

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Pusat Pengendalian dan Pencegahan Penyakit memperkirakan bahwa infeksi akibat Resistensi Antimikroba (AMR) telah menyebabkan 1 kematian setiap 15 menit di Amerika Serikat. Secara global, Resistensi Antimikroba (AMR) telah menjadi masalah kesehatan masyarakat utama dan sekarang bertanggung jawab atas lebih banyak kematian daripada HIV/AIDS atau malaria; Pada tahun 2019 saja, infeksi bakteri yang resistan terhadap obat dikaitkan dengan sekitar 4,95 juta kematian di seluruh dunia, termasuk 1,27 juta kematian yang secara langsung disebabkan oleh resistensi antibiotik (WHO, 2023). Selama beberapa dekade terakhir, banyak obat yang digunakan untuk mengobati penyakit menular menjadi semakin tidak efektif karena munculnya resistensi antimikroba (AMR) secara global. Oleh karena itu, terdapat permintaan yang konstan untuk menemukan senyawa baru yang efektif yang dapat membantu meringankan sebagian tekanan ini (Caruso et al. 2022).

Saat ini, banyak penemuan obat baru yang berasal dari ekstrak tanaman herbal dengan fungsi sebagai antimikroba. Hal ini terjadi karena obat sintesis cenderung mahal dan memiliki efek samping yang berpotensi membahayakan kesehatan manusia. Oleh sebab itu, banyak penelitian berfokus pada penggunaan ekstrak tanaman herbal sebagai sumber antibiotik. Namun, pemanfaatan ekstrak tanaman herbal seringkali kurang efektif karena memerlukan jumlah bagian tanaman yang sangat besar untuk proses ekstraksi (Walpajri et al. 2014). Situasi ini menimbulkan kekhawatiran akan eksploitasi tanaman obat secara berlebihan tanpa memperhatikan upaya konservasi, yang berpotensi mengurangi ketersediaan sumber daya hayati dalam ekosistem (Hafsari and Asterina 2013). Untuk itu, diperlukan tindakan untuk menjaga keberlanjutan tanaman obat, salah satunya melalui pemanfaatan bioteknologi guna meningkatkan produksi metabolit sekunder dari tanaman obat (Ramadhani et al. 2017).

Komponen metabolit yang memiliki aktivitas farmakologis tidak hanya disintesis/diperoleh oleh tanaman saja, tetapi juga dihasilkan mikroorganisme yang hidup di dalam jaringan tanaman itu sendiri (Murdiyah 2017). Pada tumbuhan tingkat tinggi, terdapat beragam mikroba yang berasosiasi dengan jaringan tanaman, termasuk di antaranya adalah jamur endofit. Mikroorganisme endofit yang hidup dalam jaringan tanaman mencakup berbagai kelompok, namun isolat yang paling banyak diperoleh berasal dari fungi (ILYAS 2007). Jamur endofit merupakan jenis jamur yang secara asimptomatik mengkolonisasi jaringan tanaman selama periode tertentu dan mampu membentuk koloni tanpa menimbulkan dampak patogenik terhadap inangnya (Murdiyah 2017).

Populasi jamur endofit pada tumbuhan menunjukkan variasi yang signifikan baik antar spesies maupun antar individu dalam spesies yang sama. Jamur endofit berkolonisasi pada berbagai organ tanaman, dengan intensitas tertinggi biasanya

ditemukan pada jaringan daun. Faktor usia daun juga memengaruhi densitas kolonisasi jamur endofit; beberapa studi melaporkan bahwa daun yang lebih tua cenderung memiliki frekuensi dan keanekaragaman jamur endofit yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun yang lebih muda. Hal ini diduga berkaitan dengan perubahan fisiologi dan struktur daun seiring dengan penuaan, yang memungkinkan peluang kolonisasi jamur endofit menjadi lebih besar pada daun tua daripada pada daun yang masih muda (Ramadhani et al. 2017).

Kandungan metabolit sekunder dari jamur endofit disebabkan oleh cara jamur endofit untuk beradaptasi yaitu mengadopsi beberapa informasi genetika (DNA) dari tumbuhan inang (Hafsari and Asterina 2013; Shurigin et al. 2021; Trivedi et al. 2020). Jamur endofit menunjukkan potensi yang sangat besar dalam menghasilkan berbagai senyawa aktif, termasuk yang memiliki aktivitas antimikroba, imunomodulator, antidiabetik, antikanker, insektisidal, dan antiviral dalam rentang aktivitas yang luas. Metabolit antimikroba yang dihasilkan oleh jamur endofit telah dimanfaatkan dalam praktik pengobatan untuk menghambat pertumbuhan mikroba patogen, menunjukkan peranannya sebagai sumber senyawa alami yang penting (Jha et al. 2023; Kurniawan and Ratnaningtyas 2019). Pendekatan komprehensif dalam pencarian antimikroba baru tidak hanya untuk memenuhi kebutuhan terapi yang efektif, tetapi juga memanfaatkan potensi besar senyawa bioaktif yang dihasilkan melalui interaksi simbiotik kompleks antara jamur endofit dan tanaman inangnya, yang dapat menjadi sumber metabolit sekunder antimikroba berguna dalam penemuan obat baru (Agri et al. 2022; Gupta et al. 2023).

Salah satu tanaman yang memiliki potensi sebagai agen terapeutik untuk infeksi jamur dan bakteri adalah *Cassia alata* L., yang secara lokal di Indonesia dikenal sebagai ketepeng cina dan juga disebut *Senna alata* L. atau candle bush dalam bahasa Inggris, yang dimanfaatkan secara tradisional sebagai obat untuk berbagai gangguan kulit (Fatmawati et al. 2020). Bagian yang paling sering dimanfaatkan sebagai bahan obat adalah daun ketepeng cina. Secara tradisional, masyarakat menggunakan daun tersebut dengan cara digosokkan langsung pada kulit atau ditumbuk hingga lumat dan kemudian dioleskan pada area yang mengalami infeksi. Senyawa kimia yang terkandung dalam daun ini berperan sebagai agen antiinflamasi, antialergi, antimikroba, dan antioksidan, serta efektif terhadap beberapa golongan jamur, karena di dalamnya terdapat metabolit sekunder seperti alkaloid, saponin, tanin, antrakuinon, dan flavonoid yang berkontribusi terhadap aktivitas biologis tersebut (Amaliah et al. 2020).

Pada tahun 1994, Untuk pertama kalinya efektivitas terapeutik ekstrak daun *Cassia alata* terhadap infeksi jamur penyebab pityriasis versicolor telah dilaporkan, menunjukkan bahwa ekstrak tersebut dapat digunakan tanpa menimbulkan efek samping yang berarti. Studi ini menunjukkan bahwa ekstrak daun ketepeng cina memiliki potensi antifungi terhadap jamur penyebab kondisi kulit tersebut. (Edo 2017). Penelitian yang telah dilakukan oleh Gama et al. (2011) menunjukkan bahwa ekstrak daun ketepeng cina pada konsentrasi 50% memiliki efektivitas yang sebanding dengan ketokonazol 2% dalam menghambat pertumbuhan jamur, menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menekan aktivitas jamur patogen.. Pada

penelitian Yusuf et al. (2020) melaporkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun ketepeng cina berkorelasi dengan peningkatan diameter zona hambat terhadap pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*, yang menunjukkan hubungan positif antara konsentrasi ekstrak dan aktivitas antifungi yang dihasilkan.

Pada Penelitian Sharma et al. (2015) melaporkan kemanjuran antimikroba isolat daun *S. alata* terhadap tujuh strain bakteri klinis patogen. Penelitian yang telah dilakukan Fitriani et al. (2023) Ekstrak etanol daun *Cassia alata* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri uji termasuk *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *P. acnes*. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mampu menghambat pertumbuhan keempat bakteri tersebut dengan zona hambat yang berbeda-beda pada konsentrasi tertentu, mengindikasikan potensi ekstrak etanol daun ketepeng cina sebagai agen antimikroba terhadap bakteri patogen kulit.

Hasil penelitian Sadapu and Malaha (2021) menunjukkan bahwa 2 isolat Jamur endofit berhasil diisolasi dari daun tanaman Ketepeng cina. Setelah menguji daya hambat terhadap jamur *Malassezi furfur*, isolat JEKA 1 memperoleh zona hambat nilai 10 mm dan JEKA 2 mengisolasi nilai zona hambat sebesar 11 mm. Hasil analisis dengan menggunakan uji Kruskal-Walis menunjukkan bahwa terdapat pengaruh isolat jamur endofit pada daun tanaman ketepeng cina pada pertumbuhan jamur *Malassezia furfur*. Kemudian dari hasil pengujian lebih lanjut dengan menggunakan uji *Duncan*, ditemukan bahwa masing-masing perlakuan antara perlakuan negatif dan perlakuan kontrol sangat berbeda dengan JEKA 1, JEKA 2 dan positif kontrol, sementara tidak ada perbedaan yang signifikan antara JEKA 1, JEKA 2 dan kontrol positif.

Berdasarkan latar belakang diatas maka peneliti tertarik untuk melakukan profiling dan analisis senyawa metabolit Jamur endofit terhadap daun Ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) sebagai antimikroba .

## **1.2 Rumusan Masalah**

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu :

1. Bagaimana identifikasi spesies jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) ?
2. Bagaimana analisis senyawa metabolit jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) ?
3. Bagaimana potensi fungsi endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) sebagai antimikroba ?

## **1.3 Tujuan Penelitian**

### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk melakukan profiling dan analisis in silico senyawa metabolit jamur endofit Daun Ketepeng Cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) sebagai antimikroba.

### **1.3.2 Tujuan khusus**

Adapun tujuan khusus dalam penelitian ini yaitu:

1. Untuk melakukan identifikasi spesies terhadap isolat jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb) yang memiliki potensi yang paling kuat.
2. Untuk menganalisis senyawa metabolit ekstrak etil asetat dan air pada isolat jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.).
3. Untuk menentukan potensi jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) sebagai antibakteri (*Pseudomonas auroginosa* dan *Staphylococcus aureus*) dan antijamur (*Candida albican* dan *Malassezia furfur*)

### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Manfaat Pengembangan Ilmu

Manfaat penelitian ini untuk melengkapi data penggunaan obat bahan alam dan menjembatani kesenjangan pengetahuan yang ada dengan menggunakan metode Profiling dan Analisa metabolit *S. alata* . agar pemanfaatannya dapat dikembangkan lebih lanjut.

2. Manfaat Aplikasi

Aplikasi merupakan penggunaan atau penerapan, Aplikasi yang dimaksud dalam penelitian yaitu Melalui teknik pemodelan molekuler, teknik pemurnian kromatografi dan Profiling metabolit, penelitian ini berupaya untuk memprediksi dan mengidentifikasi senyawa dengan potensi bertindak sebagai antimikroba.

## BAB II METODE PENELITIAN

### 2.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian dengan rancangan *Posttest* Design berskala laboratorium untuk mengetahui Profiling Senyawa Metabolit dari jamur endofit daun ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) Sebagai Antimikroba.

### 2.2 Jadwal, Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 2.2.1 Jadwal Penelitian

No	Jenis kegiatan	Tahun 2024				Tahun 2025					
		Sep	Okt	Nov	Des	Jan	Feb	Mar	Apr	Mei	Juni
1.	Studi pustaka										
2.	Persiapan penelitian										
	a. Determinasi Tanaman										
	b. isolasi jamur endofit										
	c. Uji Antagonis / pendahuluan										
3.	Penelitian laboratorium										
	a. Uji Aktivitas Antimikroba										
	b. Analisis LC- MS										
	c. Identifikasi jamur Endofit										
4.	Pengumpulan dan analisis data										
5.	Penyusunan laporan										

#### 2.2.2 Waktu dan Tempat Penelitian

a. Waktu Penelitian :

Penelitian dilaksanakan pada bulan Septemberr tahun 2024

b. Tempat Penelitian :

Universitas Al-Marisah Madani dan Pusat Laboratorium Forensik Sentul,  
Bogor .

## 2.3 Alat Dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Sampel : daun ketepeng cina *S. alata* Mikroorganisme: *Pseudomonas auroginosa* (ATCC 27853), *Candida albican* (ATCC 14053), *Malassezia furfur* (ATCC 14521), dan *Staphylococcus aureus* (ATCC 2913). Media: Potato Dextrose Agar (PDA, Merck), *Bacto* agar (Merck), *Mueller Hinton* Agar (Himedia), *Nutrient* Agar (Himedia) dan *Nutrient Broth* (Himedia). Reagen: Air deionisasi, Tween 20 (Merck), Etanol (Merck), natrium hipoklorit (Merck), Metanol (Merck), Kloramfenikol, reagen nucleon PHYTOPure (Amersham LIFE SCIENCE). Air Bebas Nuklease (Himedia), Primer Forward ITS 5 (Macrogen), Primer Reverse ITS 4 (Macrogen), GoTaq Green Master Mix 2X (Promega), Kertas saring Whatman No. 1 (Sigma-Aldrich), Kertas saring untuk uji antibakteri, Etil asetat (Merck), dimetil sulfoksida (Sigma-Aldrich), 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (Sigma-Aldrich). Instrumen: Timbangan analitik, Laminar air flow (Sanyo), shaker incubator (Yamato SA320), oven (Jisico), Autoclave (Tomy SX-300), Rotary evaporator (IKA RV10), Mikroskop (Interscience 4000), Magnetic stirrer (Ayela RCH-3), PCR (Thermo Scientific Arktik), DNA sequencer (ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer).

## 2.4 Pengolahan Sampel

### 2.4.1 Pengumpulan dan Identifikasi

TanamanTanaman Ketepeng cina (*Senna alata* (L.) Roxb.) yang segar dan sehat dikumpulkan pada tanggal 7 Januari 2025 di Kecamatan Maritengngae, Kabupaten Sidenreng Rappang, Sulawesi Selatan, Indonesia, dengan koordinat 3°58'25.5"S 119°47'18.5"E. Sampel disimpan dalam kantong Plastik ziplock dan dicuci (air mengalir) untuk menghilangkan tanah dan partikelpartikel lainnya yang ada pada permukaan daun. Daun ketepeng cina kemudian diidentifikasi dengan kode ID 201543 dan nomor sampel 6449-201543-1 di Laboratorium Bahan Baku Obat Tradisional, Badan Riset dan Inovasi Nasional melalui E-Layanan Sains-BRIN.

## 2.5 Pembuatan Media Pertumbuhan Mikroorganisme

### 2.5.1 Pembuatan Media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring disiapkan untuk pemurnian kapang endofit dengan melarutkan 39 g serbuk PDA dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan dan diaduk hingga homogen dan disterilisasi pada 121 °C selama 15 menit (Jauhari, 2010; Ramadhan, 2011).

### 2.5.2 Pembuatan Media PDA Miring

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring disiapkan untuk pemurnian kapang endofit dengan melarutkan 39 g serbuk PDA dalam 1 L aquadest, lalu dipanaskan dan diaduk hingga homogen. Medium cair tersebut kemudian dibagi ke dalam tabung reaksi  $\pm 5$  mL per tabung dan disterilisasi pada 121 °C selama 15 menit. Setelah sterilisasi, tabung-tabung itu didinginkan dalam posisi miring hingga media mengeras membentuk permukaan miring, yang selanjutnya digunakan sebagai media kultur murni kapang endofit. (Jauhari, 2010; Ramadhan, 2011).

### 2.5.3 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Media Nutrient Agar (NA) disiapkan untuk uji pendahuluan antibakteri isolat kapang endofit dengan melarutkan 20 g serbuk NA dalam 1 liter aquadest kemudian dihomogenkan dengan pemanasan hingga larut. Larutan media yang telah homogen kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, dan setelah itu didinginkan hingga mencapai suhu sekitar 45–50 °C sebelum digunakan sebagai media untuk pengujian bakteri uji (Mpila dkk, 2012)

### 2.5.4 Pembuatan Media NA Miring

Media Nutrient Agar (NA) dipersiapkan dengan menimbang serbuk NA sejumlah 20 gram dan dilarutkan dalam aquadest hingga mencapai volume 1 liter. Larutan media kemudian dihomogenkan dengan pengadukan dan pemanasan sampai semua komponen larut, lalu media pindahkan ke tabung reaksi steril masing-masing 5 ml. Media ini disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit, kemudian didiamkan pada suhu ruangan sekitar  $\pm 30$  menit sampai media mengeras pada kemiringan sekitar 30°. Media agar miring hasil ini digunakan untuk peremajaan bakteri uji. (Lay, 1994, Mpila dkk, 2012).

### 2.5.5 Pembuatan Media PDY (*Potato Dextrose Yeast*) Broth

Pembuatan PDY diawali dengan menyiapkan *Potato Dextrose Broth* (PDB) sintetik sebanyak 40 gram dalam 1 liter aquadest diaduk hingga mendidih, kemudian ditambah dengan 2 gram *yeast extract* sebagai sumber nitrogen, kemudian dihomogenkan. Campuran media kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit sebelum digunakan dalam proses fermentasi kapang endofit

### 2.5.6 Pembuatan Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)

Pembuatan media dilakukan dengan melarutkan 34 gram serbuk MHA sintetik ke dalam 1 liter aquadest, kemudian dipanaskan hingga homogen dan media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit

sebelum digunakan untuk pengujian bakteri (Adawiyah, 2013).

## **2.6 Isolasi jamur endofit**

### **2.6.1 Persiapan sampel daun**

Permukaan daun yang telah diperkecil menjadi bagian-bagian kecil, disterilkan berdasarkan Petrini dan Dreyfuss yang dimodifikasi (Petrini 1981). Bagian tanaman yang digunakan sebagai sampel dibilas dengan air mengalir, tween 20, etanol (70%), dan natrium hipoklorida (1:3). Selanjutnya, bagian tanaman dibilas dengan etanol 70% dan air suling steril, kemudian dikeringkan (Kusmiati et al. 2024; Rante et al. 2021).

### **2.6.2 Isolasi dan Pemurnian Jamur Endofit**

Setelah disterilkan, daun dipotong menjadi potongan berukuran 1 cm dengan menggunakan pisau steril. Daun-daun tersebut kemudian ditempatkan pada media sintetik (PDA) steril yang telah ditambahkan 0,05% kloramfenikol dan dibiarkan diinkubasi selama lima sampai tujuh hari pada suhu kamar (25°C). Diamati pertumbuhan jamur di sekitar daun tanaman, yang merupakan tanda perkembangan jamur endofit (Rante et al. 2017).

Setelah masa inkubasi 5-7 hari pada suhu 25°C, jamur yang hidup di sekitar daun tanaman disubkultur pada media (PDA) yang di campur dengan kloramfenikol 0,05%. Setelah itu diamati bentuk dan warna koloni yang terbentuk pada media hingga diperoleh koloni murni. Setiap koloni dengan variasi bentuk dan warna dipindahkan kembali pada media PDA yang baru (Rante et al. 2021).

## **2.7 Uji pendahuluan Antibakteri dan Antijamur jamur endofit**

Kultur jamur endofit yang sudah siapakan dilakukan Uji pendahuluan /Antagonis untuk melihat aktivitas dari masing-masing kultur yang di dapat.

### **2.7.1 Peremajaan bakteri dan jamur Uji**

Peremajaan kultur mikroba uji dilakukan dengan menginokulasikan satu ose biakan ke media agar miring (NA untuk bakteri, PDA untuk jamur), kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk bakteri dan 25 °C selama tiga hari untuk jamur. Perlakuan ini diterapkan pada semua jenis mikroba uji (Siregar, 2009; Kursia dkk, 2016).

### **2.7.2 Uji pendahuluan antibakteri dan antijamur**

Kultur jamur endofit ditempatkan dalam cawan petri dengan bakteri dan jamur patogen pada media PDA dan MHA, cara kerjanya menyerupai difusi agar dengan paperdisk. Cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 72 jam pada suhu 25°C.(Rante et al. 2017).

Kemudian pengujian antagonis dilanjutkan dengan fermentasi kecil sebanyak 20 mL dari kultur jamur endofit selama 21 Hari. Pengujian dilakukan dengan mengambil 20 µl bagian fermentasi kecil pada hari ke 14, 18 dan 21 hari yang

kemudian dimasukkan kedalam sumuran dengan bakteri dan jamur patogen pada media PDA dan MHA. Cawan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan 72 jam pada suhu 25°C.

## **2.8 Identifikasi dan Karakterisasi Jamur Endofit**

### **2.8.1 Identifikasi Berdasarkan RNA dan DNA metode Polymerase Chain Reaction atau PCR**

#### *Ekstraksi DNA, Amplifikasi*

Ekstraksi DNA, pengurutan, dan BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) dilakukan sesuai dengan protokol. Ekstraksi DNA dilakukan dengan menggunakan Quick-DNA Magbead Plus Kit. Selain itu, daerah internal transcribed spacer (ITS) dari gen rRNA digunakan untuk mengkarakterisasi jamur dengan amplifikasi PCR. Set primer universal ITS, yang mengapit daerah ITS 1 dan ITS 4, juga digunakan. Urutan nukleotida primer ITS 1 adalah 5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', dan primer ITS 4 adalah 3'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-5'. PCR dilakukan dalam PCR System Thermal Cycler (Takara, Jepang) dengan program yang terdiri dari denaturasi awal dalam 1 siklus selama 3 menit pada suhu 95°C yang melibatkan 35 siklus (denaturasi selama 15 detik pada suhu 95°C, penempelan (annealing) selama 30 detik pada suhu 52°C, dan perpanjangan (extension) selama 45 detik pada suhu 72°C). Perpanjangan akhir dilakukan dalam 3 menit pada suhu 72°C, dan pendinginan pada suhu 4°C selama beberapa saat. Secara keseluruhan, proses PCR dilakukan dalam 38 siklus.

#### *Elektroforesis*

Satu gram gel agarosa 2% dilarutkan ke dalam 100 mL labu Erlenmeyer yang berisi TBE, lalu dipanaskan di microwave selama 2 menit sampai mendidih, ditambahkan 8 µL etidium bromida. Setelah terbentuk cairan gel, dituangkan ke dalam pencetakan agarosa tunggu memadat. Dimasukkan 8 µL produk PCR yang dicampur dengan 2 µL larutan loading dye, ada beberapa sampel yang telah masukkan ke dalam sumuran pada agarose yang terendam dalam tangki yang berisi TBE Buffer. Proses elektroforesis dimulai pada voltase 100 volt selama 50 menit. Lapisan kemudian diamati di bawah sinar UV- Transluminator.

#### *Pengurutan dan Identifikasi Spesies menggunakan BLAST*

Proses sekuensing terhadap sampel dilakukan oleh 1st Base melalui PT. Genetika Indonesia menggunakan metode Single Pass DNA Sequencing, di mana pembacaan urutan DNA hanya dilakukan satu kali dengan primer yang sama seperti pada amplifikasi PCR. Data sekuens yang diperoleh selanjutnya diproses dan dianalisis menggunakan perangkat lunak BioEdit untuk memperbaiki dan menyusun urutan nukleotida. Hasil sekuensing tersebut kemudian dianalisis menggunakan alat Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) untuk membandingkan urutan DNA sampel dengan urutan yang tersimpan dalam basis data global, sehingga dapat mengidentifikasi jenis jamur berdasarkan kesamaan sekuen. Hasil BLAST disajikan dalam parameter Query Coverage dan Maximum Identity, di mana Query Coverage menunjukkan persentase panjang nukleotida dalam urutan sampel yang berhasil disejajarkan dengan urutan dalam database, sedangkan Maximum Identity merupakan persentase tertinggi kecocokan antara urutan sampel dan urutan database yang disejajarkan oleh algoritma BLAST.

### *Analisis Filogenik*

Data tersebut kemudian diproses untuk analisis filogenetik menggunakan aplikasi MEGA 12 di Windows 11.

### **2.8.2 Karakterisasi berdasarkan morfologi**

Identifikasi makroskopis isolat jamur dilakukan untuk mengetahui morfologi koloni dengan cara melihat langsung penampakan koloni, dengan fokus pada bentuk dan warna permukaan koloni serta tepi cawan petri (Rante et al. 2021).

Isolat jamur diambil dengan menggunakan jarum ose dan dipindahkan ke kaca preparat steril. Larutan Lactophenol Cotton Blue ditambahkan dan kemudian diamati secara mikroskopis di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100-400 (Amirullah et al. 2019).

### **2.9 Fermentasi Dan Ekstraksi**

Kultur murni jamur diremajakan pada medium agar miring PDA, diikuti dengan inkubasi pada suhu 25°C selama 7 hari. Inokulum diambil dari media agar miring, dimasukkan ke dalam 8 erlenmeyer yang berisi masing-masing 100 mL media Potato Dextrosa Broth (PDB) yang dilengkapi dengan yeast ekstrak (PDY), Fermentasi dilakukan pada suhu 25°C dalam kondisi terkendali selama 18 hari (Burhamzah et al. 2020).

Setelah fermentasi, kultur disaring dan miselia serta cairan kultur dipisahkan. Selanjutnya, etil asetat (1:1 v/v) ditambahkan ke dalam cairan kultur dalam corong pemisah di goyangkan selama 20 menit. Pelarut etil asetat dan air yang diekstraksi kemudian diuapkan menggunakan rotary evaporator untuk menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak disimpan untuk digunakan pada tahap percobaan selanjutnya (Peterson et al. 2005).

### **2.10 Uji Antimikroba**

Isolat jamur endofit yang sudah di ekstraksi menjadi ekstrak kasar kemudian akan di lakukan pengujian aktivitas antimikroba.

#### **2.10.1 Mikroorganisme**

Strain bakteri *P. aeruginosa* (ATCC 27853) dan *S. aureus* (ATCC 2913) digunakan sebagai kultur uji pada NA dan MHA. Kultur bakteri pertama kali ditempatkan pada NA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, strain jamur *Candida albican* (ATCC 14053) dan *Malassezia furfur* (ATCC 14521) digunakan sebagai kultur uji pada PDA dan SDA dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 72 jam.

#### **2.10.2 Persiapan sampel**

Larutan stok diencerkan dengan sekitar 400 mg etil asetat dan ekstrak air dalam 2 mL DMSO 5% (20%). Dibuat konsentrasi sampel 2,5, 5, 10 dan 20%.

### **2.10.2 Pengujian Antibakteri Dengan Metode Kertas Cakram**

Pada pengujian antibakteri Kultur bakteri dengan Optical Density 0,5 ( $\lambda$  600 nm) dipipet sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam Mueller Hinton (Himedia) hangat, kemudian dihomogenkan kemudian dituang merata ke dalam cawan Petri dan didiamkan hingga memadat. Selanjutnya, cakram kertas diletakkan di permukaan media padat tersebut. Sedangkan pada pengujian antijamur kultur jamur dengan perbandingan MC farland 1 dipipet sebanyak 100  $\mu$ L ke dalam Potato dextrose agar (Himedia) hangat, kemudian dihomogenkan kemudian dituang merata ke dalam cawan Petri dan didiamkan hingga memadat. Larutan uji ekstrak etil asetat dan ekstrak Air masing-masing dipipet sebanyak 20  $\mu$ L ke dalam cakram kertas, dilanjutkan dengan meletakkan Kontrol positif (Gentamisin/Ketokonazole) dan kontrol negative (DMSO 5%). Cawan petri kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam untuk bakteri dan 25 °C selama 72 jam pada jamur, dan diameter zona inhibisi (DIZ) diukur. Pengukuran zona hambat dilakukan untuk tiga replikasi sampel, dan hasilnya dinyatakan sebagai rata-rata dari tiga kali pengukuran ulangan (Eltawaty et al. 2023) .

### **2.11 Analisis LC–MS/MS**

Ekstrak etil asetat dan Air dari Isolat diujikan ke dalam instrumen LC-MS/MS untuk tujuan mengidentifikasi senyawa metabolit. Pengujian spektrometri massa beresolusi tinggi dilakukan menggunakan unit ultra-performance liquid chromatography (UPLC) (LC: ACQUITY UPLC H-Class System, Waters, USA) dan Spektrometer Massa (Xevo G2-S QToF, Waters, USA). Ini melibatkan penggunaan kolom C18 (1,8  $\mu$ m 2,1 x 100 mm, ACQUITY UPLC H-Class System, Waters, USA) pada temperatur 50°C (kolom) dan 25°C (ruangan). Analisis LC-MS menggunakan fase gerak yaitu air + 5 mM amonium format (A) dan asetonitril + 0,05% asam format (B), dengan laju alir 0,2 mL/menit (gradien bertahap) berjalan selama 23 menit (lihat slide moving fase) dan volume injeksi 5  $\mu$ L (awalnya disaring melalui filter jarum suntik 0,2  $\mu$ m). Analisis spektrometri massa (MS) dilakukan menggunakan ionisasi elektro spray (ESI) dalam mode positif (+) dengan rentang massa 50-1200 m/z dan desolvasi temperatur masing-masing 100 dan 350°C. Selain itu laju aliran gas kerucut dan desolvasi 0 L/jam dan 793 L/jam digunakan secara bersamaan, sedangkan energy tumbukan bervariasi 4 volt (energi rendah) dan 25-60 volt (energi tinggi) (Burhan et al. 2024).

### **2.12 Studi in silico senyawa Antimikroba**

Studi docking menggunakan perangkat lunak Autodock VINA ( <https://vina.scripps.edu/> ). Struktur kristal SOD diperoleh dari Protein Data Bank. Struktur ligan diekstraksi dari basis data PubChem dalam format SDF dan dikonversi ke format PDB menggunakan PyMOL-2.5.5 ( <https://pymol.org/2/> ). Siapkan protein dan ligan menggunakan biovia ( Discovery studio 2024 ) untuk dipreparasi , sebelum mengikat kompleks ligan ke target. Docking yang ditargetkan menggunakan kotak blind dengan dimensi maksimum . Protein dalam format PDBQT digunakan sebagai

masukannya untuk program docking. Lakukan simulasi docking ligan untuk setiap senyawa, dan tampilkan hasil docking menggunakan biovia ( Discovery studio 2024 ) untuk memperoleh informasi tentang interaksi pengikatan dan memvisualisasikan proses docking dalam bentuk 3D.

## **2.13 Analisis dan prediksi ADMET secara komputasional**

### **2.13.1 Analisis toksikologi komputasional**

Senyawa AM dianalisis toksisitasnya dengan menggunakan ProTox-II ([https://tox.charite.de/protox3/index.php?site=compound\\_input](https://tox.charite.de/protox3/index.php?site=compound_input)) . kode SMILES dari senyawa yang diperoleh dari PubChem ( <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> ). opsi "start Tox Prediction" dipilih untuk memperoleh hasil data prediktif.

### **2.13.2 Studi prediksi sifat ADME dan farmakokinetik secara komputasional**

Dilakukan melalui situs web Swiss ADME ( <http://www.swissadme.ch/index.php> ) dengan memasukkan kode SMILES dari senyawa yang diperoleh dari PubChem ( <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> ). Kode SMILES dari senyawa dimasukkan, dan opsi "run" dipilih untuk memperoleh hasil data prediktif. Analisis sifat farmakokinetik berdasarkan ADME mencakup parameter seperti penyerapan GI, permeabilitas BBB, dan Log Kp. selanjutnya, analisis kemiripan obat berdasarkan ADME dilakukan untuk memastikan kriteria aturan Lipinski dan skor bioavailabilitas.

## **2.14 Analisis Data**

Analisis kualitatif senyawa dilakukan dengan menggunakan MS-DIAL versi 3.82, yang meliputi proses diskriminasi puncak, penyaringan, dan penyelarasan. Data mentah MS dalam format \*.raw diimpor ke Abf Converter 4.0.0 untuk mengubahnya menjadi format \*.abf dan MS FileReader 2.2.62 juga digunakan [14]. Parameter untuk deteksi puncak termasuk tinggi puncak minimum 10.000 (Orbitrap), metode penghalusan menggunakan rata-rata bergerak tertimbang linier, tingkat penghalusan, dan lebar puncak minimum. Identifikasi menggunakan basis data internal (File MSP) dalam MS/MS positif dan negative mode (<http://prime.psc.riken.jp/compms/msdial/main.html#MSP>) (diakses pada 5 juli 2025), dengan cut off skor 70%, jenis adduct [M + H]<sup>+</sup>, dan penyelarasan dilakukan dengan menggunakan control kualitas referensi