

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP**

NUR HUSNUL KHOTIMAH

H041 19 1016



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

2023

**ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP**

SKRIPSI

*Diajukan sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin*



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

2023

LEMBAR PENGESAHAN

ISOLASI DAN IDENTIFIKASI JAMUR KARBONOKLASTIK
PENYEBAB KERUSAKAN LUKISAN PRASEJARAH DI KAWASAN
KARST MAROS-PANGKEP

Disusun dan diajukan oleh:

NUR HUSNUL KHOTIMAH

H041191016

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Sarjana Studi Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu
Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin
pada tanggal 04 April 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama



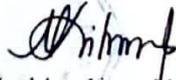
Dr. Nur Haedar, S.Sr., M.Si
NIP. 196801291997022001

Pembimbing Pertama



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

Ketua Program Studi,



Dr. Magdalena Litaay, M.Sc
NIP. 196409291989032002

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini;

Nama : Nur Husnul Khotimah
NIM : H041191016
Program Studi : Biologi
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul:

Isolasi dan Identifikasi Jamur Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan
Prasejarah di Kawasan Karst Maros-Pangkep

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut

Makassar, 04 April 2023

Yang menyatakan



Nur Husnul Khotimah

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim,

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah rabbil 'alamiin, segala puji dan syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan nikmat rahmat, karunia dan hidayah-Nya sehingga penulis akhirnya dapat menyelesaikan penulisan skripsi yang berjudul “**Isolasi dan Identifikasi Jamur Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan Prasejarah di Kawasan Karst Maros-Pangkep**”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat dalam menyelesaikan program Pendidikan sarjana (S1) di Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar. Tak lupa pula penulis kirimkan shalawat dan salam kepada Nabi Muhammad Shallallahu ‘alaihi wa sallam beserta keluarga, sahabat dan sahabat yang senantiasa menjadi uswatun hasanah sehingga bisa tetap berada di jalan-Nya.

Selama proses perwujudan skripsi ini tidak terlepas dari dukungan, motivasi dan do’a dari berbagai pihak sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan sebaik-baiknya. Pada kesempatan ini, saya ingin menyampaikan terima kasih tak terhingga kepada orang tua tercinta Bapak Huzaini dan Ibu Sitti Rahmah serta saudari-saudari atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis baik moril maupun material serta do’a yang selalu dihantarkan dalam sujud. Terima kasih karena telah menjadi sahabat berbagi suka maupun duka dan menjadi motivator terkuat serta alasan utama penulis untuk menyelesaikan skripsi ini, semoga ini dapat menjadi salah satu kado terindah dari penulis untuk keluarga

Terima kasih sebesar-besarnya kepada Ibu Dr. Nur Haedar, S.Si., M.Si. selaku pembimbing utama atas waktu, bimbingan, arahan, pikiran, kritik, kesabaran, motivasi serta ilmu yang telah diberikan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini dan dapat menyelesaikan Pendidikan S-1 Biologi dengan baik dan lancar. Terima kasih kepada pembimbing pertama Bapak Drs. As'adi Abdullah, M.Si yang telah memberikan bimbingan dan arahan sehingga skripsi ini dapat selesai pada waktu yang tepat.

Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada:

1. 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, terima kasih atas ilmu, masukan, saran dan dukungannya.
4. Bapak Prof. Dr. Fahrudin, M.Si. selaku dosen Penasehat Akademik (PA), terima kasih atas motivasi dan bimbingan yang diberikan kepada penulis hingga pada tahap penyusunan skripsi ini.
5. Tim penguji Ibu Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si. dan Ibu Dr. Zohra Hasyim, M.Si. terima kasih atas segala ilmu, saran dan dukungan yang diberikan kepada penulis hingga penyusunan skripsi saat ini.

6. Bapak/Ibu Dosen Departemen Biologi yang telah membimbing dan memberikan ilmunya dengan tulus dan sabar kepada penulis selama proses perkuliahan. Staf pegawai Departemen Biologi yang telah banyak membantu penulis baik dalam menyelesaikan administrasi maupun memberikan dukungan kepada penulis selama ini.
7. Fuad Gani, S.Si, Heriadi, S.Si., M.S, Nenis Sardiani, S.Si., dan Syafrian, S.Si. yang telah banyak memberi bantuan terhadap penelitian ini baik ilmu, bimbingan, kritik dan saran yang sangat berguna bagi penulis.
8. Donny Suherman, S.Si dan Masykur, S.Si. yang telah memberikan bantuan dalam penyusunan skripsi penulis.
9. Teman penelitian Faisal dan Zulfiqar Lukman yang telah menemani, mendukung dan bekerja sama dalam menyelesaikan penelitian.
10. Teman-teman seperjuangan Biologi Angkatan 2019, terima kasih atas do'a, dukungan dan kerja sama yang telah diberikan selama perkuliahan.
11. Seluruh pihak yang telah memberikan bantuan dan dukungan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Pada akhirnya penulis berterima kasih kepada semua pihak yang telah berkontribusi hingga akhir penyusunan skripsi ini. Semoga Tuhan senantiasa melimpahkan nikmat rahmat dan lindungan-Nya kepada kita semua, Aamiin.

Makassar, 04 April 2023

Penulis

ABSTRAK

Jamur karbonoklastik dikenal sebagai jamur yang dapat menghasilkan kristal kalsium karbonat (CaCO_3) melalui produksi enzim urease untuk menghidrolisis urea yang terdapat pada substrat atau medium pertumbuhannya. Penelitian ini bertujuan untuk memperoleh dan mengetahui jenis jamur karbonoklastik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua yang berada di kawasan karst Maros-Pangkep. Isolasi dan seleksi jamur karbonoklastik dilakukan dengan menggunakan medium Christensen Urea Agar. Uji potensi presipitat CaCO_3 dilakukan dengan menghitung massa presipitat CaCO_3 yang terbentuk dan analisa kadar amonia serta biomassa sel yang dihasilkan selama masa pertumbuhan. Identifikasi jamur dilakukan dengan menggunakan marka molekuler gen 18S rRNA. Dua puluh empat isolat jamur yang diperoleh dari sampel hasil swab di gua Parewe dan gua Bulu Sipong, 7 isolat positif termasuk ke dalam jamur karbonoklastik. Hasil pengujian presipitat CaCO_3 diperoleh satu isolat yang memiliki kemampuan paling tinggi dalam menghasilkan presipitat CaCO_3 yaitu isolat Ps3 menghasilkan presipitat sebesar 80,30 mg dengan nilai kadar amonia sebesar 701,7064 ppm dan biomassa sel sebesar 333,80 mg. Hasil identifikasi diketahui isolat Ps3 termasuk jenis *Aspergillus* sp. strain BW1.

Kata Kunci: Jamur Karbonoklastik, Kalsium Karbonat, Karst Maros-Pangkep.

ABSTRACT

Carbonoclastic fungi known as a fungi that can produce calcium carbonate crystals (CaCO_3) through the urease enzyme produced to hydrolysis of urea contained in the substrate or growth medium. The purpose of this study was to obtain and determine the types of carbonoclastic fungi that cause damage to cave wall paintings in the Maros-Pangkep karst area. Isolation and selection of carbonoclastic fungi were carried out using Christensen Urea Agar medium. The CaCO_3 precipitate potential test was carried out by calculating the mass CaCO_3 precipitates formed and analysis of ammonia levels and cell biomass produced during the growth period. Fungi identification was performed using the 18S rRNA gene molecular markers. Twenty four fungi isolates obtained from swab samples in Parewe and Bulu Sipong caves, 7 positive isolated belonged to carbonoclastic fungi. The results of CaCO_3 precipitates, namely isolate Ps3 producing precipitates of 80,30 mg with ammonia content value of 701,7064 ppm and cell biomass of 333,80 mg. The identification results showed that Ps3 isolate belongs to *Aspergillus* sp. strain BW1.

Keywords: Carbonoclastic fungi, Calcium Carbonate, Maros-Pangkep Karst.

DAFTAR ISI

SAMPUL	i
HALAMAN SAMPUL	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN	iv
KATA PENGANTAR	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Tujuan Penelitian	3
I.3 Manfaat Penelitian	4
I.4 Waktu dan Tempat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
II.1 Kawasan Karst.....	5
II.1.1 Pengertian Karst.....	5
II.1.2 Proses Pembentukan Karst.....	6
II.1.3 Tipe-Tipe Karst di Indonesia	6

II.1.4 Kawasan Karst Maros-Pangkep.....	8
II.2 Lukisan Cadas (<i>Rock Art</i>).....	10
II.2.1 Pengertian Lukisan Cadas (<i>Rock Art</i>).....	10
II.2.2 Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan.....	11
II.2.2 Faktor Lingkungan.....	11
II.2.2.1 Faktor Alam	11
II.2.2.2 Faktor Manusia	13
II.2.3 Mineral Kalsium Karbonat (CaCO_3)	14
II.3 Jamur Karbonoklastik.....	8
II.3.1 Kelompok Jamur Karbonoklastik	15
II.3.2 Mekanisme Jamur Karbonoklastik	16
II.4 Metode Identifikasi Fungi	18
II.4.1 Identifikasi Morfologi Koloni.....	18
II.4.2 Identifikasi Morfologi Sel.....	19
II.4.3 Identifikasi Molekuler.....	20
II.4.3.1 Pengertian Ekstraksi DNA dan Amplifikasi PCR	20
II.4.3.2 Analisis rDNA	21
II.4.3.3 Ekstraksi DNA.....	22
II.4.3.4 Amplifikasi PCR Daerah ITS1 dan ITS4 rDNA	23
II.4.3.5 Analisis Filogenetik	23
BAB III METODE PENELITIAN	25
III.1 Alat.....	25
III.2 Bahan.....	25

III.3 Prosedur Penelitian.....	26
III.3.1 Pengambilan Sampel	26
III.3.2 Sterilisasi Alat.....	26
III.3.3 Pembuatan Medium.....	26
III.3.4 Isolasi Jamur Karbonoklastik	28
III.3.5 Seleksi Jamur Karbonoklastik	28
III.3.6 Karakterisasi Jamur Karbonoklastik.....	28
III.3.6.1 Pengamatan Morfologi Koloni.....	28
III.3.6.2 Pengamatan Morfologi Sel.....	29
III.3.7 Uji Potensi Presipitat CaCO ₃ Jamur Karbonoklastik	30
III.3.7.1 Perhitungan Berat Presipitat CaCO ₃	30
III.3.7.2 Analisa Kadar Amonia.....	31
III.3.7.3 Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel	31
III.3.8 Identifikasi Isolat Jamur Karbonoklastik dengan Analisis Sekuensing Berbasis Gen 18S rRNA	32
III.3.8.1 Isolasi dan Ekstraksi DNA.....	32
III.3.8.2 Amplifikasi ITS dengan PCR.....	33
III.3.8.3 Elektroforesis DNA.....	33
III.3.8.4 Sekuensing Hasil Amplifikasi PCR	34
III.3.8.5 Analisis Urutan DNA.....	34
III.4 Analisis Data	34
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
IV.1 Lokasi Pengambilan Sampel.....	35

IV.2 Isolasi Jamur Karbonoklastik.....	36
IV.3 Seleksi Jamur Karbonoklastik.....	37
IV.4 Karakterisasi Jamur Karbonoklastik	39
IV.4.1 Pengamatan Morfologi Koloni.....	39
IV.4.2 Pengamatan Morfologi Sel.....	43
IV.5 Uji Potensi Presipitat CaCO ₃ Jamur Karbonoklastik	46
IV.5.1 Perhitungan Berat Presipitasi CaCO ₃	46
IV.5.2 Analisa Kadar Amonia	47
IV.5.3 Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel	49
IV.6 Analisis Molekuler Berbasis Gen 18S rRNA.....	51
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	56
V.1 Kesimpulan.....	56
V.2 Saran.....	56
DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN.....	64

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1 Hasil Seleksi Jamur	37
2 Hasil Pengamatan Morfologi Koloni	40
3 Hasil BLAST Isolat Jamur Ps3	54

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1 Skema Proses Pelarutan Batugamping.....	6
2 Peta Kawasan Karst Maros-Pangkep	9
3 Lokasi Pengambilan Sampel Jamur Karbonoklastik Penyebab Kerusakan Lukisan Prasejarah di Gua Parewe dan Gua Bulu Sipong	35
4 Pertumbuhan Jamur dalam Media Christensen Urea Agar	38
5 Pengamatan Morfologi Koloni Jamur pada Medium Malt Extract Agar (MEA)	42
6 Pengamatan Morfologi Sel Jamur Menggunakan Mikroskop Perbesaran 400×	45
7 Hasil Perhitungan Berat Presipitat CaCO ₃	46
8 Hasil Pengukuran Kadar Amonia Jamur Karbonoklastik	38
9 Hasil Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel Jamur Karbonoklastik ..	38
10 Hasil Amplifikasi Gen 18S dengan Primer ITS1 dan ITS4 Isolat PS3 pada 600 bp	53
11 Filogeni dengan Metode UPGMA Terhadap Isolat Ps3	38

DAFTAR LAMPIRAN

Gambar	Halaman
1 Skema Kerja Penelitian	64
2 Skema Kerja Pengambilan Sampel, Isolasi dan Seleksi Jamur Karbonoklastik	65
3 Skema Kerja Uji Presipitat CaCO_3 yang dihasilkan Jamur Karbonoklastik	66
4 Skema Kerja Uji Kadar Amonia yang dihasilkan Jamur Karbonoklastik	67
5 Skema Kerja Isolasi dan Ekstraksi DNA Jamur.....	68
6 Skema Kerja Amplifikasi ITS dengan PCR.....	69
7 Skema Kerja Elektroforesis DNA	70
8 Tempat Pengambilan Sampel.....	71
9 Pengambilan Sampel.....	71
10 Hasil Seleksi Jamur Karbonoklastik	72
11 Uji Potensi Presipitat CaCO_3 oleh Jamur Karbonoklastik	74
12 Presipitat yang dihasilkan oleh Jamur Karbonoklastik	75
13 Berat Kering Biomassa Sel Jamur Karbonoklastik	76
14 Hasil Perhitungan Berat Presipitat CaCO_3	77
15 Hasil Perhitungan Analisa Kadar Amonia	78
16 Hasil Perhitungan Berat Kering Biomassa Sel Jamur Karbonoklastik ..	79
17 Identifikasi Jenis Jamur Menggunakan Marka Molekuler.....	80
18 Foto Prosedur Penelitian	81

BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Kawasan karst dikenal sebagai kawasan hamparan batuan kapur yang menjulang tinggi dan dijumpai hampir diseluruh belahan dunia. Istilah karst berasal dari bahasa Yugoslavia/Slovenia yaitu 'krst/krast' yang merupakan nama suatu kawasan di perbatasan antara Yugoslavia dengan Italia Utara, dekat kota Trieste. Karst diperoleh dari bahasa Slovenia, terdiri dari *kar* (batuan) dan *hrast* (oak) yang artinya lahan gersang berbatu (Adji *et al.*, 1999). Kawasan karst adalah kawasan peleburan antara batuan-batuan terlarut yang berupa formasi batuan karbonat (batugamping CaCO_3 dan dolomit $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) yang telah mengalami proses karstifikasi atau peleburan sampai batas tertentu (Green *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2020). Di Indonesia, kawasan karst cukup menarik perhatian masyarakat karena memiliki bentuk yang beragam dan keunikan tersendiri tanpa kecuali seperti yang dijumpai di kawasan karst Maros-Pangkep.

Kawasan karst Maros-Pangkep merupakan salah satu karst terkenal di Indonesia yang ditandai dengan daerah tandus, tanah berbatu, sumber daya mineral, gua-gua, sungai bawah tanah, tidak ada aliran permukaan, dan lubang-lubang. Hal ini merupakan hasil dari efek pelarutan yang terjadi di bawah tanah (Zhou *et al.*, 2020). Beberapa fitur karst seperti gua buatan manusia, tambang dan terowongan memberikan manfaat bagi manusia sebagai tempat berteduh atau penggunaan

komersial. Keunikan dan manfaat kawasan karst Maros-Pangkep tersebut menjadikan karst Maros-Pangkep masuk ke dalam situs warisan UNESCO dengan status geopark, sehingga sekarang kawasan ini dikenal dengan sebutan Kawasan Geopark Nasional Maros-Pangkep (GNMP). Menurut Brahmantara (2016) salah satu peninggalan masa prasejarah pada kawasan karst ialah lukisan cadas (*rock art*) yang terdapat pada dinding gua. Lukisan tersebut mempunyai nilai keagungan luar biasa sebagai bentuk refleksi diri dan nilai seni masa lalu sehingga menjadi alasan ditetapkannya sebagai situs cagar budaya warisan UNESCO. Rasyidu *et al.* (2020) mengatakan bahwa tujuan dibuatnya gambar cadas tidak hanya sekedar untuk ungkapan rasa seni semata tetapi pengutaraan rasa estetika, religius dari manusia di masa berburu tingkat lanjut dan harapan hidup manusia dalam bentuk lukisan.

Ironisnya, keberadaan lukisan gua makin lama kondisinya makin mengkhawatirkan karena telah banyak yang mengalami kerusakan, salah satunya karena letak gua yang berada di alam terbuka sangat rentan terpengaruh oleh faktor lingkungan baik karena manusia ataupun alam. Menurut Suhartono (2009) dan Suhartono (2012) kerusakan lukisan gua yang disebabkan oleh faktor manusia dapat berupa degradasi ekosistem karst dan vandalisme. Sedangkan faktor alam seperti adanya kontak atmosfer yang berbeda secara signifikan pada musim hujan dan kemarau menjadi alasan kerusakan dan terkelupasnya lukisan gua. Selain itu, pengaruh iklim, curah hujan, suhu udara yang rendah, kondisi dalam ruangan lembab dan basah menjadi pemicu mikroorganisme seperti jamur untuk bereproduksi lebih cepat dibandingkan bakteri.

Kehadiran jamur menyebabkan terkelupasnya dan terjadinya perubahan

warna lukisan dinding gua karst dari proses fisik dan kimia yang dihasilkan oleh jamur. Kerusakan fisik diakibatkan oleh pertumbuhan hifa tubuh buah (*fruiting bodies*) di atas dan di bawah lapisan permukaan lukisan cadas. Penetrasi hifa ke dalam pigmen dapat mencabut beberapa lapisan pigmen. Sedangkan proses kimia disebabkan karena metabolit yang dihasilkan oleh jamur berupa produksi asam, pembentukan pigmen dan produksi enzim untuk pengendapan kalsium karbonat. Proses tersebut dijumpai pada jamur karbonoklastik (Wazny dan Rudniewsky, 1972).

Kelompok jamur karbonoklastik yang dapat menghasilkan endapan kalsium karbonat diantaranya adalah *Aspergillus* spp. (36,4%), *Penicillium* spp. (18,2%), *Talaromyces* spp. (3,6%), dan *Paecilomyces variotii* (3,6%) yang termasuk dalam divisi Ascomycota yang mendominasi jamur pada kawasan karst (Vanderwolf *et al.*, 2013; Wasti *et al.*, 2021). Proses pengendapan kalsium karbonat (CaCO_3) oleh jamur ini terjadi melalui aktivitas enzim urease untuk menghidrolisis urea yang terdapat pada substrat. Endapan inilah yang menyebabkan kerusakan lukisan prasejarah (Phang *et al.*, 2018). Saat ini, kajian mengenai hubungan antara kerusakan lukisan prasejarah yang terdapat pada dinding gua karst dengan aktivitas jamur karbonoklastik masih sangat kurang. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini untuk mengetahui jenis jamur karbonoklastik penyebab kerusakan lukisan pada dinding gua kawasan karst Maros-Pangkep.

I.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Memperoleh isolat jamur karbonoklastik yang berasal dari batuan karst Maros-

Pangkep.

2. Mengetahui jenis jamur karbonoklastik penyebab kerusakan pada lukisan dinding gua yang berada di kawasan karst Maros-Pangkep.

I.3 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi kepada masyarakat dan instansi terkait mengenai keberadaan jamur dapat menyebabkan kerusakan pada lukisan yang terdapat pada dinding gua kawasan karst Maros-Pangkep.

I.4 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2022 - Februari 2023. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar lukisan batu pada kawasan karst Maros-Pangkep. Isolasi dan identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Kawasan Karst

II.1.1 Pengertian Karst

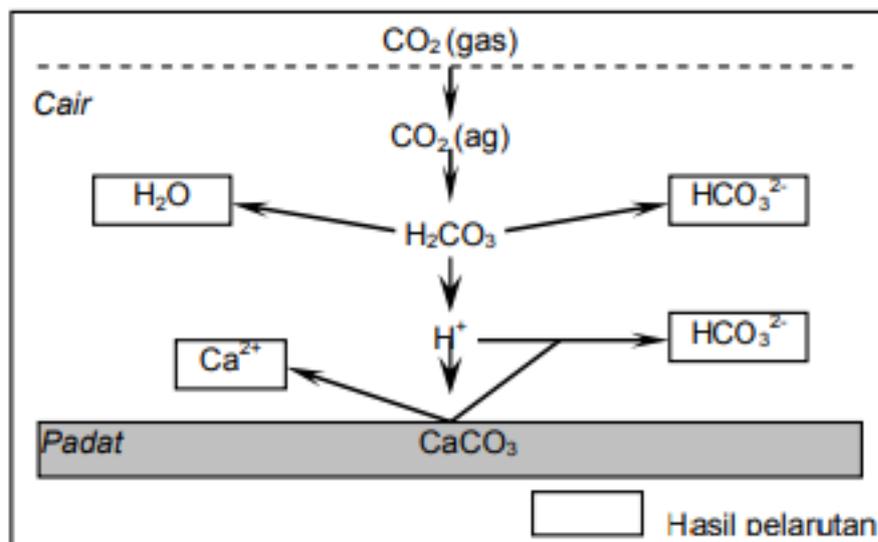
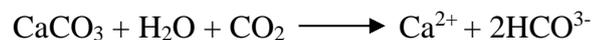
Penggunaan istilah karst di Indonesia berasal dari bahasa Yugoslavia/Slovenia yaitu 'krst / krast' yang merupakan nama suatu kawasan di perbatasan antara Yugoslavia dengan Italia Utara, dekat kota Trieste. Karst diperoleh dari bahasa Slovenia, terdiri dari *kar* (batuan) dan *hrast* (oak) yang artinya lahan gersang berbatu (Adji *et al.*, 1999). Topografi karst didefinisikan sebagai aksi geologi air pada batuan yang larut seperti karbonat, gipsum, batu kapur dan dolomit yang didominasi oleh peleburan kimia dan dilengkapi dengan erosi mekanis (Zhou *et al.*, 2020). Morfologi karst diartikan sebagai bentuk bentang alam karst yang berkembang pada suatu kawasan atau formasi batuan kalsium karbonat (batugamping CaCO_3 dan dolomit $\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$) yang telah mengalami proses karstifikasi atau peleburan sampai batas tertentu (Nuhung, 2016).

Kekhasan dari kawasan karst dapat dibedakan antara fenomena di atas permukaan karst (eksokarst) dan fenomena di bawah permukaan karst (endokarst). Eksokarst antara lain ditunjukkan dengan adanya menara atau kubah berbentuk kerucut (tower karst), lembah dan dolina. Sedangkan endokarst ditunjukkan dengan adanya gua-gua (*rock/rock shelters*) dengan segala bentuk kelengkungan, bangku, lorong, sungai bawah tanah dan stalaktit dan stalagmit atau disebut speleothem

(Mulyadi dan Rosmawati, 2019).

II.1.2 Proses Pembentukan Karst

Proses pembentukan karst lebih dikenal dengan istilah karstifikasi, dimana proses pembentukan lahan karst didominasi oleh proses pelarutan. Proses pelarutan batugamping diawali oleh larutnya CO₂ di dalam air membentuk H₂CO₃. Larutan H₂CO₃ tidak stabil terurai menjadi H⁻ dan HCO₃²⁻. Ion H⁻ inilah yang selanjutnya menguraikan CaCO₃ menjadi Ca²⁺ dan HCO₃²⁻. Proses pelarutan tersebut dirumuskan dengan reaksi (Haryono dan Adji, 2004).



Gambar 1. Skema Pelarutan Batugamping (Haryono dan Adji., 2004).

II.1.3 Tipe-Tipe Karst di Indonesia

Kawasan karst di Indonesia yang mengalami proses karstifikasi terdapat beberapa tipe diantaranya adalah sebagai berikut (Utama *et al.*, 2016):

- Tipe Nusa Penida

Pulau Nusa Penida terletak di sebelah selatan pulau Bali yang memiliki karst yang tersusun atas batugamping klastik dan nonklastik. Pada batugamping

klastik terdapat sisipan batuan berukuran halus dan kedap air.

- Tipe Irian

Tipe karst di Irian dicirikan oleh adanya gua-gua panjang. Karst disusun oleh batugamping klastik dan bioklastik, bahkan telah berubah menjadi meta sedimen akibat kontak dengan intrusi batuan beku.

- Tipe Wawolesea

Tipe ini dicirikan terutama oleh kontrol hidrologi air panas sehingga terjadi proses pengendapan ulang larutan kalsit yang membentuk undak travertin yang beraneka ragam serta jarang dijumpai di tempat lain.

- Tipe Gunung Sewu

Tipe ini hadir berupa kawasan karst yang luas dan dicirikan bukit gamping berbentuk kerucut dan kubah yang jumlahnya ribuan. Selain itu didapati adanya lembah dolin dan polje diantara bukit-bukit tersebut. Di dalam dolin terdapat terrarosa yang dapat menahan air sehingga tidak bocor ke dalam tanah. Sungai-sungai yang mengalir di bawah tanah akan bergabung membentuk sistem besar. Tipe ini berkembang di sepanjang jalur pegunungan selatan dari Jawa Timur hingga Yogyakarta.

- Tipe Semau

Tipe ini melibatkan batugamping berumur muda (kala kwarter) dan memiliki undak-undak pantai yang disusun oleh koral mencapai tebal 25-100 meter dan mengalami pengangkatan 2,5 cm/tahun. Tipe ini dijumpai pada Pulau Semau sebelah Barat Kupang, NTT.

- Tipe Gombong

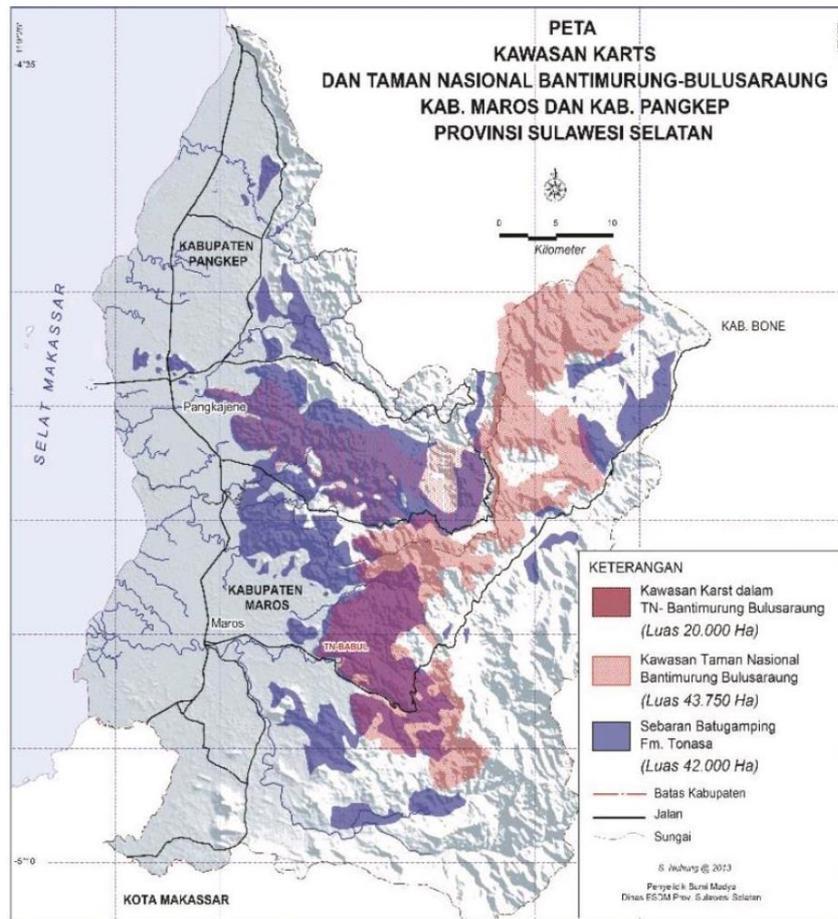
Bentang alam karst dicirikan oleh pembentukan kokpit, terutama yang dijumpai di daerah selatan Gombong (Karangbolong). Bentukan depresi yang ada umumnya dibatasi oleh lereng yang terjal dan kadang dijumpai bentukan seperti bintang.

- Tipe Maros

Tipe ini dicirikan oleh bukit-bukit yang berbentuk menara (tower karst atau mogote). Tinggi menara antara 50-200 meter, berlereng terjal, dan datar pada bagian puncaknya. Di antara bukit-bukit tersebut terdapat lembah-lembah sempit, berdasar rata, dan berbentuk memanjang. Bentukan yang khas ini dijumpai di daerah Maros, Sulawesi Selatan.

II.1.4 Kawasan Karst Maros-Pangkep

Kawasan Karst Maros-Pangkep merupakan kawasan karst terluas kedua di dunia setelah karst alam di China yang secara administratif berada dalam wilayah Kabupaten Maros dan Kabupaten Pangkep. Geologi umum sebaran perbukitan batugamping Maros-Pangkep menempati lahan sekitar 42.000 hektare. Posisi geografis kawasan ini terletak antara 119° 34' 17" – 119° 55' 13" Bujur Timur dan antara 4° 42' 49" – 5° 06' 42" Lintang Selatan (Nuhung, 2016; Fatinaware *et al.*, 2019). Kawasan karst Maros-Pangkep termasuk kawasan dengan tipe karst tower yang memiliki ciri khas pada kaki dan lereng bukit karst tower terdapat ratusan gua dalam berbagai bentuk dan ukuran serta menyimpan berbagai bentuk peninggalan sejarah dan purbakala, berbagai jenis flora dan fauna yang unik, serta berfungsi sebagai salah satu pengatur tata air kawasan sekitarnya (Najib, 2019).



Gambar 2. Peta Kawasan Karst Maros-Pangkep (Nuhung, 2016).

Oktariadi (2005) dalam Nuhung (2016) menjelaskan bahwa kondisi mata air di daerah karst ini mempunyai keunikan yang membedakan dengan daerah lainnya. Satuan batugamping yang menyusun karst Maros-Pangkep merupakan daerah resapan air (*recharge zone*) dan memiliki reservoir air tanah yang baik, terutama lapisan pengandung air (akuifer) yang berada dalam kawasan. Resapan air permukaan ke dalam tanah meresap melalui retakan, celahan dan rongga pelarutan, lebih cepatnya melalui lembah. Akuifer dapat terjadi di bagian atas, biasanya terakumulasi pada lapisan yang berbutir membentuk akuifer bebas yaitu bagian atasnya tidak tertutupi oleh lapisan kedap air dengan sebaran terbatas. Sebagian

akuifer bebas dan aliran air dari permukaan yang melalui bidang-bidang lemah ini bila berhubungan dengan retakan dan rongga pelarutan akan memberikan kontribusi ke bagian bawahnya menuju rongga pelarutan yang mempunyai sistem jaringan menjadi aliran saluran (*conduit flow*) yang dikenal sebagai sungai bawah tanah (Haryono dan Adji, 2004).

II.2 Lukisan Cadas (*Rock Art*)

II.2.1 Pengertian Lukisan Cadas (*Rock Art*)

Lukisan cadas merupakan salah satu peninggalan arkeologi yang cukup populer di dunia. Lukisan cadas merupakan salah satu karya manusia purba yang memiliki pola tertentu yang dibuat baik pada dinding gua atau ceruk, tebing dan batu (Permana *et al*, 2014). Pembuatan pola-pola gambar pada setiap objek cadas dapat dilakukan dengan beberapa cara, diantaranya menggores, mencungkil, menyemprot, dan cap. Motif seni cadas (lukisan) sendiri ada yang berbentuk gambar tokoh manusia, hewan, stensil tangan, jejak kaki, alat batu, garis, lingkaran, dan geometris (Wattimena *et al.*, 2020). Hal tersebut merupakan bukti kreativitas nenek moyang manusia untuk mengekspresikan rasa seni. Tujuan dibuatnya gambar cadas, tidak hanya sekedar untuk ungkapan rasa seni semata, tetapi pengutaraan rasa estetika dan religius dari manusia di masa berburu tingkat lanjut. Faktor yang melatarbelakangi penciptaan gambar cadas antara lain berkaitan dengan konsep manusia terhadap kehidupan dan alam, sebagai identitas kelompok, gambar tokoh mitos atau legenda, maupun hal-hal yang berkaitan dengan kepercayaan dan ritual tertentu (Rasyidu *et al.*, 2020).

II.2.2 Faktor-Faktor Penyebab Kerusakan

Seiring berjalannya waktu, banyak lukisan prasejarah mengalami kerusakan yang dapat disebabkan oleh faktor alam dan faktor manusia.

II.2.2.1 Faktor Alam

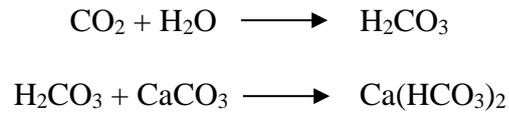
Lukisan pada dinding gua prasejarah umumnya mengalami kerusakan yang sama yaitu terkelupas dan sedimentasi. Beberapa warna lukisan memudar, terutama lukisan yang terletak di dinding depan mulut gua (Thosibo *et al.*, 2019). Beberapa faktor alam yang menyebabkan kerusakan lukisan gua adalah sebagai berikut:

A. Iklim

Kerusakan lukisan gua disebabkan oleh perubahan iklim utama yang terjadi secara global sejak Holosen Tengah (Mayewski *et al.*, 2004). Perubahan iklim mengakibatkan suhu tinggi di siang hari dan rendah di malam hari. Ketika batuan terkena panas dan mengembang di siang hari, kemudian mendingin dan berkontraksi di malam hari, tekanan sering dialami oleh lapisan luar. Tekanan menyebabkan lapisan terluar batuan terkelupas dan menjadi lapisan tipis. Meskipun kerusakan ini terutama disebabkan oleh perubahan suhu, proses ini juga diperburuk oleh adanya kelembapan yang tinggi (Thosibo *et al.*, 2019).

B. Curah Hujan

Curah hujan juga dapat menyebabkan kerusakan lukisan gua. Air yang bereaksi dengan karbon dioksida atmosfer atau asam organik membentuk asam karbonat lemah yang bereaksi dengan kalsium karbonat (batuan kapur) dan membentuk kalsium bikarbonat. Proses pelapukan larutan tersebut dikenal dengan istilah karbonasi. Reaksi karbonasi itu adalah sebagai berikut (Suhartono, 2012):



Air yang bereaksi dengan karbon dioksida dapat membentuk asam karbonat, kemudian mengalir melewati permukaan batuan yang ada lukisan dapat menyebabkan kerusakan lukisan. Karbon dioksida dalam bentuk kalsium karbonat, jika bercampur dengan mineral batuan dapat menyerang feldspar dan mineral lainnya sehingga mengakibatkan silika dan kalium-natrium karbonat menjadi terlarut dan terbawa oleh aliran air sehingga lukisan dapat terkelupas. Disamping itu, apabila aliran air yang mengandung garam terlarut melewati lukisan jika berada di udara terbuka atau suhu atmosfer tinggi mengakibatkan terjadinya pengendapan dan dapat menutupi lukisan gua (Suhartono *et al.*, 2009).

C. Mikroorganisme

Permukaan batuan yang terkena air hujan akan ditumbuhi mikroorganisme berupa bakteri, jamur dan alga yang tinggal di permukaan atau di dalam batu (organisme endolitik). Mikroorganisme tersebut melekat dan terikat bersama batuan dengan memproduksi *extracellular polymeric matrix* (EPM) yang kemudian membentuk komunitas kompleks disebut sub-aerial biofilms (SABs) (Villa *et al.*, 2016). Sedangkan, musim kemarau permukaan akan terkena sinar matahari secara terus menerus sehingga terjadi penguapan air dan tumbuhan di permukaan batuan akan mati. Tumbuhan yang mati ini akan meninggalkan lapisan hijau kehitaman di permukaan batu. Pembusukan tumbuhan mati di lapisan batuan dapat membentuk asam organik yang jika dilarutkan dalam air pada musim hujan berikutnya akan menyebabkan pelapukan kimia. Pelepasan senyawa khelat mempengaruhi batuan

di sekitarnya dan dapat menyebabkan pemisahan bahan terlarut lapisan batuan besar yang mengakibatkan terkelupasnya lapisan permukaan (Thosibo *et al.*, 2019).

II.2.2.2 Faktor Manusia

Faktor manusia (antropogenik) merupakan salah satu faktor yang dapat menyebabkan terjadinya kerusakan lukisan gua. Faktor manusia dapat memberi dampak pada gua-gua prasejarah adalah:

A. Penggunaan Sehari-hari

Kawasan karst ataupun gua prasejarah seringkali menjadi tempat persinggahan sementara masyarakat yang melewati gua tersebut dan bahkan ada yang memilih menjadikannya sebagai tempat tinggal sehari-hari. Penggunaan api dan sentuhan yang dilakukan manusia ataupun hewan peliharaannya secara terus menerus pada lukisan gua mengakibatkan perubahan warna dan tertutupnya lukisan asli sehingga lukisan gua mengalami kerusakan (Gunn, 2011; Zerboni *et al.*, 2022).

B. Pembangunan Ekonomi

Batuan karbonat yang diperoleh secara percuma di alam menyebabkan berbagai kegiatan eksploitasi dilakukan guna untuk meningkatkan perekonomian. Kegiatan yang dilakukan manusia seperti eksploitasi minyak, pertambangan dan pembangunan infrastruktur dapat mempercepat degradasi bahkan penghancuran batuan karst dan secara langsung mempengaruhi lukisan yang terdapat pada batuan karst (Anag *et al.*, 2002; Klemm *et al.*, 2012; Zerboni *et al.*, 2022).

C. Vandalisme

Vandalisme diartikan sebagai perbuatan merusak dan menghancurkan hasil seni dan barang berharga lainnya (keindahan alam dan sebagainya), perusakan dan

penghacuran secara kasar dan ganas. Vandalisme akibat ulah manusia dapat berupa coret-coretan baik dinding gua yang ada lukisan maupun tidak ada lukisan. Perbuatan vandalisme secara tidak langsung dapat mengubah warna (pigmen) ataupun gambar asli lukisan gua (Suhartono, 2012).

II.2.3. Mineral Kalsium Karbonat (CaCO₃)

Mineral merupakan zat padat yang tersusun secara anorganik yang melimpah di alam dan memiliki komposisi kimia yang berbeda-beda serta atom-atom penyusunnya teratur (Haris *et al.*, 2014). Salah satu mineral yang ada di bumi dan mudah dijumpai ialah kalsium karbonat (CaCO₃). CaCO₃ merupakan mineral yang umum terdapat di kerak bumi dan menjadi penyusun utama batuan seperti batu kapur dan batugamping (Erdogan dan Eken, 2017). Terdapat dua sumber kalsium karbonat di dunia, yaitu kalsium karbonat tanah atau *ground calcium carbonate* (GCC) dan endapan kalsium karbonat atau *precipitated calcium carbonate* (PCC). GCC adalah kalsium karbonat yang diekstraksi dari bumi dan hadir dalam jumlah bervariasi dalam bentuk kalsit, aragonit, batu kapur, dan marmer (Kilic, 2015). Di sisi lain, PCC dapat diperoleh dalam tiga polimorf kristal utama: kalsit, aragonit dan vaterit (Sezer, 2013). Kalsit adalah polimorf yang paling stabil secara termodinamika. Aragonit lebih larut dan lebih padat daripada kalsit. Biasanya membentuk kristal ortorombik seperti jarum dan bersifat metastabil yang sewaktu-waktu berubah perlahan menjadi kalsit. Vaterite adalah polimorf yang paling tidak stabil secara termodinamika dan kristal heksagonalnya jarang terlihat dalam mineral alami (Piskin dan Ozdemir, 2012).

Kehadiran CaCO₃ sebagai penyusun utama batuan karst atau kalsit, batu

kapur dan batugamping menjadikan batuan tersebut banyak digunakan di bidang industri dan bangunan seperti batu dimensi, batu pecah atau agregat untuk bangunan di jalan raya dan sebagai komponen beton (Sezer, 2013). Kapur dan batugamping relatif lunak dan mudah digerus hingga menjadi butiran dan tidak beracun sehingga batu kapur digunakan secara luas sebagai pengisi dalam beragam produk, contohnya sumber kalsium dalam pakan ternak, dan sebagai pengatur keasaman di beberapa produk pertanian dan farmasi. Bedak yang terbuat dari kapur biasanya dikenal dengan istilah kapur sirih (BGS, 2006). Sedangkan kalsium karbonat (CaCO_3) sendiri dimanfaatkan sebagai bahan pamanjang pada kertas, cat, plastik, sealant, perekat, makanan, keramik, tekstil (karpet), kosmetik, obat-obatan (Dogan, 2007; Lopez-Periago *et al.*, 2010).

II.3 Jamur Karbonoklastik

II.3.1 Kelompok Jamur Karbonoklastik

Mikroorganisme karbonoklastik adalah mikroorganisme yang mampu menghasilkan kristal CaCO_3 melalui aktivitas metabolisme seperti fotosintesis, reduksi besi, reduksi sulfat, amonifikasi, reduksi nitrat (denitrifikasi), hidrolisis urea, dan oksidasi asam organik (Li *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020; Justo-Reinoso *et al.*, 2021; Lin *et al.*, 2021). Jamur karbonoklastik adalah jamur yang dapat menghasilkan kalsium karbonat CaCO_3 melalui aktivitas urease yakni menghidrolisis urea menjadi amonium sehingga meningkatkan pH lingkungan dan membentuk ion karbonat. Karbonat kemudian mengikat ion kalsium dan menghasilkan pembentukan kristal CaCO_3 (Phang *et al.*, 2018). Beberapa jamur yang telah teridentifikasi penyebab kerusakan lukisan gua dengan melakukan

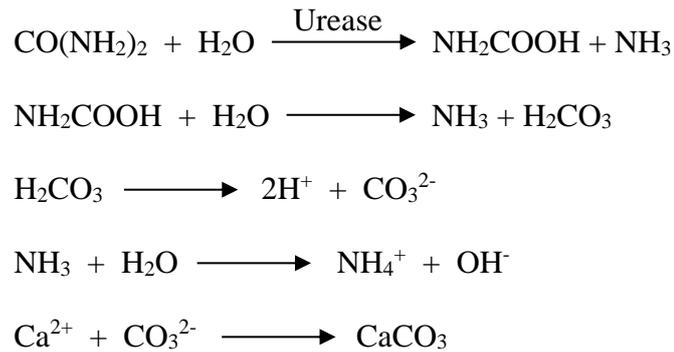
presipitasi CaCO_3 adalah *Aspergillus* spp. (36.4%), *Penicillium* spp. (18.2%), *Talaromyces* spp. (3.6%), dan *Paecilomyces variotii* (3.6%) (Wasti *et al.*, 2021).

II.3.2 Mekanisme Jamur Karbonoklastik

Interaksi jamur dengan logam dan mineral dapat terjadi melalui dua proses yaitu mobilisasi dan immobilisasi (Bindschedler *et al.*, 2016). Proses mobilisasi jamur melibatkan proses mekanik dan biokimia. Proses mekanis merupakan kemampuan jamur untuk tumbuh dalam suatu retakan logam dan mengikat logam tersebut dengan substrat mineral, sedangkan proses biokimia melibatkan beberapa proses seperti khelasi melalui siderofor dan produksi asam organik, transformasi redoks dan proses metilasi. Proses mobilisasi disebut juga bioweathering (Gadd *et al.*, 2010). Adapun proses immobilisasi jamur melalui mekanisme aktif dan pasif. Mekanisme aktif melibatkan akumulasi intraseluler dan transformasi redoks, sedangkan mekanisme pasif melibatkan pembibitan pada permukaan sel dan produksi *exopolymeric substances* (EPS) yang disekresikan sisi luar sel jamur. Proses immobilisasi inilah yang dikenal dengan biomineralisasi (Gadd *et al.*, 2007; Gadd *et al.*, 2010).

Mekanisme jamur dalam menghasilkan endapan kalsium karbonat (CaCO_3) terjadi melalui dua proses: (1) proses secara tidak langsung, melibatkan siklus kompleks yang dimulai dengan eksresi asam oksalat, oksidasi mineral oksalat dan pengendapan kalsit. (2) proses langsung, mengarah ke biomineralisasi hifa (Verrecchia *et al.*, 2003). Pembentukan presipitat CaCO_3 pada substrat urea terjadi melalui aktivitas enzim urease. Pada proses ini, enzim urease menghidrolisis urea menjadi amonia dan asam karbonat. Produk ini dapat membentuk bikarbonat

dengan adanya air, sedangkan ion amonium dan hidroksida yang terbentuk menyebabkan peningkatan pH. Lingkungan kalsium dan basa inilah membuka reaksi untuk proses presipitat kalsium karbonat. Reaksi tersebut sebagai berikut (Dhami *et al.*, 2017):



Hasil aktifitas heterotrofik yang dilakukan jamur karbonoklastik dapat meningkatkan kejenuhan CaCO_3 yang ditandai dengan konversi urea menjadi amonium, penyerapan nitrat, penghilangan gas CO_2 , dan translokasi air (Li *et al.*, 2014). Jamur urea-positif sama dengan bakteri ureolitik yang dapat menginduksi biomineralisasi CaCO_3 . Pembentukan CaCO_3 dengan produk akhir berupa amonia bertindak untuk menaikkan pH lingkungan yang merupakan kondisi menguntungkan untuk presipitat kalsium karbonat. Karbonat akan mengikat ion kalsium dan menghasilkan kristal CaCO_3 yang kemudian dilepaskan untuk diendapkan di lingkungan (Li *et al.*, 2015; Rukmana dan Zulaika, 2017).

Proses biomineralisasi jamur presipitasi kalsium karbonat (CaCO_3) berkaitan erat dengan biomineralisasi hifa jamur. Konsentrasi Ca^{2+} sangat penting bagi pertumbuhan hifa jamur. Hifa jamur membutuhkan Ca^{2+} dalam konsentrasi tinggi untuk pertumbuhan apikalnya, sehingga konsentrasi Ca^{2+}

bebas di sitoplasma jauh lebih rendah (Akoijam *et al.*, 2021). Ca^{2+} dalam sitoplasma dapat dipertahan pada konsentrasi rendah dengan cara aktif memompa Ca^{2+} secara langsung dari sel atau dengan penyerapan Ca^{2+} dalam organel (mitokondria, retikulum endoplasma dan vakuola) atau mengikatnya dengan protein sitoplasma (calmodulins) dan di dalam dinding sel (Bindschedler *et al.*, 2016). Selain aktivitas metabolisme jamur yang dapat mempengaruhi alkalinitas karbonat dan konsentrasi Ca^{2+} , jamur juga dapat berpartisipasi dalam pengendapan CaCO_3 melalui proses organomineralisasi yakni mensekresikan EPS melalui dinding sel jamur (kitin). Kitin dikenal dengan kemampuannya mengikat Ca^{2+} sehingga EPS dengan mudah mengadsorpsi berbagai logam salah satunya adalah Ca^{2+} . Konsentrasi Ca^{2+} yang berlebihan pada matriks organik kemudian bereaksi dengan CO_3^{2-} yang berasal dari penguraian mineral inilah yang membentuk kristal CaCO_3 (Dupraz *et al.*, 2009; Akoijam *et al.*, 2021).

II.4 Metode Identifikasi Fungi

Identifikasi atau karakterisasi mikroorganisme merupakan suatu metode yang dilakukan untuk mengetahui karakteristik atau ciri dari mikroorganisme yang tumbuh pada media pertumbuhan. Isolat yang digunakan dalam identifikasi ini adalah biakan murni. Metode identifikasi terbagi tiga macam yaitu identifikasi morfologi koloni, identifikasi morfologi sel dan identifikasi molekuler (Putri dan Kusdiyantini, 2018).

II.4.1 Identifikasi Morfologi Koloni

Identifikasi morfologi koloni dapat dilakukan dengan pengamatan morfologi fungi berupa warna koloni, ukuran koloni, permukaan atau *elevation*

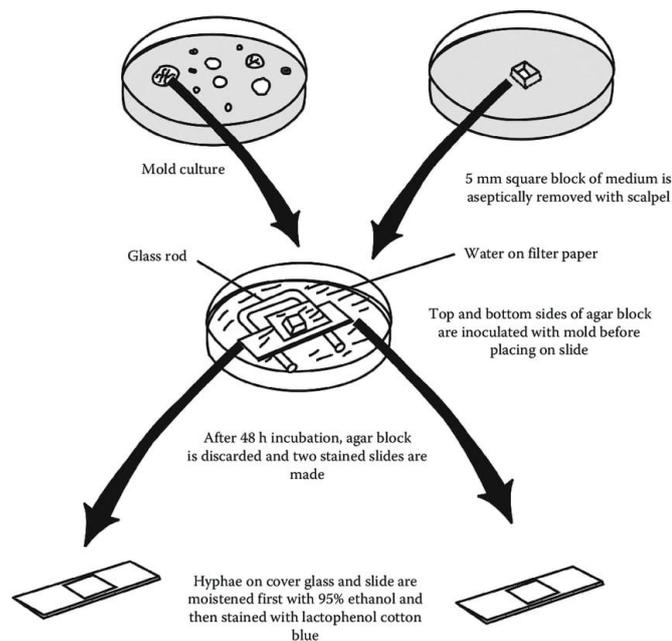
koloni (granular seperti tepung, menggulung, licin, *convex*, *flat*, *raised*, dan *crateriform*), garis-garis radial dari pusat koloni ke arah tepi koloni (ada atau tidak), lingkaran konsentris (ada atau tidak), ada tidaknya zonasi, *growing zone* dan *radial furrow* (Shtayeh *et al.*, 1998; Nuryadi *et al.*, 2016).

II.4.2 Identifikasi Morfologi Sel

Identifikasi morfologi sel dapat dilakukan dengan membuat *slide culture* yang meliputi pengamatan terhadap bentuk hifa, spora, sporangium, konidia, dan konidiofor yang menjadi ciri khusus dalam penentuan jenis jamur (Arif *et al.*, 2009). Pembuatan *slide culture* pertama-tama bagian bawah cawan petri diberi alas kertas saring sehingga menutup alas cawan. Dimasukkan batang gelas V/U, lalu letakkan gelas objek berdampingan dengan *cover glass* dan disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Setelah dingin, letakkan medium PDA pada tengah gelas objek. Inokulasikan spora fungi pada potongan media PDA tersebut dengan *cotton swab*, lalu tutup dengan *cover glass*. Selanjutnya, ditetaskan 5-7 tetes gliserol 10% steril diatas kertas saring untuk memberi kelembaban yang optimal selama pertumbuhan isolat jamur. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 34°C selama 2-3 hari. Hifa yang tumbuh mengenai gelas objek atau *cover glass*, lalu ditetaskan pewarna *lactophenol cotton blue* dan diamati di bawah mikroskop mulai dari perbesaran rendah (x100) dan beralih ke perbesaran tinggi (x400) (Abbasi dan Samaei, 2019; NHS, 2019; Mardin *et al.*, 2022).

Pewarnaan *lactophenol cotton blue* adalah larutan pewarnaan yang paling banyak digunakan dalam pemeriksaan jamur yang memiliki tiga

komponen yaitu fenol yang akan membunuh semua organisme hidup, asam laktat yang mempertahankan struktur jamur dan *cotton blue* yang menodai kitin di dinding sel jamur. Setelah penambahan *lactophenol cotton blue*, fungi atau jamur akan berwarna biru sehingga memungkinkan visualisasi dan pengamatan di bawah mikroskop jauh lebih mudah (Gaddeyya *et al.*, 2012; NHS, 2019).



Gambar 2. Prosedur Pembuatan *Slide Culture* Fungi (<https://microbeonline.com/slide-culture-for-fungi/>)

II.4.3 Identifikasi Molekuler

II.4.3.1 Pengertian Ekstraksi DNA dan Amplifikasi PCR

Ekstraksi DNA adalah suatu metode untuk memurnikan DNA dengan menggunakan metode fisik dan/atau kimia dari suatu sampel yang memisahkan DNA dari membran sel, protein, dan komponen seluler lainnya (Gupta, 2020). Sampel kemudian diamplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) yang merupakan suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in vitro*. PCR pertama kali dikembangkan pada tahun 1985 oleh Kary B. Mullis.

Amplifikasi gen dapat memperkaya atau memperbanyak sekuens fragmen gen DNA dan dapat digunakan untuk memperkuat gen spesifik sebelum diklon. Amplifikasi DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Proses PCR menggunakan alat termosiklus yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperature untuk tiap tahapan reaksi (Yusuf, 2010).

II.4.3.2 Analisis rDNA

Teknik identifikasi molekuler yang sudah populer untuk fungi yaitu menggunakan analisis DNA ribosomal (rDNA). rDNA adalah daerah penyandi genom untuk komponen RNA ribosom yang memiliki tiga macam daerah *converse* yang berada pada subunit besar ribosom (5,8S dan 28S rRNA) dan subunit kecil ribosom (18S rRNA). DNA ribosom subunit besar dan subunit kecil tersebut dipisahkan oleh dua buah sekuens yang disebut *spacer* (Schoch *et al.*, 2012). Gen penyandi *converse* dipisahkan oleh sekuens gen *non-coding* disebut daerah ITS (*Internal Transcribed Spacer*) (Gomes *et al.*, 2002).

Jamur mempunyai dua sekuens gen daerah ITS yaitu ITS1 yang berada diantara sekuens 18S dan 5,8S rDNA dan ITS2 yang berada diantara sekuens 5,8S dan 28S rDNA. Pada sekuens gen 18S, daerah ITS1 memiliki ukuran sebesar 183 bp dan ITS2 sebesar 175 bp. Sedangkan sekuens gen 5,8S memiliki ukuran yang lebih kecil pada ITS1 dan ITS2 yaitu masing-masing dengan ukuran 157 bp. Pasangan primer yang umum digunakan (*universal*) adalah pasangan primer ITS1 (*forward*) dan ITS4 (*reverse*) yang mencapai ukuran pita sekitar 600 bp, berada

diantara pita 500 bp dan 750 bp (Rahayu *et al.*, 2015; Wardani, 2021). Sekuen rDNA dengan daerah ITS memiliki variasi sekuen relatif tinggi pada gen rDNA tiap spesies, sehingga sangat baik digunakan untuk identifikasi tingkat genus hingga spesies (Buchan *et al.*, 2002). Penggunaan identifikasi molekuler cepat, cukup, dapat direproduksi, dan dapat memberikan spesifisitas yang tinggi untuk membedakan antara spesies dan subspecies jamur (Alsohaili dan Hasan, 2018).

II.4.3.3 Ekstraksi DNA

Identifikasi molekuler dimulai dengan pemilihan isolat tunggal jamur yang kemudian dilakukan ekstraksi DNA menggunakan fragmen 18S rDNA yang diamplifikasi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dengan ITS1 dan ITS4 (primer *formard* ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' dan primer *reverse* ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'). DNA jamur diekstraksi dari kultur miselia menggunakan metode *Wizard Genomic DNA Purification kit ex* Promega Corp (Madison, USA). Miselia dikerik dan dimasukkan ke tabung mikro, ditambahkan EDTA 0,5 M (pH 8) dan enzim litikase. Selanjutnya, diinkubasi selama 60 menit (37°C) dan disentrifugasi. Endapan ditambahkan pelisis inti sel (*nuclei lysis solution*) dan larutan pengendap protein (*protein precipitation solution*). Sampel disentrifugasi dan supernatan yang mengandung DNA dipindahkan ke tabung mikro yang telah berisi isopropanol, dan disentrifuga kembali. Setelah pelet DNA kering, etanol 70% juga ditambahkan. Kemudian penambahan larutan rehidrasi DNA dan larutan RNase, dan diinkubasi. Isolat DNA yang didapatkan, disimpan dalam lemari es pada suhu 2-8°C (Rakhmana *et al.*, 2015).

II.4.3.4 Amplifikasi PCR Daerah ITS1 dan ITS4 rDNA

Amplifikasi daerah ITS rDNA jamur dilakukan dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan pasangan primer ITS1 dan ITS4 (Rakhmana *et al.*, 2015). Fragmen rDNA *internal transcribed spacer* (ITS) diamplifikasi oleh ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan ITS4 (5'-TCCTCGCCTTATTGATATGC-3'). Amplifikasi dilakukan dengan sistem 50 μL , termasuk template DNA 2 μL , *forward primer* 2 μL , *reverse primer* 2 μL , 2 \times *mastermix* 25 μL , dan ddH₂O 19 μL . Kondisi PCR adalah sebagai berikut: 95°C selama 5 menit pada denaturasi awal, 35 siklus 95°C selama 30 detik, 55°C selama 35 detik, 72°C selama 2 menit denaturasi *annealing* dan *extension*, dan 72°C untuk perpanjangan akhir 10 menit dari DNA yang diamplifikasi. Produk PCR diperiksa untuk ukuran yang diharapkan pada gel agarosa 1% (Wang *et al.*, 2020).

II.4.3.5 Analisis Filogenetik

Analisis filogenik dilakukan dengan mencari rutan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) dalam database nukleotida GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) untuk memeriksa taksa yang terkait erat. Urutan referensi dan kelompok luar dipilih dari literatur relevan terbaru dan GenBank. Hasil sekuensing diverifikasi, diedit dan disambungkan menggunakan program MEGA-X. Hasil verifikasi dan *editing* dengan MEGA-X kemudian disejajarkan dengan BLAST <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> untuk identifikasi berdasarkan persen identitas spesies jamur terdekat. Pohon filogenetik disimpulkan dengan *maximum parsimony* (MP), *maximum likelihood* (ML) dan *Bayesian inference* (BI) (Wanasinghe *et al.*, 2018).