

**ANALISIS FILOGENETIK LEMPUYANG LOKAL (*Zingiber zerumbet*)
BERBASIS GEN Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large
subunit (*rbcL*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

(Skripsi)

Oleh

**YUYUN KUMALASARI
NPM. 2217061051**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

ABSTRAK

ANALISIS FILOGENETIK LEMPUYANG LOKAL (*Zingiber zerumbet*) BERBASIS GEN Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (*rbcL*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*

Oleh

YUYUN KUMALASARI

Lempuyang merupakan tanaman rimpang dari famili Zingiberaceae yang memiliki potensi besar sebagai agen antimikroba alami, namun identifikasi taksonominya seringkali rancu jika hanya berdasarkan karakter morfologi. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi secara molekuler sampel Lempuyang asal Lampung Barat menggunakan marka gen *rbcL* serta menentukan aktivitas antibakterinya terhadap *Staphylococcus aureus*. Metode penelitian meliputi isolasi DNA, amplifikasi gen *rbcL*, analisis filogenetik dengan metode *Neighbor-Joining*, serta uji antibakteri melalui metode *Kirby-Bauer* dan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Hasil analisis filogenetik mengonfirmasi bahwa sampel Lempuyang asal Lampung Barat terbukti merupakan spesies *Zingiber zerumbet* karena berada dalam satu klade monofiletik dengan *Zingiber zerumbet* dari database GenBank. Spesies tersebut kemudian diberi nama *Zingiber zerumbet* Unila dengan nomor akses GenBank LC903195.1. Pada uji aktivitas antibakteri metode *Kirby-Bauer*, ekstrak Lempuyang menunjukkan pembentukan zona bening pada media agar dengan efektivitas yang menyerupai kontrol positif. Nilai MIC ditetapkan pada konsentrasi 2.500 ppm yang menunjukkan persentase penghambatan yang signifikan terhadap pertumbuhan bakteri. Penelitian ini menyimpulkan bahwa *Zingiber zerumbet* Unila (LC903195.1) memiliki identitas genetik yang stabil dan potensi aktivitas antibakteri yang efektif sebagai kandidat agen antimikroba alami.

Kata kunci: *Zingiber zerumbet*, *rbcL*, *Staphylococcus aureus*, *Kirby-Bauer*, MIC.

ABSTRACT

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF LOCAL LEMPUYANG (*Zingiber zerumbet*) BASED ON THE Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (*rbcL*) GENE AND ANTI-BACTERIAL ACTIVITY TEST AGAINST *Staphylococcus aureus*

By

YUYUN KUMALASARI

Lempuyang is a rhizome plant from the Zingiberaceae family that holds great potential as a natural antimicrobial agent; however, its taxonomic identification is often ambiguous when based solely on morphological characteristics. This study aims to molecularly identify Lempuyang samples from West Lampung using the *rbcL* gene marker and to determine their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*. Research methods included DNA isolation, *rbcL* gene amplification, phylogenetic analysis using the Neighbor-Joining method, and antibacterial testing via the Kirby-Bauer method and Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The results of the phylogenetic analysis confirmed that the Lempuyang sample from West Lampung was indeed the species *Zingiber zerumbet*, as it was in a monophyletic clade with *Zingiber zerumbet* from the GenBank database. This species was subsequently named *Zingiber zerumbet* Unila with GenBank accession number LC903195.1. In the Kirby-Bauer antibacterial activity test, the Lempuyang extract exhibited the formation of clear zones on agar media with efficacy comparable to the positive control. The MIC value was determined at a concentration of 2,500 ppm, indicating a significant percentage of inhibition against bacterial growth. This study concluded that *Zingiber zerumbet* Unila (LC903195.1) possesses stable genetic identity and effective antibacterial activity potential as a candidate for a natural antimicrobial agent.

Keywords: *Zingiber zerumbet*, *rbcL*, *Staphylococcus aureus*, Kirby-Bauer, MIC.

**ANALISIS FILOGENETIK LEMPUYANG LOKAL (*Zingiber zerumbet*)
BERBASIS GEN Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large
subunit (*rbcL*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP
*Staphylococcus aureus***

Oleh

YUYUN KUMALASARI

Skripsi

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar
SARJANA SAINS**

Pada

**Program Studi S1 Biologi Terapan
Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



**FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS LAMPUNG
BANDAR LAMPUNG
2026**

Judul Skripsi

: **ANALISIS FILOGENETIK
LEMPUYANG LOKAL (*Zingiber
zerumbet*) BERBASIS Gen Ribulose-1,5-
Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase
large subunit (*rbcL*) DAN UJI
AKTIVITAS ANTIBAKTERI
TERHADAP *Staphylococcus aureus***

Nama Mahasiswa

: **Yun Kumalasari**

Nomor Pokok Mahasiswa

: **2217061051**

Program Studi

: **Biologi Terapan**

Fakultas

: **Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**



1. Komisi Pembimbing

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.
NIP. 197912302008121001

Dr. Kusuma Handayani, M.Si.
NIP. 197808192008012018

2. Kepala Jurusan Biologi

Dr. Jani Master, S.Si., M.Si.
NIP. 198301312008121001

MENGESAHKAN

1. Tim Penguji

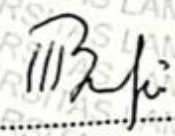
Ketua Penguji : **Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M.Si.**



Anggota Penguji : **Dr. Kusuma Handayani, M.Si.**



Penguji Utama : **Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc.**



2. Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si.
NIP. 197110012005011002

Tanggal Lulus Ujian Skripsi : **29 April 2026**

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yuyun Kumalasari
NPM : 2217061051
Jurusan : Biologi
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Perguruan Tinggi : Universitas Lampung

Menyatakan dengan sebenarnya dan sejujurnya, bahwa skripsi saya yang berjudul

“ANALISIS FILOGENETIK LEMPUYANG LOKAL (*Zingiber zerumbet*) BERBASIS GEN Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (*rbcL*) DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI TERHADAP *Staphylococcus aureus*”

Merupakan bagian dari penelitian Bapak Dr. Wawan Abdullah Setiawan, M.Si. dengan judul “Analisis Molekuler Lempuyang Lokal (*Zingiber zerumbet*) Asal Lampung Barat Berbasis Sekuens Multi Lokus *rbcL*, ITS dan 18S”. Baik data maupun pembahasannya adalah benar karya saya sendiri yang saya susun dengan mengikuti norma dan etika akademik yang berlaku, serta bukan merupakan hasil duplikasi atau jiplakan dari karya ilmiah yang pernah ditulis oleh orang lain kecuali, sebagai acuan yang dicantumkan dalam daftar pustaka.

Dengan surat pernyataan ini saya buat dan dapat dipertanggungjawabkan. Apabila dikemudian hari terbukti pernyataan ini tidak benar, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar sarjana, maupun tuntutan hukum.

Bandar Lampung, 04 Mei 2026
Yang Menyatakan,



Yuyun Kumalasari
NPM. 2217061051

RIWAYAT HIDUP



Penulis dilahirkan di Desa Rantau Fajar, Kecamatan Raman Utara, Kabupaten Lampung Timur pada tanggal 30 Mei 2004, sebagai anak semata wayang dari pasangan Bapak Sudarwanto dan Ibu Widowati. Pendidikan formal pertama dimulai di taman kanak-kanak Raudlatul Athfal (RA) Khodijah Rejo Asri, Kecamatan Seputih Raman, Lampung Tengah pada tahun 2009 hingga 2010.

Penulis kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Dasar di SDN 2 Rejo Asri (2010-2016), Sekolah Menengah Pertama di SMPN 2 Kota Gajah (2016-2019), dan Sekolah Menengah Atas di SMAN 1 Kota Gajah (2019-2022). Pada tahun 2022 penulis resmi terdaftar sebagai salah satu mahasiswa Program Studi S1 Biologi Terapan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung melalui jalur masuk Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri (SNMPTN). Penulis kemudian berhasil lulus dan mendapatkan gelar Sarjana Sains pada tahun 2026.

Selama masa perkuliahan, penulis aktif mengembangkan kapasitas diri melalui berbagai organisasi dan kegiatan volunteer. Di lingkungan internal kampus, penulis pernah menjadi bagian dari Himpunan Mahasiswa Biologi (HIMBIO) FMIPA Unila sebagai anggota Bidang Ekspedisi pada periode 2023 dan 2024, serta Koordinator Divisi Dana dan Usaha di kegiatan Pekan Konservasi Sumber Daya Alam (PKSDA) XXVIII pada tahun 2024. Selain itu, penulis juga

berkontribusi di Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) Universitas Lampung sebagai anggota Kementrian Ekonomi Kreatif (EKRAF) pada periode 2023, dan Badan Eksekutif Mahasiswa (BEM) FMIPA Unila sebagai Kepala Biro Ekonomi dan Finansial (EKFIS) pada periode 2025. Di luar kampus, penulis juga aktif mengikuti volunteer di Volunteer Senyum Anak Nusantara (SAN) Chapter Lampung sebagai anggota divisi Pengembangan Sumber Daya Manusia (PSDM) pada periode 2023 dan 2024. Penulis juga menjadi salah satu finalis Duta Baca Perpustakaan Unila pada tahun 2025.

Pengalaman profesional dan pengabdian masyarakat penulisawali dengan melaksanakan Praktik Kerja Lapangan (PKL) di Balai Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner (BKHKMV) Jawa Barat pada awal tahun 2025. Dalam kegiatan tersebut, penulis menyusun laporan ilmiah berjudul “**Deteksi *Brucella abortus* pada Serum Sapi Menggunakan Metode *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) di Balai Kesehatan Hewan dan Kesehatan Masyarakat Veteriner Provinsi Jawa Barat**”. Selanjutnya, pada pertengahan tahun 2025, penulis melaksanakan program Kuliah Kerja Nyata (KKN) selama 40 hari di Kelurahan Gedong Meneng Baru, Kecamatan Rajabasa, Kota Bandar Lampung, Provinsi Lampung sebagai wujud implementasi ilmu di masyarakat.

PERSEMBAHAN

Alhamdulillahil'alaamiin... Segala Puji bagi Allah SWT, Sang Pemilik Semesta, yang atas limpahan rahmat dan karunia-Nya telah memberikan kekuatan serta keteguhan hati hingga aku dapat menyelesaikan karya ini dengan baik.

Sebagai wujud syukur, hormat, dan rasa terima kasih yang melampaui kata-kata, maka ku persembahkan karya sederhana ini kepada:

Ayah dan Ibuku tercinta, dua malaikat tanpa sayap yang menjadi pelita sekaligus alasan terbesarku untuk terus berjuang. Terima kasih atas cinta yang tak bertepi, dukungan yang tak pernah surut, serta doa-doa tulus yang selalu kalian langitkan demi langkahku. Terima kasih telah menjadi orang tua yang sempurna dan selalu menjadi tempatku untuk pulang.

Terima kasih pipi.. Terima kasih mimi..

MOTTO

“Maka sesungguhnya beserta kesulitan ada kemudahan.”

(QS. Ash-Sharh: 5)

"Kegagalan hanyalah bayangan dari sebuah keberanian, namun berhenti sebelum mencoba adalah kekalahan yang sesungguhnya."

SANWACANA

Alhamdulillahirabbil'alamin. Segala puji bagi Allah SWT, Sang Pemilik ilmu, yang atas rahmat dan ketetapan-Nya telah memberikan cahaya kekuatan, kesabaran, serta keteguhan hati kepada Penulis hingga naskah skripsi berjudul **“Analisis Filogenetik Lempuyang Lokal (*Zingiber zerumbet*) Berbasis Gen *Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (rbcL)* dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap *Staphylococcus aureus*”** ini dapat dirampungkan. Skripsi ini merupakan hasil dari proses belajar dan upaya Penulis dalam mengeksplorasi potensi alam melalui sains. Penulis menyadari bahwa selesainya naskah ini tidak lepas dari dukungan, doa, dan bantuan berbagai pihak yang telah membantu Penulis melewati setiap tahapan prosesnya. Oleh karena itu, Penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Lusmeilia Afriani, D.E.A., I.P.M., ASEAN Eng., selaku Rektor Universitas Lampung;
2. Bapak Dr. Eng. Heri Satria, S.Si., M.Si., selaku Dekan FMIPA, Unila;
3. Bapak Dr. Jani Master, S.Si., M.Si., selaku Ketua Jurusan Biologi, FMIPA, Unila;
4. Ibu Gina Dania Pratami, S.Si., M.Si., selaku Ketua Program Studi Biologi Terapan, Jurusan Biologi, FMIPA, Unila;
5. Bapak Ir. Salman Alfarisi, M.Si. selaku Dosen Pembimbing Akademik. Terima kasih atas dedikasi dan perhatian yang tak pernah putus dalam memantau setiap progres akademik penulis;
6. Bapak Dr. Wawan Abdullah Setiawan, S.Si., M.Si., selaku dosen Pembimbing I. Terima kasih yang tak terhingga atas kepercayaan yang diberikan kepada

penulis untuk mengemban proyek penelitian ini. Terima kasih telah menjadi mentor yang luar biasa, yang senantiasa menantang penulis untuk mempelajari hal-hal baru dan memastikan penulis terus berkembang sebagai ilmuwan muda di setiap tahapan penyelesaian skripsi ini;

7. Ibu Dr. Kusuma Handayani, S.Si., M.Si., selaku dosen Pembimbing II. Terima kasih atas bimbingan, saran, serta dukungan semangatnya selama ini. Setiap ide dan masukan yang Ibu berikan sangat berarti bagi kelancaran dan penyempurnaan naskah skripsi penulis;
8. Bapak Prof. Dr. Bambang Irawan, M.Sc., selaku dosen Pembahas. Terima kasih atas segala saran, kritik membangun, serta masukan yang telah diberikan. Penulis sangat menghargai setiap ketelitian dan ide yang Bapak sampaikan demi penyempurnaan dan kualitas naskah skripsi ini;
9. Bapak dan Ibu dosen serta segenap karyawan di Jurusan Biologi, FMIPA, Unila;
10. Kedua orang tua tercinta, Bapak Sudarwanto dan Ibu Widowati. Terima kasih atas segala doa yang tak pernah putus dan kasih sayang yang selalu menjadi penguat langkah Penulis. Dukungan dan motivasi dari Bapak dan Ibu adalah alasan utama bagi Penulis untuk tetap teguh dan terus melangkah;
11. Ilham Dwi Muliadi, terima kasih telah menjadi sosok yang selalu menjadi titik tenang di tengah segala hiruk-pikuk yang Penulis hadapi. Terima kasih atas kehadirannya yang senantiasa memberikan rasa nyaman dan menjadi ruang bagi Penulis untuk kembali menemukan kekuatan di setiap masa sulit;
12. Keluarga Besar, khususnya kepada Tante Ririn, Bude Heni, Bulek Sri, dan Bulek Diah. Terima kasih atas segala doa, perhatian, dan limpahan semangat yang tiada putusnya. Dukungan tulus yang diberikan telah menjadi energi tambahan bagi Penulis dalam menuntaskan setiap tahapan dalam perjalanan perkuliahan ini;
13. Sahabatku, Amanda Grescia dan Annisa Nur Umayroh. Terima kasih telah menjadi rekan seperjuangan yang luar biasa dalam mengarungi setiap dinamika tahapan perkuliahan. Terima kasih atas solidaritas, diskusi, serta setiap tawa dan semangat yang dibagikan, yang telah membuat perjalanan panjang ini terasa jauh lebih bermakna bagi Penulis;

14. Rekan-rekan Matelab INA LAB tercinta, terima kasih atas sinergi dan solidaritas yang luar biasa sebagai teman seperjuangan di laboratorium. Terima kasih telah menjadi bagian dari setiap proses, saling membantu dalam setiap kendala penelitian;
15. Rekan satu atap Aisyah, Alisa, dan Kika. Terima kasih atas kebersamaan dan dukungannya selama ini. Terima kasih telah menjadi teman berbagi cerita dan penyemangat di kehidupan sehari-hari Penulis;
16. Teman-teman Biologi angkatan 2022. Terkhusus Biologi Terapan C. Terima kasih atas semua kebersamaan dan canda tawa selama masa kuliah yang telah memberikan warna tersendiri pada cerita hidup penulis;
17. Kak Dinda dan Kak Diana serta semuanya yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini yang tidak bisa disebutkan satu per satu.
18. Terimakasih dan Apresiasi tertinggi untuk diri sendiri. *'Manusia-manusia kuat itu kita, jiwa-jiwa yang kuat itu kita'*. Terima kasih karena telah membuktikan bahwa tidak ada tantangan yang terlalu besar bagi jiwa yang menolak untuk patah;
19. Almamater tercinta, Universitas Lampung.

Semoga setiap kebaikan yang telah diberikan menjadi amal jariyah dan mendatangkan keberkahan dari Allah SWT. Penulis berharap karya sederhana ini dapat memberikan manfaat luas bagi perkembangan ilmu pengetahuan di masa mendatang.

Bandar Lampung, 5 Mei 2026

Yuyun Kumalasari

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
LEMBAR PENGESAHAN	v
RIWAYAT HIDUP.....	vi
PERSEMBAHAN	viii
MOTTO	ix
SANWACANA	x
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR.....	xvi
I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan.....	3
1.3 Hipotesis.....	3
1.4 Kerangka Pikir.....	4
II. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Lempuyang.....	6
2.1.1 Morfologi Lempuyang	7
2.1.2 Manfaat Lempuyang	9
2.1.3 Klasifikasi Lempuyang	10
2.2 Ekstrak Etanol Lempuyang	10
2.2.1 Ekstrak Etanol 100% Tanaman Lempuyang.....	12
2.3 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	14

2.3.1	Morfologi dan Sifat.....	16
2.3.2	Klasifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.4	Mekanisme Penghambatan Bakteri oleh Senyawa Bioaktif	18
2.5	Pengujian Antibakteri.....	20
2.5.1	Pengujian Antibakteri Metode <i>Kirby-Bauer</i>	21
2.5.2	Pengukuran MIC Menggunakan <i>ELISA Reader</i>	21
2.6	<i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	23
2.6.1	Primer <i>rbcL</i>	25
2.6.2	Metode Sekuensing: Sanger Sekuensing	26
III. METODE PENELITIAN.....		29
3.1	Waktu dan Tempat	29
3.2	Bahan dan Alat	29
3.3	Rancangan Percobaan	30
3.4	Metode.....	31
3.4.1	Sterilisasi.....	31
3.4.2	Ekstraksi DNA Lempuyang	32
3.4.3	Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA Hasil Ekstraksi.....	33
3.4.4	Amplifikasi Gen <i>rbcL</i> dengan metode PCR	34
3.4.5	Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA dengan Elektroforesis.....	34
3.4.6	Sekuensing Amplikon Hasil PCR.....	35
3.4.7	Ekstraksi Lempuyang dengan Etanol 100%	35
3.4.8	Peremajaan Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	36
3.4.9	Pengujian Aktivitas Antibakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Metode <i>Kirby-Bauer</i>	36
3.4.10	Pengukuran Aktivitas Antibakteri dengan <i>ELISA Reader</i>	37
3.4.11	Analisis Filogenetik.....	41
3.4.12	Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri.....	41
3.5	Diagram Alir Penelitian	43
IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		44
4.1	Hasil Analisis DNA Lempuyang.....	44
4.1.1	Visualisasi DNA Lempuyang.....	45
4.1.2	Pohon Filogenetik Lempuyang (<i>Zingiber zerumbet</i> Unila).....	47
4.2	Hasil Uji Antibakteri Lempuyang Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i>	51
4.2.1	Hasil Uji <i>Kirby-Bauer</i>	51
4.2.2	Hasil Uji <i>Minimum Inhibitory Concentrate (MIC)</i>	54

V. PENUTUP	61
5.1 Kesimpulan.....	61
5.2 Saran.....	61
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	72

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Mekanisme Kerja Senyawa Bioaktif	19
2. Rancangan Percobaan Faktor 1	30
3. Rancangan Percobaan Faktor 2.....	31
4. Data Map Sampel pada <i>Microplate Reader</i>	38
5. Hasil Nanospektrofotometri Sampel Ekstraksi DNA Lempuyang	44
6. Urutan Nukleotide DNA <i>Zingiber zerumbet</i> Unila.....	46
7. Perhitungan Zona Hambat Aktivitas Antibakteri.....	53
8. Hasil perhitungan %Penghambatan Bakteri	55
9. Hasil Uji Lanjut DMRT (<i>Post-Hoc test</i>).....	57

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun Lempuyang	8
2. Bunga Lempuyang	8
3. Rimpang Lempuyang	9
4. Morfologi Mikroskopis <i>Staphylococcus aureus</i>	16
5. Morfologi Makroskopis <i>Staphylococcus aureus</i> pada Media MSA	17
6. Morfologi Makroskopis <i>Staphylococcus aureus</i> pada Media Agar Darah	17
7. Reaksi Berantai Polimerase	24
8. Diagram Alir Penelitian	43
9. Visualisasi DNA Gen <i>rbcL</i> <i>Zingiber zerumbet</i>	45
10. Hasil <i>Blast</i> NCBI	48
11. Pohon Filogenetik <i>Zingiber zerumbet</i> Unila Menggunakan Gen <i>rbcL</i>	49
12. Hasil Zona Bening Uji <i>Kirby-Bauer</i>	52
13. Grafik Aktivitas Penghambatan Bakteri pada Uji MIC	58

I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lempuyang (*Zingiber zerumbet*) merupakan salah satu komoditas tanaman obat penting dari famili Zingiberaceae yang memiliki nilai ekonomi tinggi, khususnya di Provinsi Lampung. Rimpang Lempuyang dikenal luas dalam pengobatan tradisional dan industri herbal karena kandungan senyawa aktifnya, seperti *zerumbon* (Sanjaya dan Ratnawati, 2017). Potensi ini didukung oleh kondisi geografis wilayah Lampung Barat yang dikenal sebagai salah satu sentra produksi pertanian dan pusat keanekaragaman hayati bagi budidaya tanaman rempah (Bappeda Lampung Barat, 2023). Namun, tantangan muncul akibat kompleksitas taksonomi pada famili Zingiberaceae yang seringkali menyulitkan pembedaan antarspesies. Selama ini, identifikasi masih bergantung pada karakter morfologi yang memiliki keterbatasan karena seringkali tidak akurat akibat tingginya kemiripan fenotip.

Sebagai solusi, identifikasi berbasis filogenetik diperlukan untuk mengatasi ambiguitas tersebut. Sejalan dengan pendapat Afriani *et al.* (2023), analisis filogenetik melalui pendekatan molekuler merupakan metode yang jauh lebih efektif dan akurat untuk identifikasi taksonomi. Melalui pendekatan ini, hubungan filogenetik dapat mengungkap kekerabatan yang jelas antara spesies lempuyang dengan spesies lain

dalam famili Zingiberaceae. Informasi tersebut tidak hanya krusial bagi kepastian taksonomi, tetapi juga dapat digunakan untuk mengeksplorasi potensi senyawa bioaktif baru serta memahami evolusi senyawa-senyawa yang sudah diketahui (Zanuba *et al.*, 2024).

Pendekatan *DNA Barcoding* menawarkan solusi efektif dan terstandarisasi untuk klasifikasi serta identifikasi spesies di tingkat molekuler (Hebert *et al.*, 2003). Dalam konteks taksonomi tumbuhan, gen kloroplas seperti *matK* dan *rbcL* (*Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit gene*) telah diakui secara global sebagai penanda inti (CBOL Plant Working Group, 2009). Gen *rbcL* memiliki tingkat universalitas yang tinggi dan terbukti efektif dalam memecahkan hubungan kekerabatan dalam ordo Zingiberales. Keandalan lokus ini diperkuat oleh studi Rahmayani *et al.* (2021) pada kerabat dekat lempuyang, *Zingiber loerzingii*, yang menunjukkan bahwa gen *rbcL* berhasil memvalidasi posisi filogenetiknya dengan *Zingiber zerumbet* sebagai kelompok *sister taxa*. Oleh karena itu, penggunaan penanda genetik *rbcL* menjadi sangat krusial untuk memvalidasi identitas genetik lempuyang yang dikoleksi dari petani Lampung Barat guna menempatkannya secara pasti dalam peta filogenetik genus *Zingiber*.

Kepastian identitas genetik ini menjadi pondasi penting dalam mengeksplorasi potensi lempuyang (*Zingiber zerumbet*) sebagai sumber antimikroba alami. Berdasarkan temuan Zanuba *et al.* (2024), rimpang lempuyang mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti zerumbon, minyak atsiri, flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, saponin, dan steroid. Secara mekanistik, senyawa-senyawa ini membunuh mikroba melalui jalur yang sistematis; flavonoid dan tanin bekerja dengan mengganggu integritas membran sel serta mendenaturasi protein bakteri, sementara alkaloid mampu mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada dinding sel sehingga menyebabkan lisis atau kematian sel (Cushnie and Lamb, 2005; Xie *et al.*, 2015).

Potensi antibakteri ini didukung oleh penelitian Rohmah dan Rini (2022) yang menunjukkan bahwa ekstrak lempuyang gajah memiliki aktivitas kuat terhadap *Streptococcus pneumoniae* dengan zona hambat mencapai $43,9 \pm 3,6$ mm pada konsentrasi 100%. Untuk memperkuat data aktivitas tersebut, metode *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) diperlukan guna menentukan ambang batas konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara nyata (Chikezie, 2017). Meskipun penelitian terdahulu telah banyak dilakukan, pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol murni lempuyang lokal asal Lampung Barat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* masih belum tersedia. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menganalisis filogenetik lempuyang lokal tersebut dan menguji efektivitas ekstraknya terhadap *Staphylococcus aureus* melalui metode *Kirby-Bauer* serta konfirmasi MIC yang diukur secara kuantitatif menggunakan *ELISA Reader*.

1.2 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengidentifikasi filogenetik dari lempuyang yang berasal dari petani Lampung Barat dengan berbasis sekuens *rbcL*.
2. Mengukur aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol rimpang dan daun lempuyang lokal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan metode *Kirby-bauer* dan *Minimum Inhibitory Concentrate* (MIC).

1.3 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Terdapat keragaman genetik antara sampel Lempuyang dengan spesies lempuyang dari *database* GenBank berdasarkan sekuens *rbcL*, sehingga melalui analisis filogenetik didapatkan spesies hasil identifikasi.

2. Ekstrak etanol murni lempuyang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, sehingga terbentuk zona bening yang signifikan (diameter zona bening ≥ 6 mm, menunjukkan aktivitas sedang hingga kuat) dan MIC dapat ditentukan (ada konsentrasi ekstrak yang menghambat pertumbuhan bakteri secara signifikan, dengan nilai MIC rendah seperti < 2 mg/mL).

1.4 Kerangka Pikir

Kerangka pikir dari penelitian ini yaitu, penekanan pada pentingnya lempuyang sebagai tanaman obat, tantangan identifikasi taksonomi, serta potensi antimikrobanya. Lempuyang (*Zingiber zerumbet*) dari famili Zingiberaceae memiliki nilai ekonomi tinggi di Lampung Barat, dengan rimpang kaya senyawa aktif seperti zerumbon. Tanaman ini mendukung pengobatan tradisional dan industri herbal, namun kompleksitas taksonomi memerlukan pendekatan molekuler untuk identifikasi akurat. Identifikasi berbasis morfologi sering tidak akurat karena kemiripan fenotip. Analisis filogenetik melalui DNA Barcoding (misalnya gen *rbcL*) efektif untuk mengungkap kekerabatan spesies, membantu eksplorasi senyawa bioaktif baru dan pemahaman evolusi senyawa yang diketahui.

Lempuyang mengandung senyawa bioaktif seperti zerumbon, minyak atsiri, flavonoid, alkaloid, tanin, terpenoid, saponin, dan steroid, yang berpotensi sebagai antibakteri alami. Studi sebelumnya menunjukkan aktivitas terhadap bakteri seperti *Streptococcus pneumoniae*, dengan zona hambat meningkat seiring konsentrasi ekstrak.

Penelitian ini bertujuan menganalisis filogenetik lempuyang lokal untuk menempatkannya dalam peta filogenetik genus *Zingiber* serta menguji aktivitas antibakteri ekstrak etanol murni terhadap *Staphylococcus aureus* yang belum pernah dilakukan menggunakan metode *Kirby-Bauer* untuk pengukuran zona hambat dan MIC untuk penentuan konsentrasi inhibisi minimum melalui absorbansi kuantitatif dengan ELISA Reader. Melalui

pendekatan ini, penelitian diharapkan memberikan kontribusi bagi konservasi keanekaragaman hayati, pengembangan produk herbal, dan aplikasi medis sebagai sumber antimikroba alami yang efektif.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lempuyang

Lempuyang merupakan salah satu tanaman obat yang banyak dijumpai di berbagai wilayah Indonesia dan telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional. Tanaman ini termasuk dalam genus *Zingiber* dan dikenal memiliki kandungan senyawa bioaktif yang beragam, seperti minyak atsiri, flavonoid, dan senyawa fenolik, yang berperan penting dalam aktivitas farmakologinya, termasuk efek antibakteri dan antioksidan. Keragaman genetik lempuyang cukup tinggi, sehingga komposisi kimia dan potensi biologisnya dapat berbeda antar populasi. Oleh karena itu, pemahaman mengenai karakteristik genetik dan kimiawi lempuyang lokal yang berasal dari petani Lampung Barat sangat penting untuk mendukung pengembangan tanaman ini sebagai sumber bahan obat herbal yang efektif. Selain itu, pemanfaatan lempuyang secara berkelanjutan juga dapat memberikan kontribusi ekonomi bagi masyarakat serta menjaga keberlangsungan sumber daya alam hayati di Indonesia (Andesmora *et al.*, 2022).

Lempuyang, atau *Zingiber zerumbet*, adalah tanaman herbal yang termasuk dalam keluarga Zingiberaceae. Tanaman ini dikenal luas di Indonesia dan memiliki sejarah pemanfaatan yang panjang dalam pengobatan tradisional. Lempuyang sering digunakan dalam berbagai ramuan jamu dan dipercaya memiliki khasiat untuk kesehatan, seperti meningkatkan daya tahan tubuh dan mengatasi masalah pencernaan. Klasifikasi pada lempuyang termasuk dalam genus

Zingiber yang mencakup berbagai spesies jahe. Tanaman ini tumbuh subur di daerah tropis, terutama di hutan-hutan yang lembab. Habitat alaminya meliputi daerah pegunungan dan dataran rendah, dimana ia dapat ditemukan tumbuh liar (Santoso, 2024).

Lempuyang tumbuh subur di habitat tropis dengan kondisi tanah yang gembur, kaya bahan organik, dan memiliki drainase yang baik. Tanaman ini biasanya ditemukan di daerah dataran rendah hingga ketinggian sekitar 1.000 meter di atas permukaan laut, dimana suhu dan kelembaban relatif stabil sepanjang tahun. Lempuyang dapat tumbuh baik di bawah naungan pohon besar maupun di area terbuka dengan sinar matahari yang cukup, meskipun pertumbuhan optimalnya terjadi pada tempat yang teduh sebagian. Habitat alami lempuyang seringkali berupa hutan sekunder, kebun, dan pekarangan rumah, dimana tanaman ini juga dibudidayakan secara luas untuk keperluan pengobatan tradisional dan kuliner. Adaptasi morfologi dan fisiologis lempuyang terhadap lingkungan tropis menjadikannya tanaman yang tahan terhadap berbagai kondisi stres lingkungan, seperti kekeringan ringan dan serangan hama, sehingga mudah dipelihara dan dikembangkan di berbagai wilayah tropis (Silalahi, 2018).

2.1.1 Morfologi Lempuyang

Lempuyang biasa dikenal sebagai tanaman tahunan yang memiliki morfologi khas yang mudah dikenali. Daun lempuyang berbentuk mata lembing atau bulat memanjang dengan ujung yang meruncing dan pangkal daun yang mengecil, kedudukannya tunggal berseling seperti ditunjukkan pada **Gambar 1**, memberikan tampilan yang elegan dan simetris. Panjang daun berkisar antara 25 hingga 40 cm dengan lebar sekitar 10 hingga 15 cm, berwarna hijau segar dengan permukaan yang licin dan mengkilap. Struktur ini membantu tanaman menyerap cahaya matahari secara efisien di habitat tropisnya.



Gambar 1. Daun Lempuyang (Wahyuni *et al.*, 2013)

Pelepah lempuyang sebenarnya merupakan batang semu yang terbentuk dari tumpukan helaian kelopak daun yang saling membungkus satu sama lain, sehingga tampak seperti batang tegak dengan tinggi mencapai 1 hingga 2 meter. Bagian ini memberikan dukungan struktural pada tanaman tahunan dari famili Zingiberaceae, yang mudah dikenali sebagai morfologi khasnya.

Bunga lempuyang merupakan bunga majemuk yang tumbuh dari umbi batang dan muncul pada bonggol di bagian atas batang semu, ditunjukkan pada **Gambar 2**. Bunga ini memiliki bentuk yang unik dan menarik, biasanya berwarna merah muda hingga merah tua, dan memiliki aroma yang khas. Struktur ini menarik polinator seperti serangga di lingkungan tropis. Setelah proses penyerbukan, tanaman ini menghasilkan biji yang berbentuk bulat panjang, berwarna hitam pekat, dan berukuran sekitar 4 mm.



Gambar 2. Bunga Lempuyang (Tani Maju Inodnesia, 2018)

Sistem perakarannya terdiri dari akar serabut yang berwarna kuning keputihan, yang membantu penyerapan nutrisi dari tanah. Rimpang lempuyang merupakan bagian yang paling banyak dimanfaatkan, berbentuk agak pipih dengan ujung yang bercabang-cabang pendek seperti ditunjukkan pada **Gambar 3**. Rimpang ini memiliki rasa pedas seperti mentol dan sedikit pahit, sering digunakan dalam kuliner dan obat-obatan tradisional (Santoso, 2024).



Gambar 3. Rimpang Lempuyang (Silalahi, 2018)

2.1.2 Manfaat Lempuyang

Kegunaan lempuyang dalam masyarakat sangat luas, mulai dari pengobatan hingga kuliner. Selain digunakan dalam ramuan jamu, lempuyang juga sering ditambahkan dalam masakan tradisional untuk memberikan aroma dan rasa yang khas. Di beberapa daerah, lempuyang juga memiliki peran penting dalam upacara adat dan ritual keagamaan, menunjukkan nilai budaya yang melekat pada tanaman ini. Dengan demikian, lempuyang tidak hanya berfungsi sebagai tanaman obat, tetapi juga sebagai bagian penting dari identitas budaya masyarakat (Huda *et al.*, 2022).

Rimpang lempuyang mengandung minyak atsiri berupa *limonene*, *pinen*, *kamfer*, *sineol*, dan zat *zerumbon* (zat anti kejang). Selain itu lempuyang juga mengandung *flavonoid* dan *saponin*. Di Jawa, rimpang lempuyang sering digunakan sebagai bahan jamu yang berkhasiat untuk melangsingkan badan, penambah nafsu makan, penghangat badan, obat pusing, obat disentri, mengatasi radang tenggorokan, dan membantu mengeluarkan gas (karminatif) pada perut kembung (Nurazizah *et al.*, 2024).

2.1.3 Klasifikasi Lempuyang

Lempuyang, memiliki sejarah yang kaya dalam tradisi pengobatan masyarakat Indonesia. Tanaman ini telah digunakan selama berabad-abad, terutama oleh masyarakat di pulau Jawa dan Bali, sebagai ramuan untuk berbagai penyakit. Sejarah pemanfaatan lempuyang mencerminkan pengetahuan lokal yang diwariskan dari generasi ke generasi, dimana tanaman ini dianggap sebagai simbol kesehatan dan kesejahteraan. Klasifikasi dari lempuyang menurut *Integrated Taxonomic Information System (ITIS)* (2024) adalah sebagai berikut.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Class	: Magnoliopsida
Ordo	: Zingiberales
Family	: Zingiberaceae
Genus	: <i>Zingiber</i>
Spesies	: <i>Zingiber zerumbet</i>

2.2 Ekstrak Etanol Lempuyang

Ekstrak etanol dari lempuyang (*Zingiber zerumbet*) telah menarik perhatian signifikan dalam penelitian antimikroba karena potensi aktivitasnya yang menjanjikan terhadap berbagai patogen, termasuk *Staphylococcus aureus*. Tanaman lempuyang, yang telah lama digunakan dalam pengobatan

tradisional, dikenal memiliki kandungan senyawa bioaktif yang kaya seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan minyak atsiri, yang secara kolektif berkontribusi pada sifat antimikrobanya yang kuat. Keunggulan utama ekstrak etanol terletak pada kemampuannya yang superior dalam mengekstraksi senyawa-senyawa polar dan semi-polar ini secara efektif, sehingga menghasilkan konsentrasi senyawa aktif yang lebih tinggi dan meningkatkan potensi antibakteri secara keseluruhan (Zanuba *et al.*, 2024).

Ekstrak etanol lempuyang memang memiliki beberapa karakteristik unggul yang membuatnya menonjol dalam penelitian antimikroba. Kelebihan utama ini tidak hanya terbatas pada kemampuannya dalam mengekstraksi senyawa bioaktif yang larut dalam etanol, seperti flavonoid dan fenolik yang dikenal memiliki aktivitas antibakteri yang kuat, tetapi juga mencakup aspek praktis dalam aplikasinya. Proses ekstraksi dengan etanol relatif sederhana dan efisien, memungkinkan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa aktif yang lebih tinggi dibandingkan dengan pelarut lainnya. Selain itu, ekstrak etanol cenderung lebih stabil dan memiliki umur simpan yang lebih lama, sehingga lebih praktis untuk digunakan dalam penelitian dan aplikasi klinis jangka panjang. Proses ekstraksi etanol memungkinkan preservasi optimal dari senyawa bioaktif lempuyang, termasuk zerumbone yang merupakan komponen utama dengan aktivitas antibakteri yang telah terbukti secara ilmiah (Lestari dan Santoso, 2021).

Manfaat ekstrak etanol lempuyang ternyata jauh lebih luas daripada sekadar aktivitas antibakteri. Manfaat-manfaat ini mencakup berbagai efek terapeutik lainnya yang saling melengkapi. Penelitian terkini menunjukkan bahwa ekstrak ini tidak hanya efektif sebagai antibakteri tetapi juga memiliki sifat anti inflamasi yang signifikan, yang dapat membantu mengurangi peradangan pada jaringan yang terinfeksi. Lebih lanjut, aktivitas antioksidan yang dimiliki ekstrak lempuyang dapat melindungi sel-sel tubuh dari kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh radikal bebas, sehingga memberikan perlindungan ganda terhadap infeksi bakteri dan stres oksidatif. Kombinasi sifat-sifat ini menjadikan ekstrak etanol lempuyang sebagai pilihan yang

sangat menarik dalam pengobatan infeksi, terutama dalam konteks pengobatan holistik yang mengutamakan kesehatan secara keseluruhan.

Efektivitas ekstrak etanol lempuyang dalam pengujian antibakteri telah terbukti sangat mengesankan terhadap berbagai jenis bakteri patogen. Dalam berbagai studi *in vitro*, ekstrak ini telah menunjukkan efektivitas yang signifikan melawan *Staphylococcus aureus*, termasuk strain yang resisten terhadap methicillin (MRSA). Metode pengujian standar seperti *Kirby-Bauer* dan penentuan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) konsisten menunjukkan bahwa ekstrak lempuyang dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi yang relatif rendah. Yang lebih menarik, penelitian juga membuktikan bahwa ekstrak ini efektif melawan bakteri patogen lainnya seperti *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, dan *Pseudomonas aeruginosa*, yang merupakan patogen umum penyebab infeksi nosokomial. Hasil-hasil konsisten ini menunjukkan potensi besar ekstrak etanol lempuyang sebagai alternatif yang layak dalam pengobatan infeksi bakteri, terutama di tengah meningkatnya resistensi terhadap antibiotik konvensional (Lestari, 2025).

2.2.1 Ekstrak Etanol 100% Tanaman Lempuyang

Ekstrak etanol 100% dari tanaman lempuyang (*Zingiberaceae*) memiliki peranan penting dalam pengujian aktivitas antimikroba karena kemampuannya untuk melarutkan berbagai senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman tersebut. Etanol 100% dipilih sebagai pelarut ekstraksi karena sifatnya yang polar dan non-polar, sehingga efektif dalam mengekstrak senyawa-senyawa seperti flavonoid, fenol, minyak atsiri, dan senyawa fenolik lainnya yang diketahui memiliki potensi antimikroba. Proses ekstraksi dengan etanol murni ini memungkinkan isolasi komponen-komponen aktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen, termasuk bakteri dan jamur. Selain itu, penggunaan etanol 100% juga membantu

mengurangi kontaminasi air yang dapat mempengaruhi kestabilan dan kemurnian ekstrak, sehingga hasil pengujian antimikroba menjadi lebih akurat dan dapat diandalkan (Nurazizah *et al.*, 2024).

Ekstrak etanol 100% lempuyang digunakan untuk menguji efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme tertentu melalui berbagai metode laboratorium, seperti metode *Kirby-Bauer* atau metode pengenceran. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak ini bekerja dengan berbagai mekanisme, misalnya merusak dinding sel bakteri, mengganggu sintesis protein, atau menghambat aktivitas enzim penting dalam mikroorganisme. Dengan demikian, ekstrak etanol 100% lempuyang tidak hanya berfungsi sebagai sumber senyawa antimikroba alami, tetapi juga sebagai bahan uji yang dapat memberikan gambaran potensi tanaman tersebut sebagai alternatif pengobatan infeksi yang lebih aman dan ramah lingkungan dibandingkan antibiotik sintetis. Penggunaan ekstrak ini dalam penelitian antimikroba juga membuka peluang untuk pengembangan produk farmasi dan kosmetik berbasis bahan alami yang memiliki aktivitas antimikroba efektif (Khoiriyah *et al.*, 2024).

Menurut penelitian Rachmadanti *et al.* (2025) ekstrak etanol 100% lempuyang memiliki keunggulan dalam hal stabilitas dan kemudahan penyimpanan dibandingkan ekstrak yang menggunakan pelarut lain seperti air atau metanol. Hal ini penting dalam konteks penelitian dan aplikasi praktis, karena ekstrak yang stabil akan mempertahankan aktivitas antimikroba dalam jangka waktu yang lebih lama. Selain itu, etanol sebagai pelarut juga relatif aman dan mudah menguap, sehingga setelah proses ekstraksi, pelarut dapat dihilangkan dengan mudah tanpa merusak senyawa aktif di dalam ekstrak.

2.3 Bakteri *Staphylococcus aureus*

Sejarah penemuan *Staphylococcus aureus* dimulai pada tahun 1880 ketika seorang ilmuwan bernama Sir Alexander Ogston pertama kali mengidentifikasi bakteri ini sebagai penyebab infeksi purulen. Sejak saat itu, penelitian tentang *Staphylococcus aureus* telah berkembang pesat, terutama dalam memahami mekanisme patogenitas dan resistensi antibiotik. Salah satu penemuan penting adalah identifikasi strain MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) pada tahun 1960-an, yang menunjukkan bahwa *Staphylococcus aureus* dapat mengembangkan resistensi terhadap antibiotik yang umum digunakan, termasuk metisilin. Hal ini menjadikan MRSA sebagai salah satu tantangan utama dalam pengobatan infeksi bakteri di rumah sakit dan komunitas (Aziz *et al.*, 2022).

Staphylococcus aureus dapat dibedakan dari spesies lain berdasarkan beberapa karakteristik, termasuk kemampuan untuk memproduksi koagulase, enzim yang menyebabkan pembekuan plasma. Selain itu, *Staphylococcus aureus* juga dikenal karena kemampuannya untuk menghasilkan berbagai toksin, seperti enterotoksin dan toksin sindrom syok toksik, yang berkontribusi pada virulensinya. Bakteri ini juga memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm, yang memudahkan kolonisasi dan infeksi pada perangkat medis (Sari *et al.*, 2024).

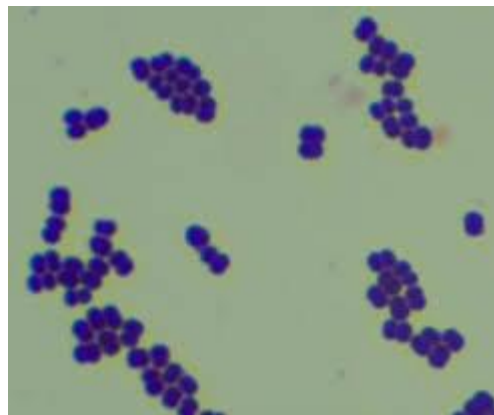
Staphylococcus aureus merupakan bagian dari flora normal pada kulit dan saluran pernapasan manusia, tetapi dapat menjadi patogen oportunistik ketika terjadi gangguan pada sistem kekebalan tubuh atau ketika bakteri ini masuk ke dalam jaringan tubuh melalui luka atau prosedur medis. Infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* seringkali ditandai dengan gejala seperti kemerahan, pembengkakan, dan nyeri pada area yang terinfeksi. Selain itu, infeksi ini dapat menyebar dengan cepat, terutama di lingkungan rumah sakit, dimana pasien dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah lebih rentan terhadap infeksi (Amalia *et al.*, 2016).

Menurut Ondusko and Nolt (2018) secara ekologis, *Staphylococcus aureus* merupakan bagian dari flora normal pada kulit manusia dan membran mukosa, terutama di area hidung, tenggorokan, dan kulit. Kehadirannya sebagai flora komensal ini biasanya tidak menimbulkan masalah kesehatan, karena bakteri tersebut hidup dalam keseimbangan dengan mikroorganisme lain dan sistem imun inang. Namun, *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan adaptasi yang tinggi dan dapat bertahan dalam berbagai kondisi lingkungan, termasuk pada permukaan kering dan lingkungan rumah sakit yang steril. Kemampuan ini menjadikan *Staphylococcus aureus* sebagai bakteri yang sangat tangguh dan sering ditemukan sebagai kontaminan pada peralatan medis serta permukaan lingkungan. Selain itu, bakteri ini dapat berkoloni dan membentuk biofilm, yang berkontribusi pada ketahanannya terhadap antibiotik dan sistem imun, sehingga memperumit pengobatan infeksi yang disebabkan.

Meskipun seringkali bersifat komensal, *Staphylococcus aureus* dapat berubah menjadi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai macam infeksi pada manusia. Infeksi yang ditimbulkan dapat bervariasi dari yang ringan hingga yang mengancam jiwa, tergantung pada lokasi infeksi dan status imun pasien. Infeksi kulit seperti bisul, impetigo, dan abses merupakan manifestasi yang paling umum, tetapi *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan infeksi yang lebih serius seperti pneumonia, endokarditis (infeksi pada lapisan jantung), osteomielitis (infeksi tulang), dan sepsis yang dapat berakibat fatal. Virulensi *Staphylococcus aureus* didukung oleh berbagai faktor, termasuk produksi toksin, enzim proteolitik, dan kemampuan untuk menghindari respons imun inang. Selain itu, munculnya strain *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik, seperti *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), menambah kompleksitas dalam penanganan infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini, sehingga menjadi perhatian utama dalam bidang kesehatan masyarakat dan klinis (Sari *et al.*, 2024).

2.3.1 Morfologi dan Sifat

Staphylococcus aureus adalah bakteri Gram positif yang dapat diamati secara mikroskopis melalui teknik pewarnaan seperti Gram stain atau mikroskop elektron. Bakteri ini berbentuk bulat (kokus) dan biasanya ditemukan dalam kelompok yang menyerupai tumpukan anggur (klaster), ditunjukkan pada **Gambar 4**. Hal ini membedakannya dari bakteri bulat lain yang sering berkelompok tunggal atau berpasangan. Diameter sel berkisar antara 0,5 hingga 1,5 mikrometer, tergantung pada kondisi pertumbuhan. Dinding sel tebal yang kaya peptidoglikan, memberikan sifat Gram positif ditandai dengan berwarna ungu saat diwarnai dengan metode Gram yang ditunjukkan pada **Gambar 4**. Struktur ini membantu mempertahankan bentuk sel dan memberikan kekuatan mekanis. Bakteri ini tidak memiliki flagela untuk bergerak dan tidak membentuk spora, sehingga tidak terlihat struktur endospora di bawah mikroskop (Diyantika *et al.*, 2014).



Gambar 4. Morfologi Mikroskopis *Staphylococcus aureus* (Abdilah and Kurniawan, 2022)

Secara makroskopis, koloni *Staphylococcus aureus* pada media pertumbuhan seperti agar nutrisi atau agar darah terlihat sebagai gumpalan bulat, konveks, dan halus dengan diameter sekitar 1-2 milimeter setelah inkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Koloni ini memiliki warna kuning keemasan yang khas akibat produksi pigmen

karotenoid ditunjukkan pada **Gambar 5**, hal ini yang membedakannya dari spesies *Staphylococcus* lain yang mungkin tidak berpigmen. Pada agar darah, koloni *Staphylococcus aureus* sering menunjukkan hemolisis beta, yaitu zona penuh penghancuran sel darah merah di sekitar koloni, memberikan tampilan bening atau kehijauan, seperti pada **Gambar 6**. Pertumbuhan ini biasanya cepat dan membentuk biofilm yang lengket, memungkinkan koloni menempel kuat pada permukaan media, dan dapat diamati tanpa alat mikroskop, meskipun identifikasi pasti memerlukan konfirmasi mikroskopis atau biokimia. Ciri ini penting dalam diagnostik laboratorium untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dari patogen lain (De Vos *et al.*, 2009).



Gambar 5. Morfologi Makroskopis *Staphylococcus aureus* pada Media MSA (Lasmini *et al.*, 2022)



Gambar 6. Morfologi Makroskopis *Staphylococcus aureus* pada Media Agar Darah (Wardani *et al.*, 2023)

2.3.2 Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menurut De Vos *et al.* (2009) diuraikan sebagai berikut:

Domain : Bacteria
Kingdom : Eubacteria
Filum : Firmicutes
Class : Bacilli
Ordo : Bacillales
Family : Staphylococcaceae
Genus : *Staphylococcus*
Spesies : *Staphylococcus aureus*

2.4 Mekanisme Penghambatan Bakteri oleh Senyawa Bioaktif

Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa bioaktif melibatkan gangguan pada komponen struktural maupun fungsional sel bakteri. Secara umum, senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, tanin, alkaloid, dan terpenoid bekerja melalui beberapa jalur utama: gangguan pada permeabilitas membran sel, inaktivasi enzim esensial, dan penghambatan sintesis asam nukleat (Cushnie and Lamb, 2005). Flavonoid, misalnya, diketahui mampu membentuk kompleks protein terlarut dengan dinding sel yang menyebabkan kerusakan pada membran sitoplasma, sehingga memicu kebocoran metabolit penting keluar dari sel (Xie *et al.*, 2015).

Selain itu, senyawa alkaloid bekerja dengan cara menghambat sintesis peptidoglikan yang merupakan komponen utama penyusun dinding sel bakteri. Gangguan pada pembentukan dinding sel ini mengakibatkan sel tidak mampu menahan tekanan osmotik internal, yang pada akhirnya memicu lisis sel (Tiwari *et al.*, 2011). Senyawa terpenoid dan minyak atsiri, yang dominan ditemukan pada genus *Zingiber*, memiliki sifat lipofilik yang memungkinkannya berpenetrasi ke dalam lapisan fosfolipid membran sel, sehingga meningkatkan fluiditas membran dan merusak sistem transpor

elektron (Sivaranjani *et al.*, 2014). Secara spesifik, setiap golongan senyawa bioaktif yang terkandung dalam ekstrak Lempuyang memiliki target seluler yang berbeda-beda dalam menghambat aktivitas mikroba. Perbedaan target serangan ini memungkinkan terjadinya efek sinergis dalam menekan pertumbuhan bakteri patogen. Ringkasan mengenai target seluler dan mekanisme aksi dari masing-masing senyawa bioaktif tersebut disajikan secara rinci pada Tabel 1.

Tabel 1. Mekanisme Kerja Senyawa Bioaktif

Jenis Senyawa	Target Seluler	Mekanisme Penghambatan	Referensi
Flavonoid	Membran Sitoplasma	Mendenaturasi protein sel dan membentuk kompleks dengan protein terlarut, menyebabkan kebocoran sel.	Xie <i>et al.</i> (2015)
Alkaloid	Dinding Sel	Menghambat sintesis peptidoglikan dan mengganggu komponen penyusun dinding sel sehingga memicu lisis.	Tiwari <i>et al.</i> (2011)
Tanin	Enzim & Protein	Menginaktivasi enzim pemanen energi dan mengikat protein permukaan sel bakteri.	Daglia (2012)
Terpenoid	Lapisan Fosfolipid	Bereaksi dengan lemak membran sel (sifat lipofilik), meningkatkan permeabilitas, dan merusak transpor ion.	Sivaranjani <i>et al.</i> (2014)
Saponin	Membran Sel	Bertindak sebagai polimer yang merusak tegangan permukaan membran, menyebabkan lisis sel.	Cushnie and Lamb (2005)

Mekanisme ini juga mencakup penghambatan fungsi asam nukleat. Beberapa senyawa bioaktif dapat berinterkalasi ke dalam untai DNA bakteri atau menghambat enzim DNA girase, yang berakibat pada kegagalan replikasi dan transkripsi genetik (Daglia, 2012). Melalui kombinasi berbagai jalur penghambatan tersebut, ekstrak tanaman obat seperti Lempuyang mampu memberikan efek bakteriostatik (menghambat pertumbuhan) maupun bakterisida (membunuh bakteri) terhadap patogen seperti *Staphylococcus aureus*.

2.5 Pengujian Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri merupakan langkah penting dalam menilai potensi suatu senyawa atau ekstrak tanaman sebagai agen antimikroba. Secara umum, pengujian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bahan dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri penyebab infeksi. Metode pengujian antibakteri dapat dilakukan dengan berbagai teknik, antara lain metode difusi cakram (*disk diffusion*), metode dilusi (*dilution method*), dan metode spektrofotometri seperti ELISA. Metode difusi cakram sering digunakan karena sederhana dan cepat, dimana bahan uji ditempatkan pada media agar yang telah diinokulasi bakteri, kemudian diamati zona hambat pertumbuhan bakteri di sekitar bahan uji. Metode dilusi, baik secara cair maupun padat, digunakan untuk menentukan konsentrasi minimum bahan yang dapat menghambat (*Minimum Inhibitory Concentration/MIC*) atau membunuh bakteri (*Minimum Bactericidal Concentration/MBC*). Sementara itu, metode spektrofotometri memungkinkan pengukuran pertumbuhan bakteri secara kuantitatif dengan mengukur kekeruhan atau absorbansi suspensi bakteri setelah perlakuan dengan bahan uji. Pemilihan metode pengujian antibakteri disesuaikan dengan tujuan penelitian dan jenis bahan uji yang digunakan. Secara keseluruhan, pengujian antibakteri memberikan informasi penting mengenai efektivitas dan potensi bahan alami sebagai alternatif

pengobatan infeksi bakteri, terutama dalam menghadapi masalah resistensi antibiotik yang semakin meningkat (Nurhayati *et al.*, 2020).

2.5.1 Pengujian Antibakteri Metode Kirby-Bauer

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan teknik *Kirby-Bauer* menggunakan metode cawan sebar (*Spread Plate Method*). Pertama-tama, media MHB dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga mengeras atau menguat. Setelah itu, bakteri disebar secara merata di atas media MHB menggunakan mikropipet 100 mikroliter. Disiapkan *patch* yang mengandung empat formula ekstrak metanol dari rimpang lempuyang (*Zingiber zerumbet*), salep kloramfenikol sebagai kontrol positif, dan *patch* tanpa ekstrak metanol dari rimpang lempuyang (*Zingiber zerumbet*) sebagai kontrol negatif. Selanjutnya, *patch* tersebut dicetak dengan cetakan berdiameter 6 mm dan ditempatkan di atas media agar. Proses inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam di dalam inkubator. Setelah itu, diameter zona hambat terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* diamati dan diukur secara visual menggunakan jangka sorong (Maddeppungeng *et al.*, 2023).

2.5.2 Pengukuran MIC Menggunakan ELISA Reader

Penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah langkah krusial dalam mikrobiologi klinis dan penelitian antimikroba untuk mengukur konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara kasat mata. Secara tradisional, MIC ditentukan melalui metode *Kirby-Bauer* makro atau mikro yang melibatkan pengamatan visual kekeruhan tabung atau sumur. Namun, dengan kemajuan teknologi, penggunaan ELISA

reader telah menjadi metode yang lebih efisien, objektif, dan kuantitatif untuk menentukan MIC, terutama dalam skala tinggi (*high-throughput screening*) (Visakhadevi *et al.*, 2023).

Metode penentuan MIC menggunakan ELISA *reader* didasarkan pada prinsip pengukuran absorbansi atau kekeruhan suspensi mikroorganisme dalam sumur-sumur mikrotiter. Pertama, serangkaian dilusi agen antimikroba disiapkan dalam sumur-sumur pelat mikrotiter 96-sumur atau 384-sumur. Kemudian, suspensi mikroorganisme standar (dengan konsentrasi tertentu) diinokulasikan ke dalam setiap sumur yang telah berisi agen antimikroba dan kontrol pertumbuhan (tanpa antimikroba) serta kontrol sterilitas (medium saja). Pelat diinkubasi pada kondisi yang sesuai (suhu dan waktu) untuk memungkinkan pertumbuhan mikroorganisme. Selama inkubasi, mikroorganisme akan tumbuh di sumur-sumur dimana konsentrasi antimikroba tidak cukup untuk menghambat pertumbuhannya, menyebabkan peningkatan kekeruhan (Syarif *et al.*, 2020).

Setelah inkubasi, pelat mikrotiter dibaca menggunakan ELISA *reader*. ELISA *reader* mengukur absorbansi cahaya pada panjang gelombang tertentu (misalnya, 630 nm) yang berbanding lurus dengan kekeruhan atau biomassa mikroorganisme dalam setiap sumur. Semakin tinggi absorbansi, semakin banyak pertumbuhan mikroorganisme yang terjadi. Data absorbansi dari setiap sumur kemudian dianalisis. Sumur kontrol pertumbuhan (tanpa antimikroba) akan menunjukkan absorbansi tertinggi, menandakan pertumbuhan maksimal. Sebaliknya, sumur kontrol sterilitas akan memiliki absorbansi yang sangat rendah, mendekati nol. MIC ditentukan sebagai konsentrasi terendah agen antimikroba dimana absorbansi sumur tersebut secara signifikan lebih rendah dibandingkan dengan kontrol pertumbuhan, dan mendekati absorbansi kontrol sterilitas, menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroorganisme yang signifikan (Evangelina *et al.*, 2021).

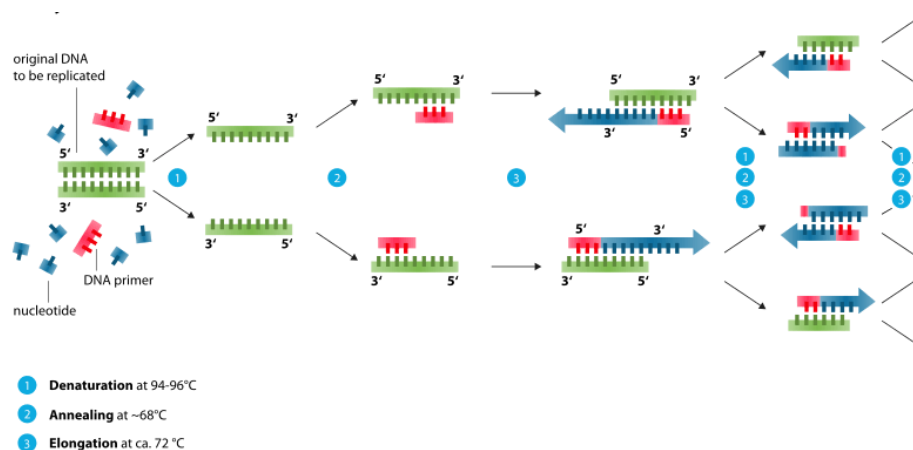
Menurut Penelitian Nurniza *et al.* (2023), keuntungan utama penggunaan ELISA *reader* untuk penentuan MIC meliputi objektivitas dan kuantifikasi hasil, eliminasi bias pengamatan visual, peningkatan throughput yang memungkinkan pengujian banyak sampel secara bersamaan, serta kemampuan untuk mengidentifikasi efek subletal atau parsial dari antimikroba yang mungkin tidak terlihat secara visual. Meskipun demikian, penting untuk memastikan kalibrasi yang tepat dari ELISA *reader* dan standardisasi inokulum serta kondisi inkubasi untuk mendapatkan hasil yang akurat dan dapat direproduksi. Metode ini telah menjadi alat yang tak ternilai dalam penelitian obat baru, pengawasan resistensi antimikroba, dan pengembangan strategi pengobatan infeksi.

2.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan teknik amplifikasi DNA yang dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1983, yang kemudian mendapat Penghargaan Nobel dalam Kimia pada tahun 1993. Teknik ini memungkinkan penggandaan spesifik fragmen DNA dalam jumlah besar dari sampel yang sangat sedikit, sehingga menjadi alat fundamental dalam bidang biologi molekuler, genetika, forensik, diagnostik medis, dan penelitian filogenetik. PCR bekerja berdasarkan prinsip replikasi DNA alami yang terjadi dalam sel, namun dilakukan secara *in vitro* dengan kontrol yang tepat untuk menghasilkan jutaan salinan DNA target dalam waktu singkat (Farisi *et al.*, 2020).

Menurut penelitian Setiawan *et al.* (2025) prinsip dasar PCR melibatkan tiga tahapan utama yang berulang dalam siklus: denaturasi, annealing (penempelan primer), dan elongasi (pemanjangan). Pada tahap denaturasi, DNA template dipanaskan hingga suhu tinggi yaitu 94-95°C untuk memisahkan kedua untai DNA menjadi untai tunggal. Selanjutnya, pada tahap annealing, suhu diturunkan menjadi 50-65°C sehingga primer

oligonukleotida spesifik dapat menempel pada urutan komplementer pada untai DNA template. Tahap elongasi dilakukan pada suhu optimal enzim polimerase yaitu 72°C, dimana enzim DNA polimerase menambahkan nukleotida ke untai baru yang sedang terbentuk, menghasilkan salinan DNA yang lengkap. Siklus ini diulang sebanyak 20-40 kali, sehingga jumlah DNA target meningkat secara eksponensial (2^n , dimana n adalah jumlah siklus). Reaksi berantai ini ditunjukkan pada **Gambar 7**.



Gambar 7. Reaksi Berantai Polimerase (Suwardji *et al.*, 2023)

Keunggulan PCR meliputi sensitivitas tinggi, spesifisitas, kecepatan, dan kemampuan mengamplifikasi DNA dari sampel terdegradasi. Namun, keterbatasannya termasuk risiko kontaminasi, kesalahan amplifikasi, dan ketergantungan pada kualitas primer serta template DNA. Dalam penelitian ini, langkah-langkah sterilisasi dan kontrol kualitas DNA dengan Nanophotometer dilakukan untuk meminimalkan kesalahan. Dengan demikian, PCR menjadi pondasi utama dalam penelitian molekuler ini, memungkinkan validasi identitas genetik lempuyang lokal melalui analisis filogenetik berbasis sekuens *rbcL*. Teknik ini tidak hanya mendukung eksplorasi keanekaragaman hayati tetapi juga aplikasi praktis dalam pengembangan produk herbal (Rahmayani *et al.*, 2021).

2.6.1 Primer *rbcL*

Salah satu alasan mengapa *rbcL* sangat efektif untuk analisis filogenetik adalah karena gen ini terlibat dalam proses fotosintesis, yang merupakan fungsi penting bagi semua tanaman. Gen *rbcL* memiliki laju mutasi yang relatif lambat, sehingga memberikan informasi yang cukup untuk membedakan spesies dalam tingkat taksonomi yang lebih tinggi, seperti genus dan famili. Penggunaan sekuens *rbcL* pada analisis filogenetik Lempuyang dapat membantu mengidentifikasi hubungan evolusi antara spesies lempuyang dengan spesies lain dalam keluarga Zingiberaceae, serta memberikan wawasan tentang diversifikasi dan adaptasi tanaman ini di berbagai habitat (Rahmayani *et al.*, 2021).

Primer *rbcL* yang paling umum digunakan adalah primer universal yang dikembangkan oleh berbagai peneliti, seperti yang direkomendasikan oleh *Consortium for the Barcode of Life* (CBOL) untuk DNA barcoding tumbuhan. Primer *Forward* (*rbcL*-aF) dengan sekuens: 5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3' yang memiliki panjang 26 basa, dengan fungsi untuk mengikat pada ujung 5' dari gen *rbcL*, memulai amplifikasi dari arah forward. Primer *Reverse* (*rbcL*-aR) dengan sekuens: 5'-GTAAAATCAAGTCCACCRCG-3' (dimana R = A atau G, untuk degenerasi), dengan panjang 20 basa, yang berfungsi untuk mengikat pada ujung 3' dari gen *rbcL*, memulai amplifikasi dari arah reverse yaitu arah 3' ke 5', yang kemudian dibalik dalam PCR. Primer ini menghasilkan produk amplifikasi sekitar 600-700 basa, tergantung pada spesies (Corvalan *et al.*, 2025).

Proses analisis filogenetik menggunakan sekuens *rbcL* dimulai dengan pengambilan sampel DNA dari spesimen tanaman yang akan diteliti. Setelah itu, DNA diekstraksi dan sekuens gen *rbcL*

diisolasi menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Sekuens yang dihasilkan kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak bioinformatika untuk membangun pohon filogenetik. Metode seperti *Maximum Likelihood* atau *Bayesian Inference* sering digunakan untuk menentukan hubungan antar spesies berdasarkan sekuens yang diperoleh. Hasil analisis ini dapat memberikan gambaran yang jelas tentang hubungan evolusi antara lempuyang dan spesies lain, serta membantu dalam klasifikasi taksonomi yang lebih tepat (Sagala, 2021).

Selain itu, analisis filogenetik menggunakan sekuens *rbcL* juga dapat memberikan informasi penting mengenai sejarah evolusi dan penyebaran spesies lempuyang. Dengan memahami hubungan filogenetik, peneliti dapat mengidentifikasi spesies yang memiliki potensi untuk dikembangkan lebih lanjut dalam bidang pertanian atau pengobatan. Misalnya, jika sekuens *rbcL* menunjukkan bahwa lempuyang memiliki hubungan dekat dengan spesies lain yang memiliki sifat-sifat unggul, maka spesies tersebut dapat dijadikan sebagai sumber genetik untuk pemuliaan tanaman. Dengan demikian, penggunaan sekuens *rbcL* dalam analisis filogenetik tidak hanya memberikan wawasan tentang hubungan evolusi, tetapi juga membuka peluang untuk pengembangan aplikasi praktis dalam bidang pertanian dan konservasi (Sagala, 2021).

2.6.2 Metode Sekuensing: Sanger Sekuensing

Metode sekuensing Sanger, yang juga dikenal sebagai metode terminasi rantai, merupakan teknik klasik dan fundamental dalam penentuan urutan basa pada molekul DNA. Dikembangkan oleh Frederick Sanger pada tahun 1977, metode ini menjadi terobosan besar dalam bidang genetika karena memungkinkan penentuan

urutan nukleotida secara akurat dan sistematis. Prinsip dasar metode ini adalah penggunaan dideoksinukleotida (ddNTP) yang berfungsi sebagai terminator rantai selama proses sintesis DNA. Dalam reaksi sekuensing, campuran nukleotida normal (dNTP) dan dideoksinukleotida yang diberi label radioaktif atau *fluorescent* dicampurkan bersama dengan template DNA, primer, dan enzim DNA polimerase. Ketika ddNTP terinkorporasi ke dalam rantai DNA yang sedang tumbuh, sintesis rantai berhenti karena ddNTP tidak memiliki gugus 3'-OH yang diperlukan untuk penambahan nukleotida berikutnya. Akibatnya, terbentuk fragmen DNA dengan panjang yang bervariasi, masing-masing berakhir pada posisi dimana ddNTP terinkorporasi. Fragmen-fragmen ini kemudian dipisahkan berdasarkan ukuran menggunakan elektroforesis gel poliakrilamida, dan urutan basa dapat dibaca dari pola fragmentasi tersebut (Suwardji *et al.*, 2023).

Proses pemisahan fragmen DNA yang dihasilkan dalam metode Sanger sangat penting untuk menentukan urutan nukleotida. Setelah reaksi terminasi rantai selesai, campuran fragmen DNA yang berukuran berbeda-beda tersebut dimasukkan ke dalam gel poliakrilamida dan dikenakan medan listrik untuk elektroforesis. Fragmen-fragmen yang lebih pendek akan bergerak lebih cepat melalui gel dibandingkan fragmen yang lebih panjang, sehingga fragmen-fragmen tersebut terpisah berdasarkan ukuran. Dengan menggunakan label radioaktif atau *fluorescent* pada ddNTP, fragmen-fragmen ini dapat dideteksi secara visual. Pada metode klasik, hasil elektroforesis dibaca secara manual dengan melihat pola pita pada film autoradiografi. Namun, dengan kemajuan teknologi, saat ini digunakan sequencer otomatis yang memanfaatkan label *fluorescent* berbeda untuk setiap jenis ddNTP (A, T, G, C), sehingga pembacaan urutan DNA dapat dilakukan secara cepat dan akurat melalui deteksi sinyal *fluorescent* yang

dihasilkan oleh fragmen-fragmen DNA yang terpisah (Azizi *et al.*, 2021).

Meskipun metode Sanger telah banyak digantikan oleh teknologi sekuensing generasi baru (*Next-Generation Sequencing/NGS*) yang menawarkan kecepatan dan kapasitas yang jauh lebih besar, metode ini tetap menjadi standar emas dalam banyak aplikasi.

Metode Sanger sangat berguna untuk verifikasi urutan DNA hasil sekuensing NGS, analisis mutasi spesifik, dan sekuensing fragmen DNA pendek dengan tingkat akurasi yang sangat tinggi.

Keunggulan utama metode ini adalah kemampuannya menghasilkan data sekuens dengan tingkat kesalahan yang sangat rendah dan kemudahan interpretasi hasil. Namun, keterbatasan metode ini terletak pada waktu dan biaya yang relatif tinggi jika digunakan untuk sekuensing genom besar, serta kapasitas *throughput* yang terbatas (Tasma, 2015).

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November - Januari di Laboratorium Botani 1, Laboratorium Biologi Molekuler, dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Lampung, serta Laboratorium INA LAB DNA.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu tanaman lempuyang yang berasal dari petani Lampung Barat koleksi pribadi Bapak Wawan Abdullah Setiawan, sampel isolat *Staphylococcus aureus* koleksi dari UPT LTSIT Universitas Lampung, alkohol, tisu, aquades, media *Natrium agar* (NA), media *Mueller Hinton agar* (MHA), ethanol murni, kit ekstraksi DNA intron, kit pereaksi PCR, primer *rbcL*, kit elektroforesis intron, *agarose seakem*, *red safe*, *size marker*, DMSO 10%, dan *Ciprofloxacin* (kontrol positif), dan *microplate* ELISA.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu mortar, alu, gelas ukur, tabung reaksi, cawan petri, jarum ose, mikropipet, wrap, neraca analitik, bunsen, mistar, *microplate*, *laminar air flow*, *tap spin*, *magic stirrer*, *heating block freezer*, *autoclave*, *vortex*, *centrifuge*, *freezer*, *hot plate*, *electroforesis*

gel, *Thermocycler* (Sensoquest, Jerman), *Nanophotometer* (IMPEN, Jerman), dan *ELISA Reader*.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini merupakan penelitian faktorial dengan dua faktor menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). Faktor 1 yaitu filogenetik dari tanaman Lempuyang (*Zingiber zerumbet*) yang berasal dari petani Lampung Barat dianalisis menggunakan *primer* Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase large subunit (*rbcL*). Faktor 2 yaitu aktivitas antibakteri dari ekstrak Lempuyang terhadap *Staphylococcus aureus* yang diujikan dengan metode *Kirby bauer* dengan tiga pengulangan untuk melihat secara kualitatif dan *Minimum inhibitory concentrate* (MIC) dengan menguji 5 macam konsentrasi yaitu 10.000, 5.000, 2.500, 1.250, dan 625 ppm masing-masing konsentrasi diulang sebanyak tiga kali untuk memverifikasi secara kuantitatif. Rancangan percobaan dirincikan dalam tabel-tabel berikut.

Tabel 2. Rancangan Percobaan Faktor 1

Variabel Bebas	Sampel lempuyang (<i>Zingiber zerumbet</i>) dari petani Lampung Barat (sebagai subjek utama); perbandingan dengan spesies serupa dari NCBI.
Variabel Terikat	Pohon filogenetik (hubungan kekerabatan sampel lokal dengan spesies NCBI berdasarkan sekuens <i>rbcL</i>); keberhasilan amplifikasi DNA (ukuran fragmen ~300-600 bp); konsentrasi DNA (ng/ μ L); dan kemurnian DNA (rasio A260/A280).
Variabel Kontrol	Suhu PCR (95°C denaturasi, 54°C annealing, 72°C elongasi); siklus PCR (30 kali); primer <i>rbcL</i> ; metode sekuensing Sanger; dan database NCBI sebagai sumber referensi.

Tabel 3. Rancangan Percobaan Faktor 2

Variabel Bebas	Konsentrasi ekstrak etanol lempuyang (10.000 ppm untuk metode <i>Kirby-Bauer</i> ; 10.000 ppm, 5.000 ppm, 2.500 ppm, 1.250 ppm, 625 ppm untuk metode MIC).
Variabel Terikat	Zona hambat (diameter dalam mm); MIC (konsentrasi terendah penghambatan); persentase penghambatan bakteri (% berdasarkan absorbansi OD630).
Variabel Kontrol	Suhu inkubasi (37°C); waktu inkubasi (24 jam); media MHA; inokulum bakteri (0.5 McFarland); kontrol positif (<i>Ciprofloxacin</i>); kontrol negatif (tanpa ekstrak); kontrol sterilitas (media saja).

3.4 Metode

Metode kerja pada penelitian ini dilakukan dengan sepuluh tahapan yaitu:

3.4.1 Sterilisasi

Alat *glass* dibersihkan dari kotoran dan sisa bahan dengan air mengalir dan deterjen, kemudian dibilas dengan air bersih hingga tidak ada sisa deterjen. Setelah itu, dikeringkan sebelum proses sterilisasi, lalu alat *glass* di bungkus dengan kertas dan plastik tahan panas. Setelah itu, dimasukkan ke *autoclave*, dan diatur *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi selama 15-20 menit. Lalu, dinyalakan siklus autoklaf sesuai standar. Setelah selesai, dibiarkan terlebih dahulu alat hingga mendingin di dalam autoklaf sebelum dikeluarkan untuk menghindari kontaminasi ulang (Papatungan *et al.*, 2019).

Alat logam disterilisasi dengan dipanaskan menggunakan oven pada suhu 160-180°C selama 1-2 jam. Setelah proses selesai, dibiarkan terlebih dahulu alat mendingin di dalam oven sebelum digunakan. Alat yang tidak tahan panas disterilisasi dengan cara dilap menggunakan tisu yang disemprot menggunakan alkohol. Selain itu,

sterilisasi alat tidak tahan panas seperti alat *disposable* dilakukan dengan ditempatkan di bawah sinar UV di ruang khusus selama 20 menit (Sriana *et al.*, 2022).

3.4.2 Ekstraksi DNA Lempuyang

Proses ekstraksi DNA mengikuti protokol kit Ekstraksi DNA iNtRON i-genomic Plant. Tahapan diawal dengan pengambilan sampel bagian daun muda lempuyang diambil dan disterilkan menggunakan alkohol dan dikeringkan menggunakan tisu. Setelah itu, dimasukkan ke dalam mortar dengan berat ± 1 gram, lalu digerus selama 30 menit, dan ditambahkan 50mL buffer PG setiap 10 menit. Setelah hasil gerusan berbentuk serbuk, ditambahkan 100 μ L buffer PG dan homogenkan dengan hasil tumbukkan, lalu hasil gerusan dipindahkan ke dalam *microtube* steril 2mL. Kemudian ditambahkan 200 μ L buffer PG dan 2 butir *Tissuelyser beads* (Qiagen, Hilden, Jerman), lalu dihomogenkan dengan vortex selama 5 menit. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan dipindahkan ke *microtube* steril baru ukuran 2 mL. Kemudian ditambahkan 15 μ L proteinase-K, lalu dihomogenkan dengan vortex selama 2 menit. Setelah itu, diinkubasi selama 45 menit pada suhu 65°C dan sesekali lakukan homogenisasi dengan di kocok pelan. Setelah itu, dikeluarkan dari oven dan didiamkan hingga suhu ruang.

Kemudian ditambahkan 100 μ L buffer PPT, lalu dihomogenkan dengan insersi, lalu diinkubasi di dalam es selama 5 menit. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 7 menit, lalu supernatan diambil kemudian dimasukkan ke *microtube* steril 1,5 mL. Kemudian ditambahkan 650 μ L buffer PB dan lakukan insersi hingga homogen. Setelah itu, pindahkan sebanyak 650 μ L campuran ke dalam *spin column*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000rpm

selama 2 menit. Kemudian keluarkan cairan yang ada pada *collection tube*, lalu pasang kembali. Sisa cairan pada *microtube* dimasukkan ke *spin column*, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Kemudian keluarkan lagi cairan yang berada di *collection tube*, lalu pasang *collection tube* baru, kemudian dimasukkan 700 μ L buffer PWA. Setelah itu, disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, kemudian dikeluarkan cairan pada *collection tube*, lalu pasang kembali. Lalu masukkan 700 μ L buffer PWB, setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, lalu buang *collection tube* dan ganti dengan yang baru. Setelah itu, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, tanpa penambahan apapun. Lalu *spin column* dipindahkan ke *microtube* 1,5mL, kemudian dimasukkan 20 μ L buffer PE ke dalam *spin column* dan didiamkan selama 1 menit. Setelah itu, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit, lalu dimasukkan 15 μ L buffer PE ke dalam *spin column*, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 2 menit. Setelah itu, didiamkan selama 1 menit lalu *spin column* dilepaskan dan lid *microtube* 1,5mL ditutup rapat. Kemudian hasil ekstraksi disimpan pada suhu -4°C (Sanjaya dan Ratnawati, 2017).

3.4.3 Analisis Kemurnian dan Konsentrasi DNA Hasil Ekstraksi

Konsentrasi dan kemurnian DNA hasil ekstraksi dianalisis dengan *Nanophotometer* (IMPEN, Jerman). *Nanophotometer* menunjukkan konsentrasi DNA dalam satuan nanogram/mikroliter (ng/ μ L). Absorbansi A260/A280 sebagai rasio absorbansi asam nukleat dengan protein, serta A260/A280 sebagai adanya indikasi keberadaan komponen lain atau pengotor. Untuk analisis tersebut, sampel diteteskan sebanyak 1,5 μ L pada *kuvet cell* kemudian diletakkan pada *cell holder*. Sampel DNA yang murni ditunjukkan dengan nilai absorbansi A260/A280 direntang 1.8-2.0. DNA dengan kemurnian

1.8-2.0 dan konsentrasi $\geq 50\text{ng}/\mu\text{l}$ dapat dilanjutkan ke proses amplifikasi dengan *Polymerase Chain Reaction* (Sembiring *et al.*, 2023).

3.4.4 Amplifikasi Gen *rbcL* dengan metode PCR

Hasil ekstraksi DNA yang telah didapat dilakukan uji PCR dengan cara dicampurkan setiap pereaksi PCR yang terdiri dari 10 μL *mastermix MyTaqTM HS Red Mix*, 0,25 μL primer *rbcL* yang terdiri dari *forward*, 0,25 μL primer *reverse*, 4,5 μL ddH₂O, dan 5 μL DNA *template*. Proses pencampuran pereaksi PCR ini dilakukan di dalam laminar. Pereaksi PCR kemudian dimasukkan kedalam *microtube* berukuran 0,2 μL . *Microtube* yang berisi sampel ekstraksi dan pereaksi PCR dimasukkan ke dalam alat *Thermocycler* (*Sensoquest*, Jerman), lalu diatur program *thermocycling* yang terdiri dari 6 tahapan, yaitu tahap denaturasi awal (95°C selama 5 menit), tahap denaturasi (95°C selama 1 menit), tahap penempelan primer atau *annealing* (54°C selama 1 menit), tahap pemanjangan atau elongasi (72°C selama 1 menit), tahap post elongasi (72°C selama 5 menit), dan tahap pendinginan (20°C selama 10 menit). Siklus diulang sebanyak 30 kali. Sampel hasil PCR selanjutnya disimpan di lemari pendingin bersuhu 4°C agar menjaga DNA dari kerusakan (Kolondam *et al.*, 2012).

3.4.5 Visualisasi Hasil Amplifikasi DNA dengan Elektroforesis

DNA hasil PCR divisualisasi dengan elektroforesis gel agarosa 1,5%. Gel agarosa dibuat dengan cara 0,48 g gel agarosa dilarutkan dalam 40 mL buffer TAE 1x lalu dimasak hingga mendidih dan homogen yang ditandai dengan larutan menjadi bening. Setelah didinginkan selama + 10-15 menit, larutan gel agarosa ditambahkan 2 μL larutan *redsafe*, lalu dihomogenkan. Selanjutnya larutan tersebut dituang ke dalam *tray* elektroforesis dan dipasang *comb*. Setelah gel

memadat, dimasukkan DNA *marker* sebanyak 7 μL ke dalam sumuran tengah dari gel agarosa lalu 5 μL DNA hasil PCR dimasukkan ke dalam sumuran gel agarosa lainnya. Alat Mupid-Exu di atur untuk Proses elektroforesis selama 35 menit dengan arus listrik 100 Volt. Setelah migrasi DNA selesai, pita-pita DNA pada gel diamati menggunakan sinar *ultraviolet* pada *gel doc* (Putri *et al.*, 2016).

3.4.6 Sekuensing Amplikon Hasil PCR

Hasil PCR yang telah tervisualisasi adanya pita amplikon pada pengamatan *gel doc* lalu di sekuensing dengan metode Sanger melalui penyedia jasa sekuensing, yaitu PT Genetika Science. Sampel yang akan dikirimkan berupa produk hasil PCR dan satu set primer yang digunakan dalam *microtube* 0,2 mL. Sampel dikemas di dalam kotak yang ditambahkan gel *es* agar menjaga suhu tetap rendah pada proses pengiriman (Sjafaraenan *et al.*, 2018).

3.4.7 Ekstraksi Lempuyang dengan Etanol 100%

Rimpang dan daun tua lempuyang dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C selama 24 jam, lalu dihaluskan dengan menggunakan blender setelah itu ditumbuk menjadi simplisia menggunakan mortar dan alu, setelah itu dimaserasi menggunakan EtOH dengan perbandingan 1:10 selama 24 jam dan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, tahapan ini berfungsi agar pelarut dapat menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung berbagai komponen zat aktif. Filtrat yang diperoleh disaring untuk menghilangkan komponen yang tidak diinginkan. Kemudian filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan tekanan 60 mbar. Ekstrak yang diperoleh disimpan dalam kulkas hingga diperlukan (Asworo dan Widwiasuti, 2023).

3.4.8 Peremajaan Bakteri *Staphylococcus aureus*

Isolat *Staphylococcus aureus* diremajakan pada media NA. Media NA dibuat dengan cara 10g NA dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan dengan *hot plate* hingga mendidih. Media yang telah mendidih dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan disterilisasi dengan di masukkan ke *autoclave* selama 20 menit pada suhu 121°C. Media yang telah steril ditunggu hingga hangat kuku, lalu dituang ke tabung reaksi dan diposisikan miring dan ditunggu hingga padat. Setelah itu, isolat diinokulasikan ke media NA dengan metode *streak*, lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam (Triatmoko *et al.*, 2018).

3.4.9 Pengujian Aktivitas Antibakteri *Staphylococcus aureus* Metode Kirby-Bauer

Media cair *Mueller Hinton Broth* dibuat dengan cara ditimbang 2,1g media, dan dilarutkan dalam aquades steril 100mL. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dibuat dengan cara 2,1g MHB ditambah dengan 1,5g agar dilarutkan pada aquades steril 100mL, lalu dipanaskan hingga mendidih. Tandai cawan petri dibagi menjadi 4 bagian untuk uji ekstrak yang dilarutkan dengan DMSO 10% (Uji) dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10.000ppm, ekstrak yang dilarutkan dengan air (L+ Air) dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10.000ppm, kontrol positif (+) menggunakan *Ciprofloxacin* dengan konsentrasi 2.000ppm, dan kontrol negatif (-), setelah media hangat kuku, media dituang ke cawan petri dan ditunggu hingga mengeras. Hasil inokulasi *Staphylococcus aureus* koloni tunggal kemudian diambil dan disuspensikan dalam media cair *Mueller Hinton Broth* hingga mencapai kekeruhan standar yang setara dengan 0.5 McFarland (sekitar $1.5/10^8$ CFU/mL). Kemudian hasil pengenceran 10^8 CFU/mL diinokulasikan pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang berada di cawan petri dengan metode *spread* diratakan hingga

memenuhi media. Setelah itu, didiamkan selama 5 menit, kemudian dilakukan pelubangan media sebanyak 4 lubang menggunakan mikrotip steril.

Ekstrak Uji dimasukkan kedalam sumuran yang telah ditandai pada media agar sebanyak 50 μL , ekstrak dengan pelarut air dimasukkan kedalam sumuran yang telah ditandai pada media agar sebanyak 50 μL , kontrol positif menggunakan *Ciprofloxacin* dengan konsentrasi 2.000ppm dimasukkan kedalam sumuran yang telah ditandai pada media agar sebanyak 50 μL , kontrol negatif menggunakan aquades steril dimasukkan kedalam sumuran yang telah ditandai pada media agar sebanyak 50 μL . Lalu diinkubasi selama 24- 48 jam. Setelah inkubasi diamati zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran dan dibandingkan dengan hasil kontrol positif dan kontrol negatif (Zanuba, *et al.*, 2024).

3.4.10 Pengukuran Aktivitas Antibakteri dengan ELISA Reader

Prosedur penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dilakukan dengan menggunakan metode mikro dilusi, yang merupakan teknik standar untuk mengukur aktivitas antimikroba suatu sampel. Pada metode ini, pengenceran serial dari sampel dilakukan dalam microplate steril yang terdiri atas 12 kolom dan 8 baris *wells*, yang memungkinkan pengujian berbagai konsentrasi secara simultan. Setiap kelompok sampel diuji pada satu lempeng *microplate*, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 1, untuk memastikan konsistensi dan efisiensi pengujian.

Tabel 4. Data Map Sampel pada *Microplate Reader*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CP1	CP1	CP1		PC1	PC1	PC1			NC1		SC
B	CP2	CP2	CP2		PC2	PC2	PC2			NC2		SC
C	CP3	CP3	CP3		PC3	PC3	PC3			NC3		SC
D	CP4	CP4	CP4		PC4	PC4	PC4			NC4		SC
E	CP5	CP5	CP5		PC5	PC5	PC5			NC5		SC
F												
G												
H	GC	GC	GC	GC	GC				KU	KU	KU	KU

Keterangan:

GC	= Kontrol Pertumbuhan	PCn	= Kontrol Positif
NCn	= Kontrol negatif	CPn	= Kelompok Uji
SC	= Kontrol steril	KU	= Kontrol Uji

Pengujian diawali dengan sterilisasi alat, bahan, dan tempat kerja. Kemudian pembuatan media *Mueller Hinton Broth* dengan cara ditimbang media MHB sebanyak 0,7g dilarutkan dalam 35mL aquades steril, lalu dipanaskan hingga larut. Setelah itu, pembuatan pelarut DMSO 10% dengan cara 100 μ L DMSO dilarutkan dalam 900ml aquades steril. Setelah itu, persiapan larutan stok ekstrak lempuyang dengan konsentrasi 10.000ppm dengan diambil ekstrak sebanyak 0,01g dilarutkan dalam 1mL DMSO 10%. Kemudian persiapan antibiotik Ciprofloxacin dengan konsentrasi 2.000ppm dilarutkan dalam DMSO 10% sebanyak 1mL.

Isolat *Staphylococcus aureus* yang sudah ditumbuhkan pada media agar *Mueller Hinton Agar* selama 18-24 jam pada suhu 37°C diambil koloni tunggal kemudian disuspensikan dalam media cair *Mueller Hinton Broth* hingga mencapai kekeruhan standar 0.5 McFarland (sekitar $1.5/10^8$ CFU/mL) dengan diukur menggunakan absorbansi *Elisa reader* dengan panjang gelombang 630nm hingga menunjukkan nilai rata-rata suspensi dikurangi rata-rata media berada pada rentang 0.8 hingga 0.1, setelah itu, suspensi bakteri dibuat dengan perbandingan 1:1000, dimana inokulum bakteri yang telah diukur diambil sebanyak 10 μ L kemudian dilarutkan dalam media MHB sebanyak 9.990 μ L.

Mikroplate steril yang sudah ditandai sesuai dengan data map sampel disiapkan, kemudian dimasukkan media MHB sebanyak 100 μ L pada tiap sumuran uji. Setelah itu, sumuran kontrol negatif ditambahkan DMSO 10% sebanyak 100 μ L dan dilakukan dilusi hingga sumuran kontrol negatif ke-5, pada sumuran ke-5 dibuang 100 μ L hasil inversi. Sumuran uji ekstrak akan diuji dengan lima konsentrasi ekstrak lempuyang yang berbeda, pengujian dilakukan mulai dari konsentrasi awal 10.000 ppm sebanyak 100 μ L, kemudian dilakukan pengenceran serial dua kali lipat pada sumuran uji sehingga diperoleh konsentrasi berturut-turut sebesar 10.000 ppm (P1); 5.000 ppm (P2); 2.500 ppm (P3); 1.250 ppm (P4); 625 ppm (P5). Sumuran P5 dibuang 100 μ L hasil inversi, tahapan pengujian ekstrak diulangi sebanyak 3 kali. Sumuran kontrol positif ditambahkan antibiotik Ciprofloxacin 2.000ppm sebanyak 100 μ L dan dilakukan dilusi hingga sumuran kontrol positif ke-5 dan dibuang 100 μ L, tahapan kontrol positif diulangi sebanyak 3 kali. Sehingga, kontrol positif menggunakan variasi konsentrasi diantaranya 2.000 ppm, 1.000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, dan 125 ppm. Setelah itu, dimasukkan ekstrak pada sumuran Kontrol Uji (KU) dan dilakukan dilusi sehingga menghasilkan konsentrasi ekstrak yang sama dengan uji. Setelah itu, sumuran yang

akan diujikan ditambahkan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 100 μ L tiap sumuran, kecuali pada sumuran kontrol steril.

Kontrol Pertumbuhan (*Growth Control*) adalah sumur yang hanya berisi media pertumbuhan sebanyak 100 μ L dan inokulum bakteri (tanpa ekstrak) 100 μ L akan disiapkan untuk memverifikasi pertumbuhan bakteri yang optimal. Kontrol Sterilitas (*Sterility Control*) adalah sumur yang hanya berisi media pertumbuhan (tanpa ekstrak dan tanpa bakteri) sebanyak 100 μ L akan disiapkan untuk memverifikasi sterilitas media dan tidak adanya kontaminasi.

Kelompok uji (*Solvent Group*) adalah sumur yang berisi media 100 μ L, inokulum bakteri 100 μ L, dan ekstrak dengan pengenceran serial dua kali lipat, masing-masing konsentrasi diuji secara triplo. Kontrol Antibiotik Positif (*Positive Antibiotic Control*) adalah sumur yang berisi media 100 μ L, inokulum bakteri 100 μ L, dan antibiotik (*Ciprofloxacin*) dengan pengenceran serial dua kali lipat, yang berfungsi untuk memvalidasi sensitivitas bakteri dan kinerja pengujian. Kontrol uji (KU) adalah sumuran berisi media dan ekstrak yang memiliki konsentrasi sama seperti sumuran uji, berfungsi untuk standar perbandingan untuk memastikan nilai OD ekstrak tidak lebih dari kelompok uji.

Mikroplate kemudian akan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah inkubasi, mikroplate akan ditempatkan pada ELISA reader. ELISA reader akan mengukur absorbansi setiap sumur pada panjang gelombang yang sesuai untuk kekeruhan bakteri 630 nm. Data absorbansi dari setiap sumur akan dicatat. MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah ekstrak lempuyang dimana tidak ada pertumbuhan bakteri yang terlihat (yaitu, absorbansi sumur tersebut mendekati absorbansi kontrol sterilitas dan secara signifikan lebih rendah dari kontrol pertumbuhan). Secara kuantitatif, MIC seringkali ditentukan sebagai konsentrasi terendah yang menghasilkan penurunan absorbansi sebesar 90% atau 99% dibandingkan dengan

kontrol pertumbuhan. Data dari 3 pengulangan untuk setiap konsentrasi akan dianalisis secara statistik untuk mendapatkan nilai MIC yang representatif dan memastikan konsistensi hasil (Prakasita *et al.*, 2015).

3.4.11 Analisis Filogenetik

Hasil sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak MEGA-X. Urutan DNA yang dihasilkan diselaraskan menggunakan perangkat lunak MUSCLE yang tertanam dalam MEGA X, dipangkas dan diedit secara manual untuk mendapatkan urutan yang lengkap. Pencarian homologi dilakukan menggunakan program BLASTn terhadap NCBI. *GenBank* basis data (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Model substitusi DNA yang tepat untuk gen *rbcL* dinilai menggunakan fungsi "*find best DNA/Protein Models*" yang tertanam dalam perangkat lunak MEGA X. Selanjutnya, metode statistik kemungkinan maksimum (ML) digunakan untuk menguji kesesuaian terhadap berbagai model evolusi. Berdasarkan nilai estimasi semua parameter untuk setiap model, model yang paling sesuai dengan dataset dari sekuens *rbcL* adalah model reversibel waktu umum (K2) dan model terdistribusi gamma (K2+G) dengan situs invarian (+I) (=K2+G+I). Pohon ML dibangun menggunakan MEGA X dengan semua posisi yang mengandung celah dan data yang hilang dimasukkan untuk analisis (Setiawan *et al.*, 2022).

3.4.12 Analisis Hasil Aktivitas Antibakteri

Data uji *Kirby bauer* digunakan untuk melihat kualitas dari aktivitas antibakteri ekstrak Lempuyang (*Zingiber sp.*) dengan rumus perhitungan diameter zona hambat:

$$\frac{(D_v - D_c) + (D_h - D_c)}{2}$$

Keterangan :

Dv : Diameter vertikal

Dh : diameter horizontal

Dc : Diameter cakram/sumuran

Kekuatan daya hambat dapat dilihat berdasarkan diameter zona hambat yang terbentuk. Ukuran diameter ≤ 5 mm (lemah), 6-10 mm (sedang), 11-20 mm (kuat) dan ≥ 21 mm (sangat kuat). Jika didapatkan ukuran diameter zona hambat ≥ 6 mm, maka dinyatakan ekstrak memiliki aktivitas antimikroba (Zanuba, *et al.*, 2024).

Data uji *Minimum Inhibitory Concentrate* (MIC) digunakan untuk menentukan nilai konsentrasi terkecil yang masih aktif menghambat pertumbuhan bakteri, *microplate* akan menerima sinar tampak 630 nm kemudian ELISA *reader* akan memberikan nilai *optical density* (OD) pada tiap *well*. Nilai OD dicatat untuk semua sumuran, termasuk semua konsentrasi ekstrak, pengulangan, serta kontrol (*Growth Control*, *Sterility Control*, *Positive Control*, *Negative Control*). Hitung rata-rata absorbansi dari triplo pengulangan untuk setiap konsentrasi ekstrak. Hitung standar deviasi (SD) untuk menilai variasi data antar pengulangan. *Growth Control* (GC) sebagai representasi pertumbuhan bakteri tanpa penghambatan. *Sterility Control* (SC) sebagai *baseline* tanpa pertumbuhan bakteri. Normalisasi absorbansi setiap sampel dengan rumus % penghambatan bakteri sebagai berikut.

$$\% \text{Penghambatan Bakteri} = 1 - \frac{\text{OD P} - \text{OD KU}}{\text{OD NC} - \text{OD PC}} \times 100\%$$

Keterangan :

OD P : Nilai *Optical Density* Ekstrak Uji

OD KU : Nilai *Optical Density* Kontrol Ekstrak

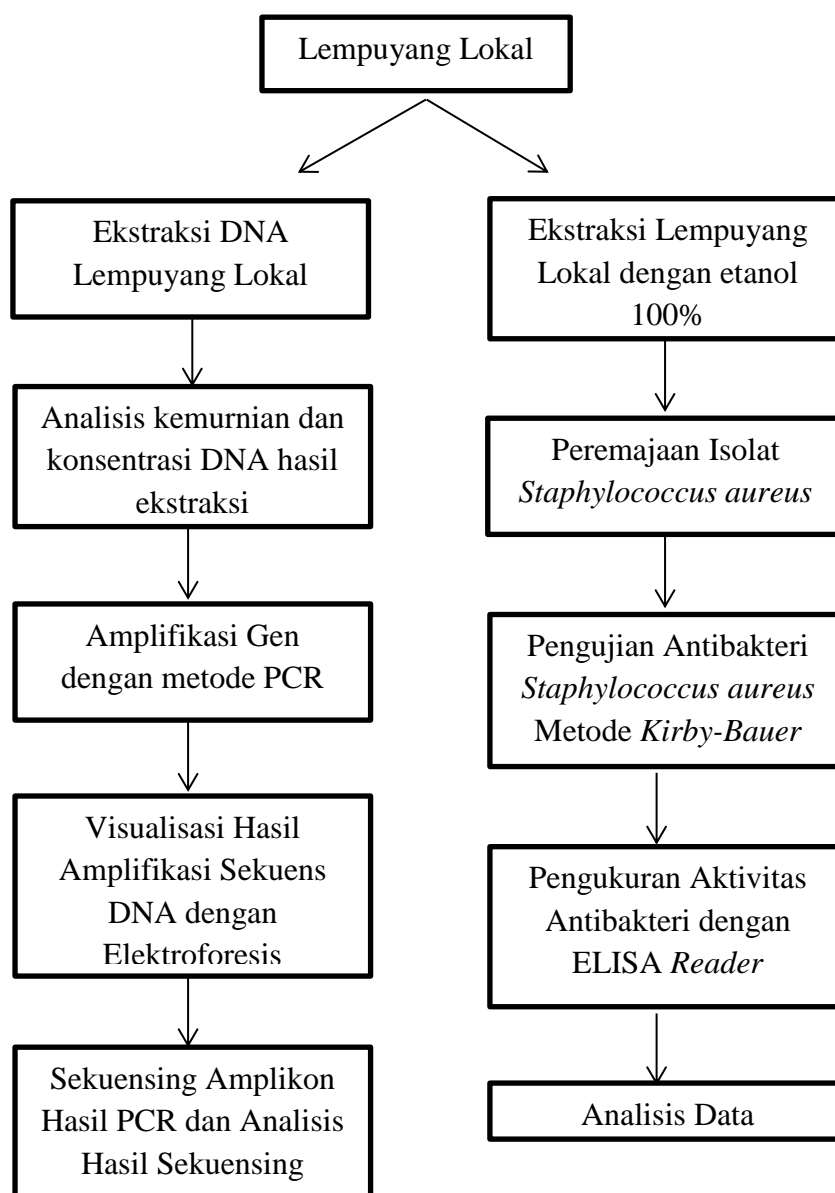
OD NC : Nilai *Optical Density* Kontrol Negatif

OD PC : Nilai *Optical Density* Kontrol Positif

MIC ditentukan sebagai konsentrasi dimana persentase pertumbuhan bakteri $\leq 10\%$ (atau $\geq 90\%$ penghambatan) dibandingkan dengan kontrol pertumbuhan. Hasil nilai MIC yang didapat dianalisis secara statistik dengan *One Way ANOVA* untuk membandingkan efektivitas berbagai konsentrasi (Savitri *et al.*, 2020).

3.5 Diagram Alir Penelitian

Diagram alir penelitian ini disajikan dalam **Gambar 8.** sebagai berikut.



Gambar 8. Diagram Alir Penelitian

V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Identifikasi molekuler menggunakan primer gen *rbcL* menunjukkan bahwa Lempuyang asal Lampung Barat memiliki kedekatan taksonomi dengan spesies *Zingiber zerumbet*, yang terbukti melalui posisi filogenetiknya yang berada dalam satu klad dengan sekuens pembanding dari database GenBank, sehingga sampel ini diberi nama *Zingiber zerumbet* Unila.
2. Ekstrak Lempuyang (*Zingiber zerumbet* Unila) memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *Staphylococcus aureus* terbukti dengan adanya korelasi positif antara peningkatan konsentrasi ekstrak dengan penurunan nilai *Optical Density* (OD), dengan didapatkan nilai *Minimum Inhibitory Concentrate* (MIC) sebesar 2.500 ppm yang memberikan penghambatan pertumbuhan bakteri di atas 90%.

5.2 Saran

Adapun saran untuk penelitian selanjutnya adalah:

1. Disarankan untuk menggunakan marka DNA lain yang lebih bervariasi (seperti ITS atau *matK*) sebagai pembanding marka *rbcL* untuk mendapatkan resolusi filogenetik yang lebih mendalam pada tingkat varietas atau kultivar.

2. Perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap variasi bakteri patogen lain, baik Gram- positif maupun Gram-negatif, untuk mengetahui spektrum hambatan ekstrak secara luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abdilah F., and Kurniawan. 2022. Morphological characteristics of air bacteria in mannitol salt agar medium. *Borneo Journal of Medical Laboratory Technology (BJMLT)*. 2(3): 35-359.
- Afriani, R., Erly, E., dan Jamilah, J. 2023. Analisis filogenetik molekuler dan kekerabatan genetik tanaman suku Zingiberaceae berdasarkan penanda genetik DNA barcoding. *Jurnal Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati*. 10(1): 45-56.
- Amalia, A., Dwiyantri, R. D., dan Haitami, H. 2016. Daya hambat NaCl terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Medical Laboratory Technology Journal*. 2(2): 42-45.
- Andesmora, E. V., Putri, F. M., Oktaviani, W. B., dan Saputra, D. Y. 2022. Zingiberaceae: jenis dan pemanfaatannya oleh masyarakat lokal Jambi. *EDU-BIO: Jurnal Pendidikan Biologi*. 5(2): 80-90.
- Anggraini, D. (2015). *Jarak Genetik Berdasarkan Parameter Region Antar Populasi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press.
- Aprilyanto, V., dan Sembiring, L. 2016. *Filogenetik molekuler*. Yogyakarta: Innosain.
- Asti, A. D. P. 2024. *Identifikasi Molekuler Tanaman Lempuyang (Zingiber zerumbet (L.) Roscoe ex Sm.) Berdasarkan Marka DNA Barcoding rbcL* [Skripsi, Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta]. Repository UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
<https://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/81409>
- Asworo, R. Y., dan Widwiastuti, H. 2023. Pengaruh ukuran serbuk simplisia dan waktu maserasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak kulit sirsak. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Education*. 3(2): 256–263.

- Aziz, F., Lestari, F. B., Indarjulianto, S., dan Fitriana, F. 2022. Identifikasi dan karakterisasi resistensi antibiotik terduga *Staphylococcus aureus* pada susu mastitis subklinis asal sapi perah di kelompok ternak sedyo mulyo, Pakem, Sleman Yogyakarta. *Jurnal Ilmu Peternakan Dan Veteriner Tropis (Journal of Tropical Animal and Veterinary Science)*. 12(1): 66-74.
- Azizi, A., Pi, S., Sari, D. A. P., TP, S., dan ST, A. T. A. 2021. *Metode analisis Next Generation Sequencing (NGS)*. Nas Media Pustaka.
- Bappeda Lampung Barat. 2023. *Rencana Pembangunan Daerah Kabupaten Lampung Barat Tahun 2023-2026*. Liwa: Badan Perencanaan Pembangunan Daerah.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 106(31): 12794–12797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- Chikezie, I. O. 2017. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using a novel dilution tube method. *African journal of microbiology research*. 11(23): 977-980.
- Corvalan, L. C., de Melo-Ximenes, A. A., Carvalho, L. R., e Silva-Neto, C. D. M., Diniz-Filho, J. A., Telles, M. P. D. C., and Nunes, R. 2025. Is there a key primer for amplification of core land plant DNA barcode regions (*rbcL* and *matK*)?. *Ecology and Evolution*. 15(2),: e70961. <https://www.google.com/search?q=https://doi.org/10.1111/1755-0998.13982>
- Cushnie, T. P. T., and Lamb, A. J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5): 343–356.
- Daglia, M. 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 23(2): 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., and Whitman, W. B. (Eds.). 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed (3): The Firmicutes. Springer. (ISBN: 978-0387950419).
- Diyantika, D., Mufida, D. C., dan Misnawi, M. 2014. Perubahan morfologi *Staphylococcus aureus* akibat paparan ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao*) secara in vitro. *Pustaka Kesehatan*. 2(2): 337-345.

- Evangelina, I. A., Syafitri, F. U., Mardiaty, E., dan Laviana, A. 2021. Daya antibakteri fraksi etil asetat daun kemangi (*Ocimum basilicum*) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada clear retainer secara in vitro. Antibacterial potential of the ethyl acetate fraction of basil (*Ocimum basilicum*) leaves on *Streptococcus mutans* ATCC 25175 on a clear retainer. *Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students*. 5(2): 97-104.
- Farisi, S., Setiawan, W. A., and Umar, S. 2020. Isolation of *Salmonella typhoid* 16s rRNA gene fragment based on polymerase chain reaction (PCR). *Jurnal Ilmiah Biologi Eksperimen dan Keanekaragaman Hayati (J-BEKH)*. 7(2): 53-58.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. 270(1512): 313–321.
- Huda, M., Sulistiyowati, T. I., Primandiri, P. R., dan Santoso, A. M. 2022. Kajian etnobotani tanaman obat di Desa Jugo Kecamatan Mojo Kabupaten Kediri. In *Prosiding Seminar Nasional Kesehatan, Sains dan Pembelajaran*. 1(2): 493-502.
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). 2024. *Zingiber*. U.S. Geological Survey. Retrieved from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42429 [Tanggal Akses, e.g., October 30, 2025].
- Kapitan, O. B., Ambarsari, L., dan Falah, S. 2017. In vitro antibakteri ekstrak etanol puni (*Zingiber zerumbet*) asal Pulau Timor. *Savana cendana*. 2(02): 29-32.
- Khoiriyah, M. E., Widiyana, A. P., dan Novita, D. 2024. Uji *in vitro* efektivitas antibakteri ekstrak daun lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*. 10(2).
- Khumaedi, M. S., Suryani, N., dan Sumarlin, U. S. 2023. Formulasi dan aktivitas antibakteri sediaan deo lotion ekstrak etanol rimpang lempuyang wangi (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.) terhadap bakteri *Staphylococcus hominis*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*. 8(2): 114–124. <https://doi.org/10.52447/inrpj.v8i2.6492>

- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.
- Kolondam, B. J., Lengkong, E., Polii, M. J., Pinaria, A., dan Runtunuwu, S. 2012. Barcode dna berdasarkan gen *rbcl* dan *matk* anggrek payus limondok (*Phaius tancarvilleae*)(dna barcode of payus limondok orchid (*Phaius tancarvilleae*) based on the *rbcl* and *matk* genes). *Jurnal Bios Logos*. 2(2).
- Kumar S., Strecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 35: 1547-1549.
- Kress, W. J., Prince, L. M., and Williams, K. J. 2002. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. *American Journal of Botany*. 89(10): 1682-1696.
- Lasmini, T., Hartini, H., Saphira, A., Lincy Dos Marlina, B., dan Margaretta, T. S. 2022. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Swab Rongga Hidung Penjamah Makanan di Jalan Durian Kota Pekanbaru. *Prosiding Asosiasi Institusi Pendidikan Tinggi Teknologi Laboratorium Medik Indonesia*. 1: 281-292.
- Lestari, D. A., Azrianingsih, R., dan Hendrian, H. 2018. Variasi genetik *Annona muricata* L. di Jawa Timur, Indonesia berdasarkan penanda Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR). *Jurnal Biologi Indonesia*. 14(1): 11–21.
<https://doi.org/10.47349/jbi/14012018/11>
- Lestari, N. 2025. *Uji Aktivitas Beberapa Jenis Antibiotik terhadap Bakteri Staphylococcus aureus* (Doctoral dissertation, Universitas Medan Area).
- Lestari, S. I., dan Santoso, B. 2021. Analisis kromatografi lapis tipis (KLT) dan aktivitas penangkapan radikal bebas (PRB) ekstrak etanol lempuyang emprit (*Zingiber americans*) hasil maserasi sekali dan maserasi berulang. *Biomedika*. 13(1): 76-82.
- Luhurningtyas, F. P., Susilo, J., Yuswantina, R., Widhihastuti, E., dan Ardiyansah, F. W. 2021. Aktivitas imunomodulator dan kandungan fenol ekstrak terpurifikasi rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* Rosc. Var. Rubrum). *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*. 4(1).

- Maddeppungeng, N. M., Tahir, K. A., Nurdin, N. C., dan Wahyuni, S. 2023. Formulasi dan evaluasi dermal patch ekstrak metanol rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet L.*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro dan in vivo. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia*. 9(2): 621-631.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2025. *Zingiber zerumbet isolate Unila rbcL gene, partial cds; chloroplast (GenBank Accession No. LC903195.1)*. Diakses dari <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/LC903195.1>
- Nei M. and Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Nurhayati, L. S., Yahdiyani, N., dan Hidayatulloh, A. 2020. Perbandingan pengujian aktivitas antibakteri starter yogurt dengan metode difusi sumuran dan metode difusi cakram. *Jurnal Teknologi Hasil Peternakan*. 1(2): 41-46.
- Nurniza, N., Kartika, D., Maulani, C., Attamimi, F. A., and Riani, S. N. 2023. Antibacterial effect of black ethanol extract (*Camellia sinensis*) on the growth of *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *YARSI Dental Journal*. 1(01): 19-31.
- Nurazizah, R. P., Chakim, I., dan Sayono, S. (2024). Uji aktivitas antibakteri ekstrak rimpang kencur dan lempuyang terhadap bakteri *Stutzerimonas stutzeri* yang ditemukan pada pasien ulkus diabetikum. In *Prosiding Seminar Nasional Unimus* (Vol. 7).
- Ondusko, D. S., and Nolt, D. 2018. *Staphylococcus aureus*. *Pediatrics in review*. 39(6): 287-298.
- Paputungan, W. A., Lolo, W. A., dan Siampa, J. P. 2019. Aktivitas antibakteri dan analisis KLT-Bioautografi dari fraksi biji kopi robusta (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner). *Pharmacon*. 8(3): 516–524.
- Prakasita, V. C., Septhimoranie, J., Aditiyarini, D., dan Budiarmo, T. Y. 2015. Efektivitas antibakteri ekstrak kulit batang belimbing wuluh terhadap *Escherichia coli* penyebab diare. *Bioeksperimen: Jurnal Penelitian Biologi*. 8(2): 79–87.
- Pramiciba, K., Wahyuni, D. S., dan Aziz, Purwantoyo. 2015. Identifikasi variasi genetik *Zingiber officinale* berdasarkan sekuens DNA *rbcL*. *Scripta Biologica*. 2(1): 1-6.

- Putri, C. R., Kusumaningrum, H. P., dan Kusdiyantini, E. 2016. Keragaman genetik jahe (*Zingiber officinale* Roscoe) menggunakan teknik penanda molekuler random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Jurnal Akademika Biologi*. 5(2): 87-97.
- Rachmadanti, R. S., Maya, P. P., Utami, D. A. S. P., Dewi, A. R., Taranita, R., dan Maryanty, Y. 2025. Uji daya hambat minyak atsiri rimpang lempuyang wangi (*zingiber aromaticum*) dan rimpang lengkuas (*Alpina galanga*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Distilat: Jurnal Teknologi Separasi*. 11(2): 355-369.
- Rahmayani, L., Harahap, F., Manalu, K., Idami, Z., and Prasetya, E. 2021. DNA BARCODING of *Zingiber loerzingii* Valetton USING Ribulose-1, 5-biphosphate Carboxylase-Oxygenase Large subunit Gene (*rbcL*) GENE LOCUS. *Jurnal Biosains Unimed*. 7(3): 166-173.
- Rohmah, J., and Rini, C. S. 2022. Antibacterial Activity of Rhizome Extracts of *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoeex Sm. Against *Streptococcus pneumoniae*. *Proceedings of the 1st SENARA 2022*. 1(1): 1007-1016.
- Sagala, L. R. 2021. *Penentuan Barcode DNA Berdasarkan Lokus Gen rbcL Pada Zingiber Loerzingii Valetton* (Doctoral dissertation, Universitas Islam Negeri Sumatera Utara).
- Salsabila, S., Ifandi, I., and Ahsanunnisa, R. 2023. Antibacterial Activity of *Zingiber zerumbet* Rhizome Extract Against Pathogenic Bacteria. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 20(1): 45-52.
- Sanjaya, A., dan Ratnawati, H. 2017. Penelitian ekspresi genetik berbasis Ribonucleic Acid (RNA) menggunakan teknologi PCR hingga sequencing. *Jurnal Medika Cendikia Utama (MCU)*. 7(2): 145–158.
- Santoso, H. B. 2024. *Farm Bigbook Budi Daya Empon-Empon Berkhasiat*. Penerbit Andi.
- Sari, M. A. R., Qurrohman, M. T., and Dewangga, V. S. 2024. Detection of *mecA* gene as a marker for *Staphylococcus aureus* types of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using PCR technique. *Jurnal Biologi Tropis*. 24(4): 204-211.
- Savitri, G. R., Triatmoko, B., dan Nugraha, A. S. 2020. Skrining fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi tumbuhan anyang-anyang (*Elaeocarpus grandiflorus* J. E. Smith.) terhadap *Escherichia coli*.

JPSCR: Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research. 5(1): 22–32.

- Sembiring, E. R., Terryana, R. T., Anggraheni, Y. G. D., Prihaningsih, A., Batubara, I., Nurcholis, W., ... dan Harmoko, R. 2023. Efektivitas metode ekstraksi DNA pada daun segar dan kering dari tanaman obat. *Vegetalika*. 12(3): 211-227.
- Setiawan, A., Lutfiah, R., Juliasih, N. L. G. R., Setiawan, W. A., Hendri, J., and Arai, M. 2022. Antibacterial activity of EtOAc extract from marine-derived fungus *Aspergillus nomiae* A12-RF against clinical pathogen bacteria, *Staphylococcus aureus*. *AACL Bioflux*. 15(3): 1413-1421.
- Setiawan, W. A., Irawan, B., Handayani, K., Adna, F. S., Putri, A. N., and Setiawan, A. 2025. Polyketide synthase (PKS) gene fragment from actinobacteria *Kocuria palustris* 19C38A1. In *Proceedings of the 5th International Conference on Applied Sciences, Mathematics, and Informatics (ICASMI 2024)* (Vol. 13, p. 263). Springer Nature.
- Silalahi, M. 2018. Botani dan bioaktivitas lempuyang (*Zingiber zerumbet* (L.) Smith.). *Jurnal EduMatSains*. 2(2): 49-62.
- Sivaranjani, M., Gowrishankar, S., and Pandian, S. K. 2014. Anti-quorum sensing and antibiofilm potential of *Zingiber officinale* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98(20): 8611–8623.
- Sjafaraenan, S., Lolodatu, H., Johannes, E., Agus, R., dan Sabran, A. 2018. Profil DNA gen follicle stimulating hormone reseptor (Fshr) pada wanita akne dengan teknik PCR dan Sekuensing DNA. *Bioma: Jurnal Biologi Makassar*. 3(1): 1-11.
- Smith, J. F., Kress, W. J., and Zimmer, E. A. 1993. Phylogenetic analysis of the Zingiberales based on *rbcL* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 80(3): 620–630. <https://doi.org/10.2307/2399850>
- Sriana, H., Wahdah, R., dan Susanti, H. 2022. Keberhasilan dua jenis sterilan dan lama penyinaran lampu UV (ultra violet) pada sterilisasi eksplan bonggol pisang talas (*Musa paradisiaca* L. var. *sapientum*). *Enviro Scientiae*. 18(2): 151-159.

- Suwardji, K. V., Prayuni, K., Andayani, S. H., Zulhamidah, Y., Sofwan, A., Muflihah, L., ... and Judasah, I. 2023. Detection of ADAM33 gene variants using sanger sequencing. *Majalah Sainstekes*. 10(2): 117-125.
- Syarif, S., Nurnaningsih, N., dan Pratama, M. 2020. Uji aktivitas ekstrak etanol daun kersen (*Muntingia calabura l.*) sebagai inhibitor enzim α -glukosidase dengan menggunakan ELISA reader. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. 7(2): 1-5.
- Tamura K., Battistuzzi FU., Billing-Ross P., Murillo O., Filipski A., and Kumar S. 2012. Estimating divergence times in large molecular phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109: 19333-19338.
- Tani Maju Indonesia. 2018. *Lempuyang Wangi / Puyang (Zingiber aromaticum)*. Agrokompleks Kita. <https://agrokomplekskita.com/lempuyang-wangi/>
- Tasma, I. M. 2015. Pemanfaatan teknologi sekuensing genom untuk mempercepat program pemuliaan tanaman. *Jurnal Penelitian dan Pengembangan Pertanian*. 34(4): 30950.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., and Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: A review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*. 1(1): 98–106.
- Triatmoko, B., Almuttaqin, H., dan Dianasari, D. 2018. Uji aktivitas antibakteri kombinasi minyak atsiri biji ketumbar (*Coriandrum sativum L.*) dan gentamisin terhadap *Staphylococcus epidermidis*. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 6(3): 421–425.
- Visakhadevi, J., Hidayati, N., Fitriani, M., dan Andriyono, S. 2023. Aplikasi metode ELISA dalam deteksi residu antibiotik kloramfenikol pada produk olahan perikanan. *PoluSea*. 1(1): 1-9.
- Wahyuni, S., Bermawie, N., dan Kristina, N. N. 2013. Karakteristik morfologi, potensi produksi dan komponen utama rimpang sembilan nomor lempuyang. *Jurnal Littri*. 19(3): 99-107.
- Wang, Z., Chen, H., Ni, J., Huang, G., Dong, J., Li, H., and Xia, M. 2026. The complete plastome and phylogenetic analysis of *Zingiber ottensii* Valetton. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*. 11(3): 398-403.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2026.2622800>

- Wardani, S. K. 2023. Identifikasi *Staphylococcus* Spp Pada Swab Mukosa Rongga Mulut Pedagang Angkringan Yang Merokok di Kota Kediri. *Jurnal Wiyata: Penelitian Sains dan Kesehatan*. 10(2): 170-175.
- Widiyastuti, S., Marpaung, G. N., dan Sundu, R. 2023. Formulasi dan evaluasi *dermal patch* ekstrak metanol rimpang lempuyang gajah (*Zingiber zerumbet* L.) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Mandala Pharmacon Indonesia (JMPI)*. 9(2): 241-252. <https://doi.org/10.35311/jmpi.v9i2.425>
- Wilastra, A. S., Gushairiyanto, G., Erina, S., dan Depison, D. 2020. Analisis Jarak Genetik Sapi Bali pada Tiga Kecamatan di Kabupaten Merangin Provinsi Jambi. *Jurnal Peternakan*. 18(1): 1-12.
- Xia, M., Jiang, D., Xu, W., Liu, X., Zhu, S., Xing, H., ... and Li, H. L. 2024. Comparative Chloroplast genome study of Zingiber in China sheds light on plastome characterization and phylogenetic relationships. *Genes*. 15(11): 1484.
- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., and Ren, L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: Structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22(1): 132–149.
- Yuliani, D., Setyawan, B., dan Carsono, N. 2017. Karakterisasi Molekuler dan Visualisasi Pita DNA Berdasarkan Marka SSR pada Populasi F2 Hasil Persilangan Padi Lokal. *Jurnal Agro (atau Jurnal Agrikultura)*. 4(2): 85–94. <https://doi.org/10.15575/12345>
- Zanuba, N. M. N., Widiyana, A. P., dan Wulandari, D. N. 2024. Uji in vitro aktivitas antimikroba ekstrak air rimpang lempuyang emprit (*Zingiber littorale*) terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*, 10(2).