

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan Negara kepulauan yang mempunyai kawasan karst yang tersebar di hampir semua pulau-pulau besar dari Sumatra sampai Papua. Karst adalah sebuah bentuk permukaan bumi yang pada umumnya dicirikan dengan adanya depresi tertutup (*closed depression*), drainase permukaan, dan gua. Daerah ini dibentuk terutama oleh pelarutan batuan, kebanyakan batu gamping. Wilayah karst biasanya berbukit-bukit dengan banyak gua (Mubarak et al., 2017). Salah satu kawasan karst yang ada di Sulawesi Selatan adalah Kawasan Karst Maros-Pangkep yang tersusun secara umum memiliki beberapa jenis batuan seperti batu pasir, batu bara, lava, breksi, batu gamping dan batu sedimen. Sejak 24 Mei 2023, UNESCO telah menetapkan kawasan karst Maros-Pangkep sebagai bagian dari daftar UNESCO *Global Geopark* dan mengakuinya sebagai salah satu dari 10 situs geopark teratas di Indonesia. Karst Maros-Pangkep dianggap sebagai bentang alam terluas dan terindah kedua di dunia setelah karst di Guangzhou, Tiongkok. Kawasan ini juga terkenal dengan warisan budayanya dengan adanya jejak-jejak peradaban prasejarah yang dapat diamati di ratusan gua purba yang tersebar di seluruh wilayah. Setidaknya terdapat 135 gua, di mana sekitar 78 gua di antaranya masih memiliki jejak peninggalan dengan berbagai bentuk lukisan cadas, termasuk keberadaan lukisan purba tertua di dunia yang berumur sekitar 40.000 tahun (Fatinaware et al., 2019 ; Zhafirah et al., 2024 ; Haedar et al., 2024).

Salah satu faktor yang diduga mempengaruhi lukisan prasejarah pada batuan sebagai akibat proses alami umumnya berupa pelapukan. Pelapukan pada batuan biasanya disebabkan karena kelembapan akibat dari rembesan air secara kapilaritas dalam batuan atau secara hidrologis menembus struktur batuan pembentuk gua. Curah hujan yang tinggi dapat membuat air meresap hingga menembus dan membasahi permukaan batuan bergambar hingga tanah. Kondisi seperti itu menyebabkan mikroorganisme tumbuh subur dan berkembang biak dengan cepat (Permana et al., 2021). Ekosistem karst sampai saat ini belum banyak tersentuh, ekosistem ini menyimpan potensi keanekaragaman mikroorganisme yang sangat tinggi. Dimana, mikroba ini dapat dijadikan sebagai sumber senyawa bioaktif karena beberapa bakteri di gua mungkin memproduksi senyawa antimikroba sebagai alat pertahanan diri atau untuk mendapatkan keunggulan kompetitif dalam ekosistem yang bersaing.

Saat ini, penggunaan obat-obatan yang tidak rasional adalah masalah yang tersebar luas di semua tingkat pelayanan kesehatan, terutama di rumah sakit. Penggunaan antibiotik di rumah sakit yang tidak perlu atau berlebihan mendorong berkembangnya resistensi terhadap bakteri tertentu. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dapat memicu resistensi yang dapat meningkatkan morbiditas, mortalitas, dan biaya kesehatan (Anggita et al., 2022). Adapun

kekhawatiran yang muncul dalam penanganan penyakit infeksi mendorong berbagai penelitian dalam mengeksplorasi senyawa antibiotik yang baru (Damayanti et al., 2022). Menurut data dari *Global Research on antimicrobial Resistance* pada tahun 2022, bahwa infeksi bakteri dikaitkan dengan satu dari delapan kematian global. Hingga sampai sekarang tahun 2024 masih menjadi permasalahan. Penyakit infeksi menjadi salah satu permasalahan kesehatan yang banyak terjadi di negara berkembang. Infeksi merupakan keadaan yang diakibatkan oleh masuknya mikroorganisme yang menyerang jaringan manusia, salah satunya adalah bakteri, baik itu bakteri gram positif (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) maupun bakteri gram negatif (*E. coli*, *Salmonella typhi*) (Mulyani et al., 2021).

Antibiotik adalah bahan obat yang sangat memegang peranan penting dalam menanggulangi penyakit infeksi. Senyawa antimikroba dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan, hewan dan mikroba. Senyawa aktif antimikroba dari bakteri memiliki keunggulan dari senyawa tumbuhan dan hewan karena banyak bakteri memiliki mekanisme pertahanan terhadap mikroba lain, sehingga senyawa yang dihasilkan bisa sangat efektif dalam mengatasi infeksi. Senyawa antimikroba yang dihasilkan oleh mikroba memiliki keunggulan dibandingkan dengan antibiotik sintetik, karena memiliki sifat yang lebih efektif, sebab targetnya spesifik serta toksisitasnya rendah (Damayanti et al., 2022). Penemuan antibiotik saat ini telah banyak dilakukan yang bersifat sebagai antimikroba. Namun seiring dengan berjalannya waktu pemakaian antibiotik yang dilakukan secara berulang-ulang dapat memberikan efek negatif yakni meningkatkan resistensi mikroba patogen terhadap antibiotik. Selain itu, ketika bakteri menjadi resisten, infeksi yang disebabkan oleh mikroba ini lebih sulit diobati. Hal ini dapat menyebabkan penggunaan antibiotik yang lebih kuat atau kombinasi antibiotik, yang pada gilirannya dapat meningkatkan risiko lebih lanjut terhadap resistensi (Siahaan et al., 2022).

Penggunaan senyawa bakteri untuk antimikroba alami perlu dibuktikan dengan pengujian ilmiah. Pengujian potensi aktivitas antimikroba senyawa dari bakteri dapat dilakukan secara *in vitro* dan *in silico*. Pengujian *in vitro* untuk memberikan data yang langsung dan akurat tentang efektivitas senyawa terhadap mikroorganisme tertentu. Adapun pengujian *in silico* merupakan tahapan dalam pengujian potensi aktivitas kandidat obat baru yang paling sering digunakan karena pengerjaannya mudah, efektif dan waktu pengerjaan lebih efisien. Pengujian *in silico* menggunakan piranti lunak untuk memprediksi interaksi kimia antara senyawa uji dengan reseptor target secara molekuler sehingga dapat diprediksi aktivitas dari suatu senyawa aktif.

Berdasarkan uraian di atas, perlu dilakukan isolasi dan analisis antimikroba yang mampu menghambat dan membunuh bakteri patogen. Selain itu, perlu diadakan suatu penelitian tentang pencarian senyawa bioaktif yang baru sebagai kandidat antimikroba dari senyawa suatu bakteri, serta jenis isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan antimikroba terbaik dari bakteri gua Kawasan Karst Maros-Pangkep.

1.2 Tujuan

1. Mengisolasi dan menganalisis potensi bakteri sebagai antimikroba dari beberapa gua Kawasan Karst Maros-Pangkep terhadap bakteri patogen secara *in vitro*.
2. Menganalisis jenis senyawa dari isolat bakteri yang berpotensi sebagai antimikroba terhadap bakteri patogen dari beberapa gua Kawasan Karst Maros-Pangkep secara *in silico*.
3. Mengetahui jenis isolat bakteri yang memiliki kemampuan menghasilkan antimikroba yang diisolasi dari beberapa gua Kawasan Karst Maros-Pangkep.

1.3 Manfaat

1. Bagi peneliti hendaknya dapat dijadikan sebagai salah satu acuan bagi pelaksanaan penelitian-penelitian yang relevan selanjutnya.
2. Dapat dijadikan sebagai pengembangan obat-obatan baru yang lebih efektif terhadap patogen, terutama yang resisten terhadap antibiotik yang ada.
3. Bagi Masyarakat memberikan informasi mengenai aktivitas antimikroba alami bakteri dari Kawasan Karst Maros Pangkep.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

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

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada uji *in silico* antara lain laptop dan perangkat lunak yaitu PyMol, MarvinSketch, PyRx, Discovery Studio Visualizer, BioEdit, MEGA 11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*), website *Protein Data Bank* (PDB) dan PubChem serta NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Pada pengujian secara *in vitro* alat yang digunakan yaitu alat gelas (gelas kimia, gelas ukur, erlenmeyer, cawan petri, objek gelas, tabung reaksi, batang pengaduk, preparat, corong pisah, dan desikator), non-gelas (labu semprot, spoit, pipet tetes, ose lurus, ose bulat, pinset, gegep, pencadang, bunsen, spatula, penggaris, rak tabung reaksi, cawan porselen, cuvet, tabung *sentrifuge*, *micro tube*, *micropipet*, tip, comb (sisir agarosa), cetakan gel agarosa), alat instrumen (oven, inkubator, *hot plate*, *rotary evaporator*, sentrifugasi, mikroskop, lemari pendingin, *Laminar Air Flow* (LAF), elektroforesis, Spektrofotometer UV-Vis, *rotary shaker*, vortex, microwave, FTIR, GC-MS, PCR (*Polymerase Chain Reaction*), UV-transiluminator, dan *gel-doc*) dan alat non-instrumen (enkas, timbangan digital, dan autoklaf).

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat bakteri yang diisolasi dari tanah gua karst kawasan Maros-Pangkep, isolat bakteri uji berupa *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, media Tryptic Soy Agar (TSA), media Nutrient Agar (NA), media Mueller Hinton Agar (MHA), media Mueller Hinton Broth (MHB), aquades, alkohol 70%, etil asetat, antibiotik ciprofloxacin, pewarnaan gram dan endospora (kristal violet, lugol iodin, alkohol-aseton, safranin dan *malachite green*), uji biokimia (media Sulfid Indol Motility (SIM), media Triplep Sugar Iron Agar (TSIA), media Metil-Red Voges-Proskauer (MR-VP), dan media Simmons Citrate Agar (SCA), reagen kovaks, KOH 40%, α -naftol, hidrogen peroksida (H_2O_2), methyl red, KBr (Kalium Bromida), Gen 16S rRNA, proteinase K, etidium bromida, *loading dye*, buffer TE, buffer GD, buffer GA, TAE buffer, ddH₂O (*Disilled Deionized Water*), kapas, minyak imersi, silika gel, *cling wrap*, plastik sampel dan aluminium foil.

2.3 Metode Kerja

Prosedur penelitian ini memiliki dua tahap uji yang saling berkaitan yaitu uji *in vitro* dan *in silico*. Uji *in vitro* dilakukan di dalam laboratorium dan dilakukan teknik analisis kualitatif dan kuantitatif sedangkan uji *in silico* pada penelitian ini menggunakan metode *molecular docking*. Uji *in silico* menghasilkan interaksi molekuler antara protein dan ligan sedangkan uji *in vitro* menghasilkan aktivitas antibakteri. Pada uji *in silico* menggunakan metode *molecular docking*, senyawa dari bakteri berperan sebagai ligan sedangkan enzim dari bakteri berperan sebagai protein atau reseptor. Protein dan ligan tersebut diunduh dan dipreparasi yang kemudian langsung dilakukan simulasi menggunakan *molecular docking*. Hasil dari *molecular docking* lalu divisualisasi sehingga didapatkan interaksi molekuler yang selanjutnya dapat dianalisis.

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil dari kawasan batuan karst Maros-Pangkep, diantaranya yaitu Gua Leang Jarie, Gua Leang Ulu Wae, dan Gua Leang Kassi. Proses pengambilan sampel dilakukan dengan menggunakan spatula untuk mengambil dua sampel tanah dari lokasi masing-masing gua tersebut (Leang Jarie (LJ), Leang Ulu Wae (LU), dan Leang Kassi (LK)), yang kemudian dimasukkan ke dalam plastik sampel. Selanjutnya, isolasi dan identifikasi sampel dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, Makassar.

2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

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

2.3.3 Pembuatan Media

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

Pembuatan Medium Tryptic Soy Agar (TSA). Sebanyak 4 gram bubuk TSA yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades di dalam erlenmeyer. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

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

Pembuatan Medium Mueller Hinton Broth (MHB). Sebanyak 2,1 gram medium MHB dilarutkan ke dalam 100 ml akuades di dalam erlenmeyer. Media dilarutkan dengan cara diaduk menggunakan batang pengaduk. Selanjutnya mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP). Sebanyak 1,7 gram medium MR-VP yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades ke dalam gelas kimia. Media dilarutkan dengan cara diaduk menggunakan batang pengaduk. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi kecil ditutup dengan menggunakan kapas lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium Sulfid Indol Motility (SIM). Sebanyak 3 gram medium SIM yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades ke dalam gelas kimia. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi kecil ditutup dengan menggunakan kapas lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium Triple Sugar Iron Agar (TSIA). Sebanyak 6,5 gram medium TSIA yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades ke dalam gelas kimia. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi kecil ditutup dengan menggunakan kapas lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pembuatan Medium Simmons Citrate Agar (SCA). Sebanyak 2,42 gram medium SCA yang telah ditimbang dilarutkan ke dalam 100 mL aquades ke dalam gelas kimia. Media kemudian dipanaskan dan dihomogenkan pada hotplate dengan memasukkan *magnetic stirrer*. Selanjutnya medium dimasukkan ke dalam beberapa tabung reaksi kecil ditutup dengan menggunakan kapas lalu disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

2.3.4 Isolasi Bakteri dari Tanah Kawasan Karst Maros-Pangkep

Bakteri diisolasi dengan cara melakukan pengenceran bertingkat hingga 10^{-3} dari sampel, lalu menumbuhkannya pada media TSA. Media tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah itu, koloni bakteri yang tumbuh dan terbentuk zona bening di sekitarnya lalu dimurnikan 2-3 kali hingga didapatkan isolat yang murni.

2.3.5 Seleksi Bakteri Penghasil Senyawa Antimikroba

Seleksi dilakukan melalui pengujian antagonis, di mana isolat bakteri dikultur bersama bakteri uji untuk menilai kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Sebanyak 0,2 mL suspensi bakteri uji (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*) dimasukkan masing-masing ke dalam erlenmeyer berisi 100 mL media MHA lalu dicampur/dihomogenkan. Kemudian di tuang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Diberi label sebagai penanda.

Selanjutnya, isolat bakteri digoreskan dengan gores sinambung pada permukaan media yang sudah memadat. Media kemudian diinkubasi selama 2-3 hari. Isolat bakteri yang mampu menghasilkan senyawa antibakteri akan menunjukkan adanya area bening atau zona hambat di sekitar koloni bakteri uji.

2.3.6 Karakterisasi Bakteri

Pengamatan Morfologi Koloni. Satu ose isolat bakteri diinokulasi pada medium Nutrient Agar (NA) dengan menggunakan metode gores kuadran, lalu diinkubasi selama 1x24 jam. Setelah inkubasi, koloni yang terbentuk diperiksa dengan mikroskop stereo. Observasi morfologi mencakup bentuk, tepi, warna, dan elevasi koloni bakteri.

Pengamatan Morfologi Sel

Pengecatan Gram. Teknik pewarnaan gram dilakukan dengan langkah awal membersihkan kaca objek menggunakan alkohol 95% dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen sehingga bebas dari kotoran. Kaca objek dipanaskan dengan cara dilewatkan di atas api bunsen, kemudian ditunggu hingga sedikit dingin. Ambil isolat bakteri dengan jarum ose secara aseptis dan dioles tipis pada gelas objek. Fiksasi spesimen dilakukan dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak tiga kali. Pastikan bahwa tidak terjadi pemanasan yang berlebihan. Sebanyak 2-3 tetes cat A (kristal violet) ditetaskan pada ulasan bakteri, diamkan selama 60 detik kemudian dibilas dengan aquades. Kemudian sebanyak 2-3 tetes cat B (larutan lugol) ditetaskan di atas preparat dan dibiarkan selama 60 detik, preparat kemudian dibilas dengan aquades. Selanjutnya sebanyak 2-3 tetes cat C (dekolorisasi dengan ditetesi alkohol 95%) ditambahkan pada preparat lalu dibilas dengan aquades. Kemudian preparat ditetesi cat D (safranin) sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 30 detik, preparat lalu dibilas. Setelah itu diamati dibawah mikroskop.

Pengamatan Endospora. Pengamatan endospora dilakukan menggunakan teknik pengecatan khusus untuk menilai kemampuan bakteri dalam membentuk endospora. Caranya adalah dengan membuat ulasan bakteri pada *slide*, kemudian meneteskan *malachite green*. *Slide* tersebut ditempatkan di atas penangas air selama 10 menit, lalu dibilas dengan aquades. Selanjutnya, *slide* diberi safranin dan dibiarkan selama 30 detik sebelum dibilas dengan aquades. Hasil pengecatan kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100-1000x.

2.3.7 Uji Biokimia

Uji Motilitas, Uji Indol dan H₂S. Diambil suspensi bakteri dengan menggunakan ose lurus dan diinokulasikan suspensi bakteri ke dalam tabung reaksi pada media SIM dengan menggunakan metode tusuk. Kultur bakteri diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditandai dengan adanya rambatan akar dan perubahan warna pada media menjadi keruh yang mengindikasikan bahwa bakteri memiliki alat gerak (motil). Kemudian diinkubasi kembali selama 2x24 jam pada suhu 37 °C lalu ditambahkan reagen kovaks sebanyak 2-3 tetes untuk melihat apakah isolat bakteri mampu membentuk indol

dari tryptopan yang ditandai dengan terbentuknya cincin pada permukaan media yang berwarna merah lembayung. Selain itu jika terbentuk endapan berwarna hitam menandakan isolat bakteri mampu bereaksi dengan gugus sulfur dengan enzim desulfurase.

Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar). Diambil suspensi bakteri menggunakan ose lurus dan diinokulasikan isolat bakteri pada media TSIA dengan metode tusuk pada daerah *butt* dan gores sinambung pada daerah *slant*. Bakteri diinkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditandai dengan perubahan media dari merah kekuning yang menandakan isolat bakteri memfermentasi gula (glukosa, sukrosa dan laktosa) dan hasil akhirnya adalah asam. Kemudian pada uji ini dapat diketahui bakteri memproduksi gas yang ditandai dengan medium terangkat.

Uji Sitrat. Diambil suspensi bakteri uji menggunakan ose bulat dan diinokulasikan bakteri pada media SCA dengan metode gores sinambung. Bakteri diinkubasi selama 1×24 jam pada suhu 37 °C. Hasil positif ditandai dengan adanya perubahan warna media dari hijau menjadi warna biru. Hal ini menandakan bakteri menggunakan sitrat sebagai satu-satunya sumber karbon.

Uji MR (Methyl Red). Diambil suspensi bakteri menggunakan spoit sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan suspensi bakteri pada tabung reaksi yang berisi media MR-VP lalu dihomogenkan. Bakteri diinkubasi selama 5×24 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, ditambahkan indikator methyl red. Hasil positif ditandai dengan adanya terbentuk warna merah muda sampai merah pada media yang menandakan bakteri menghasilkan asam campuran dari proses fermentasi glukosa.

Uji VP (Voges Proskauer). Diambil suspensi bakteri menggunakan spoit sebanyak 0,2 mL dan dimasukkan suspensi bakteri pada tabung reaksi yang berisi media MR-VP lalu dihomogenkan. Bakteri diinkubasi selama 3×24 jam pada suhu 37 °C. Setelah diinkubasi, ditambahkan 0,2 mL KOH dan 0,6 mL α -naftol. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna media dari kuning menjadi merah yang menandakan bakteri melakukan fermentasi 2,3-butanadiol sehingga mendeteksi asetoin dalam kultur bakteri.

Uji Katalase. Diambil isolat bakteri menggunakan ose bulat dan diulas pada kaca preparat. Setelah itu, ditetaskan 2-3 tetes pereaksi H₂O₂ pada ulasan bakteri. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya gelembung gas pada preparat yang menandakan bakteri menghasilkan enzim katalase.

2.3.8 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Tahap Pra-kultur Isolat Bakteri. Isolat bakteri dari stok NA (Nutrien Agar) diambil dan diinokulasikan ke dalam 25 mL media Mueller Hinton Broth (MHB) pada masing-masing erlenmeyer, kemudian diinkubasi dishaker selama 24 jam pada kecepatan 120 rpm.

Tahap Kultur Isolat Bakteri. Isolat bakteri yang berumur 24 jam dari pra kultur media MHB kemudian diambil dan diinokulasikan pada media Mueller Hinton Broth (MHB) 50 mL pada Erlenmeyer dan di shaker pada kecepatan 120 rpm selama 1×24 jam, 3×24 jam dan 5×24 jam.

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

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

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

Pengujian Aktivitas Antibakteri. Pengujian ini dilakukan saat kultur bakteri dari kawasan karst Maros-Pangkep selama 1×24 jam, 3×24 jam, dan 5×24 jam dengan metode difusi sumuran. Dituangkan 0,2 mL suspensi bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara aseptis ke dalam masing-masing erlenmeyer yang berisi media MHA sebanyak 100 mL lalu dihomogenkan agar bakteri uji dan media tercampur dengan merata, selanjutnya dituangkan medium MHA tanpa suspensi bakteri pada masing-masing cawan petri sebagai bash kultur, lalu ditunggu hingga memadat. Kemudian dibagi menjadi 4 bagian pada plate dan disetiap zona diberi satu pencadang. Setelah bash kultur padat, disetiap zona diberi satu pencadang lalu dituangkan media MHA berisi suspensi bakteri. Setelah memadat pencadang diambil menggunakan pinset dan terbentuk sumuran. Setiap sumuran diisi dengan senyawa yang di ujikan (supernatan bebas sel dari isolat bakteri asal Kawasan Karst Maros-Pangkep dan antibiotik ciprofloxacin sebagai kontrol positif) masing-masing sebanyak 4 tetes menggunakan spoit. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1×24 jam dan diukur daerah hambatannya untuk melihat potensinya dalam menghambat bakteri uji. Kemudian diinkubasi kembali 1×24 jam untuk mengetahui apakah isolat bakteri bersifat menghambat atau membunuh bakteri.

2.3.9 Analisis Kualitatif dan Kuantitatif Ekstrak Isolat Bakteri

Partisi dan Ekstraksi. Untuk mengidentifikasi jenis senyawa antibakteri dari isolat bakteri yang memiliki aktivitas antimikroba, dilakukan uji kualitatif menggunakan *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) dan uji kuantitatif *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Isolat bakteri ditumbuhkan dalam media Mueller Hinton Broth (MHB) dan dishaker selama 3 hari. Setelah itu, kultur bakteri disentrifugasi untuk mendapatkan supernatan bebas sel. Kemudian supernatan bebas sel dilarutkan dengan etil asetat dalam rasio 1:1, masing-masing sebanyak 500 mL. Campuran ini dimasukkan ke dalam corong pisah dan diaduk, lalu didiamkan agar lapisan supernatan bebas sel dan etil asetat terpisah. Ekstrak

etil asetat kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* selama 40 menit pada suhu 70°C untuk memperoleh fraksi ekstrak etil asetat kental (Fahmy and Abdel-Tawab, 2021). Selanjutnya ekstrak disimpan di dalam desikator.

Analisis Kualitatif Menggunakan Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). Hasil evaporasi kemudian ditaruh pada cawan petri untuk dikeringkan dalam oven. Selanjutnya sebanyak 1 mg sampel digerus dengan 100 mg KBr (Kalium Bromida) secara homogen, kemudian diukur serapan infra merah pada bilangan gelombang 4000-450 cm^{-1} dan dianalisa dengan bilangan gelombang, diukur untuk menentukan gugus fungsi.

Analisis Kuantitatif Menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Analisis GC-MS ekstrak etil asetat kental dilakukan dengan menggunakan Operating GC-MS Ultra QP 2010 Shimadzu. Seratus mikroliter ekstrak etil asetat kental disuntikkan ke dalam kolom kromatografi. Suhu injektor 250°C dengan mode Splitless, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 14 mL/min dan rasio 1:10. Suhu sumber ion dan *interface* 200°C dan 280°C, waktu *solvent cut* 3 menit, 400-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m dengan diameter dalam 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 menit dan suhu dinaikkan hingga 200°C dengan laju 100 °C/min dan suhu akhir 280°C dengan waktu tahan 9 menit dengan laju 50 °C/min sehingga total waktu analisa 36 menit. Data kromatogram yang diperoleh dibaca dengan menggunakan *library* NIST 17 dan Wiley 9 (Sivarajan et al., 2019).

2.3.10 Uji *In Silico* dengan Molecular Docking

Preparasi Reseptor dan Ligan. Enzim dari bakteri uji berperan sebagai protein atau reseptor yaitu enzim PBP dari *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Dimana, dari PBP ini sangat penting bagi integritas dinding sel bakteri dan menjadi target utama bagi antibiotik. Adapun untuk protein enzim PBP dari *Staphylococcus aureus* (kode PDB ID 8VBV) dengan ligand native (63U: inhibitor asli dari protein) sementara protein enzim PBP dari *Escherichia coli* (kode PDB ID 3B8H) dengan ligand native (NAD: inhibitor asli dari protein). Dimana, ligan native ini adalah sebagai ligan pembanding/kontrol. Adapun ligan yang diujikan berupa senyawa dari fraksi etil asetat bakteri serta kontrol berupa ciprofloxacin. Langkah awal dengan mengakses struktur protein enzim bakteri uji pada RCSB PDB dan unduh struktur 3 dimensinya dalam format pdb. Reseptor dipisahkan dari molekul air di Pymol dan juga dipisahkan ligan yang menempel pada program UCSF Chimera, kemudian disimpan dalam format pdb. Tambahkan hidrogen pada struktur protein dan disimpan. Selanjutnya akses Pubchem dan unduh struktur 3 dimensi dari senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba dan ciprofloxacin lalu disimpan dalam format sdf. Kemudian buka struktur senyawa yang telah diunduh pada MarvinSketch lalu tambahkan explicit hydrogen agar struktur lebih stabil saat dikonformasi. Lalu pilih konformasi dengan energi terendah dan simpan dalam format pdb.

Proses Docking dan Visualisasi Hasil Molecular Docking. Penentuan titik koordinat pada grid box didapatkan dari koordinat native ligand dari file reseptor. Proses docking antara ligan uji, ligan native (ligan kontrol) dan reseptor dilakukan menggunakan software *PyRx Virtual Screening Tool*. Kemudian visualisasi hasil *molecular docking* dilakukan menggunakan software *Biovia Discovery Studio Visualizer* untuk melihat ikatan residu asam amino dan jenis interaksi antara protein reseptor dengan ligan (Tilaqza et al., 2023).

2.3.11 Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Antimikroba Analisis Sekuensing Berbasis Gen 16S rRNA

Ekstraksi DNA. Proses ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol yang tercantum dalam Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Langkah pertama adalah persiapan sampel. Untuk bakteri Gram positif, sebanyak 1×10^9 sel dipindahkan ke dalam tabung mikrosentrifugasi 1,5 ml, lalu disentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 13.900 rpm, dan supernatan dibuang. Selanjutnya, tambahkan 200 µl buffer GA (buffer untuk bakteri Gram positif) ke dalam tabung sentrifuge 15 ml dan masukkan 200 µl lysozyme ke dalam sampel, kemudian vortex hingga lysozyme larut sepenuhnya. Inkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit, dengan pembalikan setiap 10 menit. Setelah itu, tambahkan 20 µl proteinase K dan vortex hingga larut sepenuhnya. Kemudian, tambahkan 200 µl buffer GB ke dalam sampel dan homogenkan dengan vortex. Inkubasi pada suhu 70°C selama 10 menit untuk mencapai hasil homogen, dengan pembalikan setiap 3 menit. Terakhir, tambahkan 200 µl etanol (96%-100%) dan vortex selama 15 detik hingga tercampur merata.

Campuran yang telah disiapkan dipindahkan ke dalam *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik. Buang seluruh cairan dan tempatkan *spin column* ke dalam tabung pengumpul. Tambahkan 500 µl buffer GD ke dalam *spin column* CB3, lalu disentrifugasi lagi pada kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, setelah itu buang cairan yang ada dan pindahkan *spin column* CB3 ke dalam tabung pengumpul. Selanjutnya, tambahkan 600 µl buffer PW ke *spin column* CB3 dan disentrifugasi pada 12.000 rpm selama 30 detik, buang cairan dan pindahkan *spin column* CB3 ke tabung pengumpul. Ulangi prosedur ini, kemudian disentrifugasi kembali pada kecepatan 12.000 rpm selama 2 menit untuk mengeringkan membran sepenuhnya. Pindahkan *spin column* CB3 ke tabung *microtube* 1,5 ml baru, pipet 50-200 µl buffer TE, lalu inkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 2-5 menit dan disentrifugasi selama 2 menit pada 12.000 rpm. Supernatan yang terkumpul di tabung *microtube* merupakan ekstrak DNA.

Amplifikasi DNA dengan Metode PCR. Prosedur ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diekstraksi. Campuran reaksi PCR disiapkan dengan menambahkan 8 µl 1xMytaq HS Red Mix, 1 µl primer *Forward* 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1 µl primer *Reverse* 1387R (5'-GGGGGGTGTGTACAAGGC-3'), serta 2 µl ddH₂O. Kemudian, 12 µl campuran reaksi PCR dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3 µl ekstrak DNA. Campuran ini dihomogenkan menggunakan vortex dan dipindahkan ke mesin

PCR. Proses amplifikasi dilakukan dalam 35 siklus, yang mencakup pre-denaturasi pada suhu 95°C selama 5 menit, denaturasi pada suhu 95°C selama 1 menit, *annealing* pada suhu 55°C selama 45 detik, *extending* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *post-extending* pada suhu 72°C selama 10 menit.

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

Sekuensing DNA. Produk PCR dari sampel yang menunjukkan hasil positif pada elektroforesis kemudian dianalisis dengan sekuensing DNA.

Analisis Urutan DNA. Analisis hasil sekuensing dilakukan dengan menggunakan BLAST (*Basic Alignment Search Tools*) urutan nukleotida dari hasil sekuensing dengan database yang tersedia pada situs NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) yang digunakan untuk mencari homologi sekuens nukleotida dengan sekuens database.

2.4 Analisis Data

Analisis data secara kuantitatif dengan mengukur diameter zona hambatan isolat bakteri terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Kemudian dianalisis kuantitatif senyawa bakteri menggunakan GC-MS. Sementara itu, data pada uji kualitatif ekstrak senyawa isolat bakteri dengan FTIR. Selanjutnya dianalisis kuantitatif dan kualitatif dengan uji *in silico* dan sekuensing berbasis Gen 16S rRNA.

