

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara dengan kawasan karst yang tersebar di berbagai wilayahnya, terutama pada pulau-pulau besar seperti pulau Jawa, Madura, Sulawesi, hingga Papua. Karst adalah kawasan yang tersusun atas batuan karbonat dengan tingkat kelarutan yang tinggi dengan porositas yang baik disertai dengan pola hidrologi yang khas (Avrilan et al., 2022). Kawasan karst merupakan hasil interaksi dari asam dan batuan larut yang membentuk lingkungan yang sangat beragam namun juga sangat rentan seiring waktu (Chen et al., 2024).

Kawasan karst Maros-Pangkep adalah kawasan karst yang terletak di pulau Sulawesi, tepatnya di Provinsi Sulawesi Selatan. Kawasan ini membentang dari Kabupaten Maros hingga Kabupaten Pangkep dan merupakan kawasan karst terluas kedua di dunia setelah kawasan karst di Guagzhou, China. Adapun ciri khas dari kawasan karst Maros-Pangkep adalah bentuknya yang menyerupai menara, sehingga dijuluki sebagai *the spectacular of tower karst* (Rahmi et al., 2022). Adapun bentang alam pada kawasan ini umumnya dicirikan dengan adanya depresi tertutup, drainase permukaan, dan sistem perguaan. Fenomena geologi yang khas berupa bukit-bukit kapur yang menjulang disertai tebing-tebing yang menantang memiliki ragam *mega-biodiversity* yang khas. Selain sebagai habitat flora dan fauna yang langka, kawasan karst Maros-Pangkep juga menyimpan jejak kehidupan manusia prasejarah sehingga menjadikannya salah satu dari 10 situs *geopark* di Indonesia yang telah disahkan sebagai bagian dari UNESCO *Global Geopark*. Pada kawasan karst Maros-Pangkep terdapat setidaknya 135 gua, dengan 78 diantaranya masih memiliki jejak kehidupan manusia prasejarah, termasuk adanya lukisan tertua di dunia yang berumur sekitar 40.000 tahun (Sirajuddin et al., 2024; Haedar et al., 2024).

Proses pembentukan bentuk lahan karst didominasi oleh karstifikasi atau pelarutan, yaitu proses pelarutan batuan karbonat akibat interaksi antara karbondioksida (CO_2) dan air (H_2O) yang membentuk ion H^+ sehingga dapat melarutkan batuan. Karbondioksida tersebut berasal dari aktivitas organisme, baik tumbuhan di permukaan tanah maupun mikroorganisme tanah, sehingga kandungan CO_2 dalam tanah berfluktuasi tergantung pada suhu dan kelembaban (Danardono et al., 2022). Selain pelarutan, pelapukan batuan dalam sistem karst juga dipengaruhi oleh kelembapan akibat rembesan air secara kapilaritas atau infiltrasi hidrologis yang menembus struktur batuan gua. Proses pelapukan berlangsung lebih cepat di daerah yang menerima curah hujan tinggi atau mengalami rembesan air pada dinding gua (Permana et al., 2021). Kondisi lingkungan yang lembab dan stabil menciptakan habitat yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme, yang mana suhu dan kelembaban menjadi faktor utama dalam mengontrol aktivitasnya (Susanti et al., 2024).

Meski kaya akan keanekaragaman hayati, ekosistem karst hingga saat ini masih relatif kurang dieksplorasi. Mikroorganisme yang hidup di ekosistem karst umumnya memiliki ketahanan khusus terhadap kondisi ekstrem, seperti kelembaban tinggi, minim ketersediaan nutrisi yang terbatas. Karakteristik lingkungan gua karst terdapat di kawasan Maros-Pangkep menciptakan tekanan seleksi ekologis



yang tinggi, sehingga menyebabkan mikroorganisme yang hidup di dalamnya mengembangkan adaptasi metabolik tertentu, seperti kemampuan membentuk biofilm, resistensi terhadap stres osmotik, serta produksi metabolit sekunder yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan diri, termasuk senyawa antimikroba. Keunikan ekosistem karst serta potensi mikroorganisme yang ada di dalamnya menjadikan ekosistem ini sebagai sumber eksplorasi yang berharga, khususnya dalam bidang bioteknologi dan pengembangan senyawa bioaktif (Lihaawa et al, 2024; Pakaya et al, 2025).

Senyawa antimikroba adalah senyawa yang memiliki kemampuan untuk menghambat atau bahkan menghentikan aktivitas metabolisme suatu mikroorganisme. Senyawa ini bekerja melalui berbagai mekanisme untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme, salah satunya melalui penggunaan antibiotik. Antibiotik adalah suatu senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme tertentu yang berfungsi untuk menghambat ataupun membunuh mikroorganisme patogen (Aldina et al., 2023). Antibiotik dihasilkan dari metabolit sekunder, yaitu senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme bukan untuk pertumbuhan dasarnya, tetapi sebagai bagian dari mekanisme pertahanan diri (Fatimah et al., 2024). Jamur merupakan salah satu sumber utama dalam produksi antibiotik, menyumbang sekitar 20% dari total antibiotik yang telah ditemukan (Burhamzah dan Rante, 2020). Beberapa antibiotik yang berasal dari jamur antara lain penisilin yang dihasilkan oleh *Penicillium* sp., streptomisin oleh *Streptomyces* sp., dan sefalosporin yang berasal dari *Cephalosporium* sp. (Setiarto dan Karo, 2021).

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri merupakan salah satu dari sepuluh penyebab kematian tertinggi di Indonesia. Saat ini, antibiotik masih menjadi pilihan utama dalam pengobatan infeksi bakteri. Namun, penggunaan antibiotik yang berlebihan dan tidak tepat menyebabkan munculnya resistensi antibiotik, yaitu kondisi ketika bakteri mengalami perubahan sehingga tidak lagi dapat dibunuh atau dihambat oleh antibiotik yang sebelumnya efektif (Setiawan et al., 2023). Resistensi antibiotik menjadi masalah serius dalam dunia kesehatan karena dapat menyebabkan infeksi yang lebih sulit diobati, meningkatkan angka kesakitan, kematian, serta biaya pengobatan. Untuk mengatasi hal ini, diperlukan alternatif baru dalam pencarian sumber antibiotik, salah satunya melalui eksplorasi fungi sebagai sumber senyawa antimikroba. Secara historis, kelompok mikroorganisme ini dikenal sebagai penghasil utama antibiotik, sehingga fungi menjadi salah satu target utama dalam penelitian untuk menemukan senyawa antimikroba alami. Fungi menghasilkan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibiotik dan dapat diuji aktivitas antimikrobanya (Rosyadi et al., 2022).

Beberapa studi sebelumnya telah meneliti mikroorganisme asal kawasan karst Maros-Pangkep, seperti mikroorganisme karbonoklastik (Zhafirah et al., 2022), pereduksi besi (Sarwan, 2024), penghasil enzim urease (Doni, 2024), dan lain-lain. Namun, studi mengenai potensi antimikroba asal jamur masih sangat terbatas. Oleh karena itu, dilakukan penelitian mengenai potensi senyawa antimikroba yang diperoleh dari fungi asal kawasan karst Maros-Pangkep secara *in vitro* dan *in silico*. Pengujian *in vitro* dilakukan secara langsung untuk mengetahui efektivitas senyawa terhadap ne tertentu, sedangkan pengujian *in silico* menggunakan piranti lunak untuk nteraksi senyawa dengan target reseptor pada tingkat molekuler, sehingga rikan gambaran awal mengenai potensi aktivitas senyawa tersebut.



1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi dan mengetahui potensi jamur dari beberapa gua di kawasan karst Maros-Pangkep sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Mengetahui jenis isolat jamur yang potensial dan senyawa antimikroba yang dihasilkan secara *in vitro* dan *in silico* oleh jamur dari kawasan karst Maros-Pangkep.
3. Mengidentifikasi isolat jamur yang potensial sebagai antimikroba dari kawasan karst Maros-Pangkep secara molekuler melalui analisis homologi sekuens DNA ITS.

1.3 Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti, sebagai sumber informasi ilmiah mengenai keberadaan jamur yang mampu menghasilkan senyawa antimikroba terhadap bakteri patogen khususnya *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang diisolasi dari beberapa gua di kawasan karst Maros-Pangkep.
2. Bagi masyarakat, penelitian ini dapat berkontribusi dalam pengembangan antimikroba dari jamur asal kawasan karst Maros-Pangkep sebagai alternatif dalam mengatasi infeksi bakteri patogen, khususnya *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.



BAB II METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai November 2024. Pengambilan sampel dilakukan di Kawasan Karst Maros-Pangkep. Isolasi dan seleksi bakteri dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Proses ekstraksi dilaksanakan di Laboratorium Kimia Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Adapun analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang (PNUP).

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada uji *in silico* antara lain laptop dan perangkat lunak yaitu *autodock tools*, PyMol, website *Protein Data Bank* (PDB), MarvinSketch, PyRx dan PubChem. Pada pengujian antimikroba secara *in vitro* alat yang digunakan yaitu alat gelas (gelas kimia, gelas ukur, tabung Erlenmeyer, cawan petri, objek glass, tabung reaksi, batang pengaduk, preparat, corong)), non-gelas (labu semprot, pipet tetes, wadah plastik, ose lurus, ose bulat, gegep, skapel, bunsen, spatula, rak tabung reaksi), alat instrumen (oven, inkubator, *hot plate*, evaporator, mikroskop, lemari pendingin, *rotary shaker* dan vortex) dan alat non-instrumen (ekas, timbangan digital, dan autoklaf).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat jamur yang diisolasi pada dinding karst kawasan Maros-Pangkep, isolate bakteri uji berupa *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, media *Potato Dextrose Agar* (PDA), *Potato Dextrose Broth* (PDB), media *Nutrient Agar* (NA), media *Mueller Hinton Agar* (MHA), kapas, kertas cakram, objek gelas, dan *aluminium foil*.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel diambil dari kawasan batuan karst Maros-Pangkep, diantaranya yaitu gua Leang Jarie, Gua Leang Ulu Wae, dan Gua Leang Kassi. Pada Leang Jarie sampel diambil pada 3 titik lokasi, Leang Ulu Wae sampel diambil pada 2 titik lokasi, sedangkan pada Leang Kassi sampel diambil pada 1 titik lokasi, sehingga diperoleh 6 titik pengambilan sampel tanah pada ketiga lokasi. Proses pengambilan sampel diawali diawali dengan pengambilan sampel tanah dari tiap titik lokasi menggunakan spatula. Adapun setiap pengambilan menghasilkan kurang lebih sebanyak 30 gram sampel. Lokasi pengambilan sampel yaitu area yang berdekatan dengan dinding gua. Sampel tanah kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel. Selanjutnya, isolasi dan identifikasi sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.



2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan kaca disterilkan dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, sedangkan jarum ose disterilkan dengan nyala api bunsen hingga panas membara. Peralatan yang tidak tahan panas dan media pertumbuhan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.3 Pembuatan Media

Pembuatan Medium Nutrien Agar (NA). Sebanyak 2,8 gram medium NA dilarutkan ke dalam 100 mL aquades. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan magnetic stirrer. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup menggunakan *aluminium foil* lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media Potato Dextrose Agar (PDA). Sebanyak 3,9 gram media PDA yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades di dalam erlenmeyer. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup menggunakan *aluminium foil* lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media Potato Dextrose Broth (PDB). Sebanyak 2,64 gram media PDB ditambahkan ke dalam 100 mL aquades di dalam erlenmeyer lalu dilarutkan menggunakan batang pengaduk hingga homogen. Mulut erlenmeyer berisi media kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* lalu disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Media Mueller Hinton Agar (MHA). Sebanyak 3,4 gram media MHA dilarutkan ke dalam 100 mL aquades di dalam erlenmeyer. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan menggunakan *hot plate* dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.4 Isolasi Jamur dari Tanah Kawasan Karst Maros-Pangkep

Jamur diisolasi dengan cara melakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-2} dari sampel, lalu ditumbuhkan pada media PDA. Media tersebut diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 34 °C.

2.3.5 Seleksi Jamur Penghasil Senyawa Antimikroba

Pengujian ini dilakukan menggunakan metode uji kontak langsung, yaitu potongan media yang ditumbuhi isolat jamur ditempelkan langsung pada media MHA yang sudah ditambahkan bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* untuk menilai kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dimasukkan masing-masing ke dalam Erlenmeyer berisi 100 mL media MHA lalu dicampur/dihomogenkan. Kemudian dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Diberi label sebagai penanda. Media kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Isolat jamur yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri akan menunjukkan adanya area bening atau zona hambat di sekitar koloni bakteri uji.



an Aktivitas Antibakteri

- o **Kultur Isolat Jamur.** Isolat jamur dari stok *Potato Dextrose Agar* (PDA) diinokulasikan ke dalam 50 mL media *Potato Dextrose Broth* (PDB) pada

Erlenmeyer dan diinkubasi putar menggunakan *shaker rotator* pada kecepatan 120 rpm selama 3×24 jam dan 5×24 jam.

Peremajaan Bakteri Uji. Bakteri uji yang digunakan yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, yang merupakan bakteri gram positif dan gram negatif. Kedua bakteri uji diambil dari kultur murni sebanyak satu ose, kemudian diinokulasikan menggunakan metode gores pada medium *Nutrient Agar* (NA) miring dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji. Bakteri uji berumur 24 jam dari agar miring disuspensikan menggunakan aquades steril. Suspensi ini kemudian dimasukkan ke dalam cuvet dengan diameter 13 mm. Kepadatan suspensi diatur hingga mencapai pengenceran yang diinginkan pada panjang gelombang 580 nm, dengan transmitansi 25% (setara dengan kepadatan 10^2 CFU) dibandingkan dengan blanko aquades steril menggunakan spektrofotometer.

Pembuatan Larutan Kontrol. Larutan kontrol positif disiapkan menggunakan antibiotik ciprofloxacin dengan konsentrasi 30 ppm. Dilarutkan 0,003 gram antibiotik tersebut dalam 100 mL aquades.

2.3.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian ini dilakukan saat kultur jamur asal kawasan karst Maros-Pangkep diinkubasi selama 3×24 jam dan 5×24 jam. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Dituangkan suspensi bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara aseptis ke dalam masing-masing erlenmeyer yang berisi media MHA sebanyak 0,1 mL lalu dihomogenkan agar bakteri uji dan media tercampur dengan merata, lalu ditunggu hingga memadat. Dimasukkan tiap isolat jamur dan kontrol positif ke dalam plat tetes yang masing-masing sudah diisi dengan kertas cakram lalu didiamkan selama 15 menit. Selanjutnya, kertas cakram yang sudah direndam ke dalam isolat uji diletakkan di atas media MHA yang sudah memadat. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam dan diukur daerah hambatannya untuk melihat potensinya dalam menghambat bakteri uji. Kemudian diinkubasi kembali 1x24 jam untuk mengetahui apakah isolat bakteri bersifat menghambat atau membunuh bakteri.

2.3.8 Uji Senyawa Bioaktif Ekstrak Isolat Jamur

Partisi dan Ekstraksi. Untuk mengidentifikasi jenis senyawa antibakteri dari isolat jamur yang memiliki aktivitas antimikroba, dilakukan uji *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media PDB (*Potato Dextrose Broth*) dan diinkubasi goyang menggunakan *shaker rotator* selama 3x24 jam. Setelah itu, kultur jamur dipisahkan dari media untuk selanjutnya dilarutkan dengan etil asetat dalam rasio 1:1, masing-masing sebanyak 500 mL. Ekstrak etil asetat kemudian diuapkan menggunakan evaporator pada suhu 70°C untuk memperoleh fraksi ekstrak etil asetat kental. Kemudian media fermentasi disaring untuk memisahkan filtrat dan miselium.

Analisis komponen senyawa menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Analisis komponen senyawa dari filtrat fermentasi isolat jamur dilakukan dengan GC-MS. Spesifikasi GC-MS untuk analisis yaitu Shimadzu QP2010 jenis kolom berupa Rtx-50 dengan panjang kolom 30 m dan diameter 0,25 GC (*Gas Chromatography*), dilakukan dengan program suhu oven yang 30°C selama 2 menit, kemudian meningkat 10°C per menit hingga mencapai



300°C, dan ditahan selama 10 menit. Pada tahap deteksi menggunakan MS (*Mass Spectrometry*), dilakukan ionisasi dengan metode *Electron Ionization* (EI) 70 eV, dengan suhu sumber ion 200°C dan suhu interface 280°C. Data diperoleh dalam mode pemindaian full scan (m/z 40–600) atau *Selected Ion Monitoring* (SIM) untuk mendeteksi senyawa tertentu. Identifikasi senyawa dilakukan dengan mencocokkan spektrum massa yang diperoleh dengan database NIST 17 (Naibaho et al., 2022).

2.3.9 Uji *In Silico* menggunakan *Molecular Docking*

Preparasi Reseptor dan Ligan. Enzim dari bakteri uji berperan sebagai protein atau reseptor yaitu enzim PBP dari *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Dimana, dari PBP ini sangat penting bagi integritas dinding sel bakteri dan menjadi target utama bagi antibiotik. Adapun untuk protein enzim PBP dari *Staphylococcus aureus* (kode PDB ID 8VBV) dengan ligand native (63U: inhibitor asli dari protein) sementara protein enzim PBP dari *Escherichia coli* (kode PDB ID 2EX9) dengan ligand native (35P: inhibitor asli dari protein). Dalam hal ini, *native ligand* digunakan sebagai ligan pembanding/kontrol. Adapun ligan yang diujikan berupa senyawa dari fraksi etil asetat jamur penghasil antimikroba serta kontrol berupa ciprofloxacin. Langkah awal dengan mengakses struktur protein enzim bakteri uji pada RCSB PDB lalu diunduh struktur 3 dimensinya dalam format pdb. Reseptor dipisahkan dari molekul air di PyMol serta dipisahkan ligan yang menempel pada program UCSF Chimera, kemudian disimpan dalam format pdb. Tambahkan hidrogen pada struktur protein dan disimpan. Selanjutnya akses PubChem dan unduh struktur 3 dimensi dari senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba dan ciprofloxacin lalu disimpan dalam format sdf. Kemudian buka struktur senyawa yang telah diunduh pada MarvinSketch lalu ditambahkan *explicit hydrogen* agar struktur lebih stabil saat dikonformasi. Dipilih konformasi dengan energi terendah dan disimpan dalam format pdb.

2.3.10 Identifikasi Isolat Jamur Penghasil Antimikroba menggunakan Analisis Sekuensing ITS

Isolasi DNA. Proses 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 tabung mikrosentrifugasi lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm, dan dibuang supernatan yang diperoleh. Selanjutnya, ditambahkan 200 µl buffer GA ke dalam tabung sentrifugasi 15 ml dan dilanjutkan dengan penambahan 200 µl *lysozyme* ke dalam sampel, lalu dihomogenkan menggunakan vortex hingga *lysozyme* larut sepenuhnya. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, dengan pembalikan setiap 10 menit. Setelah itu, tambahkan 20 µl proteinase K lalu dihomogenkan menggunakan vortex hingga larut sepenuhnya. Selanjutnya, ditambahkan 200 µl buffer GB ke dalam sampel kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Sampel selanjutnya diinkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit untuk mencapai hasil homogen, dengan pembalikan setiap 3 menit. Setelah itu, ditambahkan 200 µl etanol (96%-100%) dan dihomogenkan menggunakan vortex selama 15 detik agar tercampur rata.

Campuran yang telah disiapkan dipindahkan ke dalam *spin column* CB3 dan pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Dibuang seluruh cairan dan in column ke dalam tabung pengumpul. Selanjutnya, ditambahkan 500 µl dalam *spin column* CB3, lalu disentrifugasi kembali dengan kecepatan



12.000 rpm selama 30 detik, cairan yang diperoleh lalu dibuang dan *spin column* CB3 dipindahkan ke dalam tabung pengumpul. Ditambahkan 600 µl buffer PW ke *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, cairan dibuang dan dipindahkan *spin column* CB3 ke tabung pengumpul. Prosedur yang sama diulangi, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan membran sepenuhnya. Pindahkan *spin column* CB3 ke tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml baru, dipipet 50-200 µl buffer TE, lalu inkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang terkumpul di tabung mikrosentrifugasi merupakan ekstrak DNA.

Amplifikasi ITS dengan Metode PCR. Prosedur ini dilakukan menggunakan campuran reaksi PCR volume 50 µl dan menggunakan primer universal ITS1 dan ITS4. Komponen campuran reaksi PCR disiapkan dengan menambahkan 7 µl DNA template, 2,5 µl primer *forward* ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') dan primer *reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), serta 13 µl ddH₂O, dan 25 µl PCR *mix*. Proses amplifikasi dilakukan dengan tahapan denaturasi awal selama 3 menit sebanyak satu siklus. Selanjutnya 35 siklus, yang mencakup denaturasi 94°C selama 1 menit, penempatan pada suhu 54°C selama 2 menit, dan extending pada suhu 72°C selama 1 menit 30 detik, dan post-extending pada suhu 72°C selama 7 menit.

Visualisasi Produk PCR dengan Elektroforesis. Gel agarosa 1,5% dibuat dengan mencampurkan 1,56 gr serbuk agarosa ke dalam 100 ml TAE Buffer ke dalam erlenmeyer lalu dipanaskan menggunakan *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, kemudian ditambahkan 8 µl Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar, lalu dituang ke dalam cetakan gel elektroforesis menggunakan sisir gel (*comb*) dengan jumlah sisir 17 sumur. Sebanyak 5 µl produk amplifikasi dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dengan tangki yang berisi TAE Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit dengan tegangan konstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang sejajar atau memiliki ukuran yang mendekati dengan marker pada ukuran 1500 bp dan negatif jika tidak terdapat pita pada gel.

Sekuensing DNA. Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil positif pada elektroforesis kemudian dianalisis dengan sekuensing DNA menggunakan jasa sekuensing PT. Genetika Science Indonesia berdasarkan metode Sanger.

Analisis Urutan DNA. Analisis hasil sekuensing dilakukan menggunakan BLAST (*Basic Alignment Search Tools*), urutan nukleotida dari hasil sekuensing dengan database yang tersedia pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang digunakan untuk mencari homologi sekuens nukleotida dengan sekuens database. Dilakukan analisis filogenetik menggunakan MEGA-XII untuk mengetahui kedekatannya dengan spesies lain yang paling mirip.

2.3.11 Analisis Data

Uji aktivitas antimikroba dianalisis secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter zona hambatan isolat bakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Analisis kuantitatif dan kualitatif senyawa yang dihasilkan oleh isolat jamur dengan GC-MS dan data hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel. Hasil yang



diperoleh lalu dianalisis kuantitatif dan kualitatif dengan *uji in silico* untuk efektivitas antimikroba, data hasil pengujian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Selanjutnya dilakukan identifikasi secara molekuler dan sekuensing berbasis ITS, data dianalisis dengan membandingkannya dengan data yang diperoleh dari Data GenBank pada NCBI.

