid, fenolik, alkaloid, dan steroid (Palaniyappan *et al.*, 2023). Beberapa penelitian lain juga melaporkan penemuan senyawa alkaloid bisindole baru yaitu caulerclorin dan caulerprenylols A & B yang diisolasi dari *C. racemosa* menunjukkan aktivitas antimikroba (Yang *et al.*, 2015). Selain itu, terdapat juga senyawa terpenoid yang teridentifikasi seperti squalene, carvacrol, dan β -cymene, merupakan metabolit sekunder lain yang terlibat dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Belkacemi *et al.*, 2020). Berdasarkan penemuan senyawa bioaktif yang cukup melimpah dari *C. racemosa* sehingga biota laut ini dapat dimanfaatkan dalam industri farmasi sebagai bahan baku obat (Palaniyappan *et al.*, 2023). Tetapi hal ini tidak dapat dilakukan secara maksimal karena membutuhkan ekstrak *C. racemosa* yang cukup besar sedangkan ketersediaan *C. racemosa* di alam cukup terbatas disebabkan pertumbuhan *C. racemosa* sangat dipengaruhi oleh musim, letak geografis dan kondisi lingkungan seperti suhu, sedimentasi, dan salinitasi (Belkacemi *et al.*, 2020). Salah satu solusi dalam

menangani masalah ini adalah penemuan senyawa bioaktif baru yang juga dapat diperoleh dari mikroorganisme simbiosis (Sari *et al.*, 2021).

Mikroorganisme simbiosis biasanya terdiri dari bakteri atau fungi tetapi mikroba simbiosis yang paling sering dijumpai pada biota laut adalah fungi simbiosis yaitu sekitar 1.500 spesies fungi simbiosis telah berhasil diidentifikasi dan sebagian besar berasal dari biota laut yang hidup di ekosistem pesisir (El-rahman *et al.*, 2020). Fungi simbiosis berasosiasi dengan organisme laut dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang memiliki kemiripan struktur dengan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh inangnya (Proksch.,2002). Hal ini disebabkan karena produsen atau penghasil utama dari biosintesis metabolit sekunder yang diisolasi dari inang laut berasal dari mikroorganisme simbiosisnya (El-rahman *et al.*, 2020). Oleh karena itu, mikroorganisme simbiosis terutama fungi simbiosis berpotensi sebagai sumber penemuan senyawa bioaktif baru dan lebih efektif dibandingkan dengan pemanfaatan ekstrak kasar biota laut *C. racemosa* yang jumlahnya terbatas sedangkan mikroba simbiosis mudah dikulturkan di laboratorium sehingga dapat menghindari penggunaan bahan alam yang berlebihan (Sari *et al.*, 2021).

Penemuan mikroba simbiosis yang berhasil diisolasi dari *C. racemosa* yang hidup diperairan pulau Lemukutan telah dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Sari *et al.*, 2021). Perbedaan lingkungan tempat hidup biota laut dapat mempengaruhi strain mikroba yang bersimbiosis dengannya karena seleksi mikroba yang bersimbiosis dengan biota laut dapat dipengaruhi oleh kandungan nutrisi, letak geografis dan kondisi lingkungan seperti suhu, salinitas dan pH (Wefky & Hassan, 2015). Oleh karena itu, eksplorasi fungi simbiosis yang berasosiasi dengan *C. racemosa* harus terus dilakukan.

Kabupaten kepulauan Selayar merupakan wilayah Indonesia timur yang mempunyai kawasan atol terbesar ketiga di dunia sehingga perairan laut kepulauan Selayar memiliki biota laut yang cukup melimpah dan telah ditemukan sekitar 797 jenis biota laut yang terdiri dari 237 jenis terumbu karang, 10 jenis lamun, 47 jenis alga termasuk *C. racemosa* (Sani & Suni,

2019). Dengan kondisi seperti ini, memungkinkan *C. racemosa* yang hidup kaya akan berbagai senyawa bioaktif yang potensial dan juga memiliki keanekaragaman fungi simbion yang berbeda dari wilayah lain. Berdasarkan informasi diatas dilakukan isolasi dan identifikasi molekular fungi simbion dari *C. racemosa* yang diperoleh dari Kabupaten kepulauan Selayar sebagai penghasil senyawa antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah fungi simbion yang diisolasi dari *Caulerpa racemosa* dapat menghasilkan senyawa antibakteri?
2. Bagaimana Identifikasi molekuler isolat fungi simbion dari *Caulerpa racemosa* sebagai penghasil antibakteri?
3. Golongan senyawa apakah yang diperoleh dari hasil fermentasi isolat fungi simbion *Caulerpa racemosa* yang bersifat sebagai antibakteri?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Memperoleh isolat fungi simbion dari *Caulerpa racemosa* yang dapat menghasilkan senyawa antibakteri.
2. Mendapatkan karakteristik molekuler isolat fungi simbion dari *Caulerpa racemosa* sebagai penghasil antibakteri.
3. Mengidentifikasi senyawa yang diperoleh dari hasil fermentasi isolat fungi simbion *Caulerpa racemosa* yang bersifat sebagai antibakteri.

1.4 Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah koleksi isolat fungi simbion *Caulerpa racemosa* dari Kepulauan Selayar, sebagai penghasil senyawa antibakteri.

BAB II

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Oktober 2023 - Juli 2024 di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Fitokomia Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin Makassar.

3.2 Alat dan Bahan

1. Alat

Adapun alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: autoklaf (Mammert SN30), BSC, lemari asam (LPI), Oven (Mammert UN55), Inkubator shaker (IKA HS 501), sentrifugasi (Joan Lab), Ultrasonic cleanser (BK-2000), *rotary evaporator* (Heidolph G3), Penagas air (Mammert), timbangan digital, kompor listrik, lampu UV 254 nm dan 366 nm, cawan petri (Pyrex), cawan porselin (Pyrex), corong pisah (Pyrex), chamber, desikator, gelas kimia (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), erlenmeyer (Pyrex), mikropipet (Dragon Lab), plat silika gel 60 RP-18 F₂₄₅^S, plat silika gel 60 F₂₅₄.

2. Bahan

Adapun bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Caulerpa racemosa*, air laut steril, aquadest, asam sulfat 10% (H₂SO₄), aluminium klorida (AlCl₃), alkohol 70%, *chloramphenicol*, dragendrof, etil asetat, feri klorida (FeCl₃), n-heksan, methanol, media Muller Hinton Agar (MHA), media Potato Dextrose Agar (PDA), media Nutrien Agar (NA), media Potato Dextrose Broth (PDB) dan ekstrak yeast, kit Quik-DNA Magbead plus kit, kit May Tag Hs Red Mix 2x, mikroba uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*)

Prosedur Kerja

1. Pengumpulan Sampel

Caulerpa racemosa dikumpulkan dari wilayah pesisir pulau Jampea, Kabupaten Kepulauan Selayar, Provinsi Sulawesi selatan, Indonesia (-7°5'10.392"S, 120°46'59.502"E). Sampel *C. racemosa* yang telah dikumpulkan dimasukkan ke dalam kantong plastik yang berisi air laut dan

kemudian disimpan dalam cool box dan selanjutnya dibawa ke laboratorium untuk dianalisis (Sari *et al.*, 2021).

2. Isolasi Fungi Simbion dari *Caulerpa racemosa*

Sampel dicuci dengan air mengalir lalu dicuci kembali dengan air laut steril untuk memisahkan zat pengotor yang menempel pada permukaan *C. racemosa*. Kemudian sampel ditimbang sebanyak 10 gram dan dihaluskan. Selanjutnya dilakukan pengenceran secara berseri (10^{-1} , 10^{-2} , dan 10^{-3}) dengan menggunakan air laut steril (Sari *et al.*, 2021). Kemudian diambil 1 mL alikuot dari masing-masing pengenceran dan diinokulasi ke dalam medium PDA yang dilarutkan dengan air laut yang ditambahkan dengan *chloramphenicol* untuk menekan pertumbuhan bakteri. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 25-27 °C selama 14 hari (Natsir *et al.*, 2014). Setiap isolat fungi yang tumbuh pada cawan petri akan dipisahkan menurut bentuk dan warna hifa kemudian dipindahkan ke media baru dan diinkubasi pada suhu 25-27 °C selama satu minggu untuk tujuan pemurnian dan identifikasi. Kultur stok dari isolat fungi yang telah dimurnikan disubkulturkan pada media PDA dan disimpan dalam lemari pendingin untuk digunakan selanjutnya (El-rahman *et al.*, 2020).

3. Skrining Aktivitas Antibakteri

Dilakukan skrining uji aktivitas antibakteri dengan uji antagonis dengan metode blok agar menggunakan bakteri uji yang diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UNHAS diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Media agar isolat fungi simbion yang telah diinkubasi selama 5 hari dipotong menggunakan perforator media menjadi potongan kecil, kemudian diletakkan pada media MHA yang mengandung bakteri uji. Kemudian diamati zona bening yang terbentuk di sekitar blok agar setelah masa inkubasi selama 1x24 jam pada suhu 25 °C dan dianggap sebagai isolat aktif (Rante *et al.*, 2022).

4. Penentuan Kurva Pertumbuhan dan Waktu Optimum Fermentasi Isolat FJM-0,2-2

Dibuat 10 ml media PDB + ekstrak yeast dalam masing-masing 6 erlemeyer 50 ml yang telah diberi label hari. Selanjutnya diinokulasi 1 ml

starter fungi simbiosis isolat FJM-0,2-2 ke dalam masing-masing erlemeyer dan diinkubasi pada inkubator shaker dengan kecepatan 150 rpm. Selanjutnya diambil setiap erlemeyer sesuai label hari yang telah ditentukan, kemudian dipisahkan antara biomassa dan supernatan dengan cara disaring menggunakan kertas saring. Biomassa dikeringkan pada suhu 40 °C selama 30 menit kemudian ditimbang hingga diperoleh berat konstan untuk kemudian dibuatkan kurva pertumbuhan isolat fungi berdasarkan biomassa (Rusmalina *et al.*, 2024). Selain itu, penentuan lama fermentasi juga didasarkan pada hasil uji aktivitas cairan fermentasi yang disampling setiap hari selama 14 hari terhadap bakteri uji (Rante *et al.*, 2022).

5. Fermentasi dan Ekstraksi Senyawa Metabolit Sekunder dari Isolat FJM-0,2-2.

Isolat aktif yang diperoleh dari uji antagonis dibuat prekultuur pada labu erlemeyer 250 ml yang mengandung 100 ml media cair PDY dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 3x24 jam. Prekultuur (starter) dipindahkan sebanyak 10% ke dalam erlemeyer 500 ml yang mengandung 200 ml medium yang sama. Selanjutnya fermentasi dilakukan pada suhu ruangan selama 6 hari pada kondisi tergojok dengan kecepatan 150 rpm. Setelah cukup masa fermentasi, media fermentasi cair fungi disonikasi untuk memecah dinding sel fungi sehingga senyawa antibakteri intraselulernya bisa keluar. Setelah disonikasi selanjutnya media fermentasi disaring untuk memisahkan biomassa dan cairan fermentasi. Cairan fermentasi diekstraksi tiga kali dengan pelarut etil asetat (1:1 v/v) dalam corong pisah selama 20 menit. Sedangkan biomassa diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut metanol. Ekstrak yang diperoleh diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga dihasilkan ekstrak kental yang kemudian disimpan pada desikator untuk digunakan pada pengujian selanjutnya (Natsir *et al.*, 2014).

6. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Isolat FJM-0,2-2

Ekstrak etil asetat, ekstrak air, dan ekstrak biomassa yang diperoleh dibuat konsentrasi 10% (2 mg/20 μ l) dan dilakukan uji aktivitas antimikrobanya menggunakan metode difusi agar. Sebanyak 20 μ l dari

setiap ekstrak diteteskan pada kertas cakram diameter 6 mm. Setelah pelarut menguap, masing-masing kertas cakram diletakkan dipermukaan medium NA yang telah diinokulasi bakteri uji pada cawan terpisah untuk masing-masing bakteri uji. Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi diukur diameternya (Boluiiri,2016).

7. Ekstraksi Tanaman *Caulerpa racemosa*

Sampel *C. racemosa* yang telah dikeringkan ditimbang sebanyak 250 gr dan dipotong kecil-kecil, kemudian dimasukkan ke dalam wadah kaca dan dimaserasi menggunakan pelarut etil asetat hingga seluruh bagian *C. racemosa* terendam. Maserasi dilakukan selama 3 hari dengan pegadukan setiap hari. Setiap 3 hari filtrat disaring dari ampas dan dimaserasi kembali dengan pelarut etil asetat, proses maserasi diulang sebanyak 3 kali. Hasil maserasi yang diperoleh dari ketiga maserasi tersebut digabungkan dan pelarut diuapkan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental yang akan digunakan pada pengujian selanjutnya (Hainil *et al.*, 2023).

8. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pada pengujian ini digunakan plat silika gel 60 RP-18₂₅₄^s sebagai fase diam dan fase gerak digunakan eluen metanol:air (5 :1 v/v). Lempeng KLT yang akan digunakan diaktifkan terlebih dahulu dengan cara dipanaskan pada suhu 110 °C selama 30 menit. Masing-masing ekstrak tanaman, ekstrak etil asetat dan ekstrak air FJM-0,2-2 ditotolkan pada lempeng dengan jarak 1 cm dari tepi bawah plat KLT dengan menggunakan pipa kapiler, dibiarkan beberapa menit hingga kering lalu dimasukkan ke dalam chamber yang sudah jenuh dengan cairan pengelusi. Kemudian lempeng KLT dikeluarkan dan diamati dibawah lampu UV 254 dan 366 nm. Selanjutnya dilakukan penyemprotan dengan H₂SO₄ 10% dan lempeng KLT dipanaskan pada suhu 100-120 °C untuk memvisualisasikan senyawa organik yang tidak tampak dibawah lampu UV 254 dan 366 nm (Wagner,1996).

9. KLT-Biautografi dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Isolat FJM-0,2-2

a. KLT-Biautografi

Pada pengujian ini dilakukan KLT-biautografi kontak langsung untuk identifikasi senyawa antibakteri ekstrak etil asetat FJM-0,2-2. Digunakan pelat silika gel 60 F₂₅₄ dengan eluen n-heksan: etil asetat (4:1). Pelat yang digunakan dijenuhkan terlebih dahulu pada suhu 110 °C selama 30 menit. Kemudian ekstrak etil asetat isolat FJM-0,2-2 ditotolkan pada pelat dan dielusi. Setelah dielusi pelat diletakkan diatas media MHA yang telah diinokulasikan bakteri uji dan disimpan dalam kulkas selama 2 jam untuk memungkinkan proses difusi terjadi. Selanjutnya pelat diangkat dari media MHA diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam dan diamati zona bening yang terbentuk (Widayanti & Widjajanti, 2018)

b. Identifikasi senyawa metabolit sekunder

Pada pengujian ini disiapkan 4 pelat silika gel 60 F₂₅₄ dengan Panjang 7 cm dan lebar 1 cm. Masing-masing pelat ditotolkan ekstrak etil asetat isolat FJM-0,2-2 dan dielusi. Setelah dielusi keempat pelat disemprot dengan reagen tertentu. Pelat pertama disemprot dengan reagen dragendroff untuk identifikasi alkaloid. Pelat kedua disemprot dengan vanillin-asam sulfat untuk identifikasi senyawa terpenoid, lempeng ketiga disemprot dengan aluminium klorida untuk identifikasi flavonoid dan lempeng keempat disemprot dengan feri klorida untuk deteksi tannin (Rusmalina *et al.*, 2024) ;(Wagner,1996).

10. Identifikasi Molekuler Polimerase Chain Reaction (PCR)

a. Ekstraksi DNA

Ekstraksi DNA menggunakan kit Quick-DNA Magbead Plus Kit. Dimana sampel fungi sambilan FJM-0,2-2 diambil dan dihomogenkan dalam buffer lisis sesuai petunjuk kit yang digunakan. Selanjutnya tambahkan buffer lisis yang disediakan dalam kit ke dalam sampel yang telah dihomogenkan. Buffer ini berfungsi untuk membantu memecah dinding sel dan melepaskan DNA ke dalam larutan. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu kamar untuk waktu yang ditentukan berdasarkan petunjuk Kit. Kemudian tambahkan beads magnetik yang disediakan dalam kit ke dalam larutan lisis. Beads ini berfungsi untuk mengikat DNA

sehingga memudahkan pemisahan DNA dari komponen lain. Aduk atau vorteks untuk memastikan beads terdistribusi merata, letakkan tabung ekstraksi di rak magnetik yang disediakan. Beads magnetik tertarik ke dinding tabung, sedangkan larutan yang mengandung DNA berada diluar area magnetik. Buang larutan yang tidak mengandung DNA (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Selanjutnya lakukan pencucian DNA dengan menambahkan buffer pencuci (alkohol) kedalam tabung untuk membersihkan beads dari kontaminan yang mungkin ada dan cuci beberapakali sesuai petunjuk kit. Tambahkan buffer elusi yang disediakan dalam kit ke beads magnetik untuk mengeluarkan DNA dari beads dan pindahkan larutan DNA ke tabung baru. Setelah DNA terisolasi diperiksa kualitas DNA menggunakan nanodrop untuk mengetahui ada tidaknya kontaminan (Stackebrandt & Goebel, 1994).

b. Amplifikasi Gen 18S rRNA

Amplifikasi bertujuan untuk memperbanyak gen ITS (Internal Transcribed Spacer) rDNA. Amplifikasi pada sampel DNA hasil isolat menggunakan primer ITS 1 (forward) dan primer ITS 4 (reverse) dengan urutan basa ITS1: 5'- TCC GTA GGT GAA CCT GCGG-3' dan ITS4: 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TATGC-3'. Adapun Komposisi larutan untuk PCR master mix yaitu terdiri atas 12,5 μ l My Taq HS Red Mix (2x), 1 μ l primer ITS1 10 μ M, 1 μ l primer ITS4 10 μ M, 25 μ l dd H₂O dan 10 μ l DNA template setiap larutan dihomogenisasi hingga tercampur rata. Untuk mengamplifikasi daerah ITS rDNA proses PCR dilakukan dengan kondisi tiap siklus yaitu tahap predenaturasi pada suhu 95 °C selama 1 menit, denaturasi pada suhu 95 °C selama 10 menit, annealing pada suhu 52 °C selama 15 menit, DNA ekstensi pada 72 °C selama 15 menit untuk total 35 siklus dan langkah ekstensi akhir pada 4 °C selama 5 menit (Kumari *et al.*, 2021).,(Stackebrandt & Goebel, 1994).

c. Elektroforesis Gel Agarosa

Adapun produk amplifikasi di visualisasi pada gel agarosa 0.8%. Adapun pembuatan gel agarosa dilakukan dengan menimbang gel

agarosa sebanyak 0.8 gram dimasukkan dalam beaker gelas dan ditambahkan 100 mL buffer TBE (Tris-Borate-EDTA). Selanjutnya panaskan campuran agarosa dan buffer pada hot plate, aduk sesekali dan hati-hati untuk mencegah agarosa mendidih. Tuang larutan agarosa yang telah larut ke dalam gel casting tray yang telah dipasang dengan gel comb diposisi yang benar dan biarkan gel agarosa mengeras pada suhu kamar. Setelah gel mengeras, lempaskan comb dengan hati-hati untuk membuka sumur (Stackebrandt & Goebel, 1994).

Selanjutnya tempatkan gel dalam ruang elektroforesis dan isi ruang dengan buffer TBE hingga menutupi gel sepenuhnya. Selanjutnya gunakan mikropipet untuk memuat sampel yang telah dicampurkan loading buffer ke dalam sumur dengan hati-hati agar tidak melampaui batas sumur. Sambungkan elektroda ke sumber listrik dengan tegangan 80 volt dan biarkan elektroforesis berjalan hingga loading buffer mencapai ujung gel. Setelah elektroforesis selesai matikan sumber listrik dan angkat gel dari ruangan elektroferesis dan lakukan visualisasi gel dibawah UV transilluminator dan diamati pita-pita DNA yang tampak pada gel (Stackebrandt & Goebel, 1994).

d. Analisis Filogenik

Adapun data hasil sekuensing gen ITS rDNA isolat FJM-0,2-2 dianalisis menggunakan BLAST (Basic Local Alingment Search Tool) pada NCBI dengan menggunakan program MEGA 6.0 (*Free Charge*). Pohon filogenik dikonstruksi dengan membandingkan sekuen gen yang diperoleh dari Genbank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) dengan algoritme Neighbour Joining (*Tamura et al.2013*).