

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki kawasan karst yang luas, mencakup 15,4 juta hektar dari pulau Sumatra hingga pulau Papua. Karst merupakan ekosistem dengan berbagai gua dengan penampakan yang unik. Kawasan ini meliputi dataran tinggi, medan yang berbukit-bukit, lembah dalam, dan menara batuan karbonat. Kawasan ini terbentuk atas batuan kapur dan terbentuk karena pengaruh erosi dan pelarutan (Sulistiyowati et al., 2021). Ekosistem karst umum ditemukan di daerah lembap dengan batuan karbonat, Namun juga dapat ditemukan di daerah yang beriklim sub tropis, tropis, pegunungan, dan kutub (Zerga, 2024).

Salah satu kawasan karst yang terdapat di Indonesia yaitu kawasan karst Maros-Pangkep yang terletak di pulau Sulawesi, provinsi Sulawesi Selatan. Kawasan Karst Maros-Pangkep termasuk kawasan karst yang terkenal dan terbesar di Indonesia. Memiliki keunikan tersendiri karena kombinasi antara tempat wisata alam, tempat tinggal, dan lahan pertanian yang masih alami. Karst Maros-Pangkep yang membentang dari Kabupaten Maros menuju Pangkep dengan luas keseluruhan kawasan mencapai 43.750 hektar. Kawasan karst ini merupakan yang kedua tersebar di dunia setelah kawasan karst di Guangzhou, Cina. kawasan karst Maros-Pangkep memiliki julukan *tower karst*, dikarenakan memiliki ciri khas yaitu bentuknya yang menyerupai menara (Karongi et al., 2023). Kawasan karst Maros-Pangkep terkenal dengan warisan budayanya dan juga merupakan bagian dari jejak peradaban manusia prasejarah sehingga ditetapkan kedalam bagian dari UNESCO *Global Geopark*. Pada daerah karst Maros-Pangkep, ada kurang lebih 135 gua, 78 diantara gua tersebut menyimpan sisa-sisa peninggalan dengan berbagai macam lukisan purba, termasuk adanya lukisan kuno yang tertua di dunia yang diperkirakan berusia sekitar 40.000 tahun (Haedar et al., 2024).

Kawasan karst inilah terbentuk distribusi bebatuan yang merupakan hasil dari kehidupan zaman purba yang tidak teratur berupa tebing-tebing yang menjulang dengan berbagai vegetasi yang hidup di atasnya sehingga menciptakan *biodiversity* yang khas (Wulandari et al., 2023). Ekosistem karst menyediakan berbagai sumber daya meliputi air, tanah dan vegetasi untuk menunjang kehidupan berbagai organisme. Hal ini juga menyebabkan kondisi pada ekosistem karst menjadi lembap sehingga mendukung pertumbuhan berbagai mikroorganisme (Chen et al., 2024).

Kelembapan yang tinggi, penyinaran yang kurang serta suhu lingkungan yang fluktuatif pada gua karst menjadikan mikroorganisme terutama jamur mengalami berbagai tekanan seleksi ekologis, sehingga membuat mikroorganisme terkhusus jamur menghasilkan beragam mekanisme adaptasi (Jurado et al., 2024). Pada ekosistem karst, jamur menghasilkan metabolit sekunder khusus sebagai adaptasi terhadap lingkungan ekstrim dan minim nutrisi. Senyawa ini memberikan keunggulan kompetitif dalam kondisi yang ekstrim, sehingga dapat bertindak sebagai mekanisme pertahanan diri dan juga dapat bertindak sebagai agen antimikroba (Wei et al., 2025).

Senyawa antimikroba adalah zat yang berasal dari bahan alami maupun dari bahan sintesis yang memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan ataupun membunuh mikroorganisme, seperti bakteri. Senyawa antimikroba bekerja dengan mengganggu struktur sel bakteri seperti dinding atau membran sel, serta fungsi vital bakteri seperti jalur metabolisme (Silletta et al., 2024). Golongan senyawa antimikroba yang diketahui yaitu antibakteri. Antibakteri merupakan senyawa kimia yang dihasilkan oleh mikroorganisme yang dapat menghambat perkembangan ataupun membunuh bakteri yang bersifat patogen (Gajic et al., 2025). Antibakteri berasal dari metabolit sekunder, yang merupakan zat alami yang dihasilkan mikroorganisme, berfungsi dalam adaptasi dan mekanisme perlindungan diri. Dalam sejarah penemuan antibakteri, jamur merupakan sumber utama antibakteri yang paling penting. Salah satu antibakteri yang dihasilkan oleh jamur yaitu penisilin yang berasal dari jamur *Penicillium rubens* (Zhgun, 2023). Selain itu terdapat pula antibakteri Fumagillin yang dihasilkan oleh *Aspergillus fumigatus* sebagai agen antibakteri pada bakteri gram positif dan negatif (Fakih & Almaqtri, 2019).

Saat ini berbagai penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri dapat diatasi dengan penggunaan antibakteri atau antibiotik. Namun penggunaan antibiotik sintetik secara berlebihan dan kurang tepat dapat mengakibatkan bakteri resisten terhadap antibiotik, sehingga pengobatan menjadi tidak efektif. Pada saat ini terdapat sebanyak 700.000 lebih orang di seluruh dunia meninggal setiap tahunnya yang diakibatkan oleh *antibiotic resistant bacterial* (ARB). Menurut data dari *World Health Organization* (WHO) memperkirakan angka ini akan terus meningkat menjadi 10 juta pada tahun 2050, yang mengakibatkan sebagai salah satu dari sepuluh ancaman teratas terhadap masalah global yang kritis bagi kesehatan manusia (Mancuso et al., 2021). Berdasarkan hal tersebut dibutuhkan pengobatan alternatif terbaru sebagai sumber antibiotik, salah satunya adalah dengan melakukan penelusuran jamur sebagai sumber senyawa antibiotik. Secara historis, kelompok jamur diketahui sebagai produsen utama antibiotik, sehingga jamur menjadi sampel dalam penelitian untuk mendapatkan senyawa yang berpotensi sebagai antibiotik. Jamur memproduksi berbagai metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibiotik dan dapat diuji aktivitas antimikrobanya (Correia et al., 2023).

Literatur sebelumnya telah meneliti Actinomycetes asal gua kawasan karst Maros-Pangkep sebagai antijamur oleh Rante et al., (2024). Namun perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai jamur asal gua kawasan karst Maros-Pangkep sebagai antibakteri. Oleh karena itu, diperlukan eksplorasi lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa alami dari jamur yang berpotensi sebagai antibakteri untuk dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif terhadap berbagai penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen. Maka dari itu, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri metabolit sekunder jamur dari tanah kawasan karst Maros-Pangkep secara *in vitro* untuk mengetahui efektivitas senyawa terhadap bakteri patogen, dan *in silico* menggunakan perangkat lunak untuk memprediksi interaksi senyawa dengan target reseptor pada tingkat molekuler, serta *Scanning Electron Microscope* (SEM) untuk melihat kerusakan permukaan dan ultrastruktur dinding sel pada bakteri target terhadap senyawa antibakteri dari jamur.

1.2 Tujuan Penelitian

1. Mengisolasi jamur dari tanah kawasan karst Maros-Pangkep serta menganalisis potensi metabolit sekunder yang dihasilkan sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
2. Menganalisis efektivitas antibakteri dari senyawa yang dihasilkan isolat jamur asal tanah Kawasan Karst Maros-Pangkep terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara *in silico*.
3. Mengetahui kerusakan permukaan dinding sel bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* oleh senyawa antibakteri yang dihasilkan isolat jamur dengan analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM)

1.3 Manfaat Penelitian

1. Bagi peneliti, sebagai sumber pengetahuan ilmiah terkait keberadaan Jamur hasil isolasi dari berbagai gua di kawasan karst Maros-Pangkep yang dapat memproduksi senyawa antibakteri terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Bagi masyarakat umum, penelitian ini dapat bermanfaat dalam pengembangan antibiotik asal jamur di kawasan karst Maros-Pangkep sebagai pengobatan alternatif dalam mengatasi penyakit infeksi oleh bakteri patogen, seperti *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Juli-Desember 2025. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar Gua Kawasan Karst Maros-Pangkep. Isolasi, seleksi dan ekstraksi jamur, serta uji aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Analisis GC-MS dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Ujung Pandang (PNUP) dan analisis SEM dilakukan di Laboratorium Mikrostruktur Fakultas Teknik Universitas Muslim Indonesia.

2.2 Alat dan Bahan

2.2.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu alat gelas (gelas ukur, gelas kimia, tabung reaksi, erlenmeyer, cawan petri, corong pisah, batang pengaduk, corong kaca, cuvet, kaca preparat), alat non gelas (wadah plastik, sendok plastik, *cotton swab*, bor gabus, pencadangan, rak tabung, tabung sentrifuge, pinset, ose lurus, ose bulat, gegep, saringan, *mortar* dan *alu*, spatula, botol semprot, *blue tip*, mikropipet, bunsen), alat instrumen (inkubator, *hot plate*, oven, *rotary evaporator*, *shaker rotator*, *refrigerator*, *gass chromatography mass spectrometry* (GC-MS), sentrifuge, vortex, spektrofotometer, mikroskop binokuler) dan alat non instrumen (enkas, timbangan digital, dan autoklaf). Alat yang digunakan pada uji *in silico* yaitu laptop, perangkat lunak diantaranya PyMol, Chimera, Mega 12, *Discovery Studio Visualizer*, *National Center for Biotechnology Information*, Uniprot, website *Protein Data Bank* (PDB), PyRx, *Swiss Target Prediction* dan PubChem. Adapun analisis SEM alatnya yaitu JCM-5000 NeoScope JEOL, pistol elektron, *stage blok*, *stage holder*, sistem vakum, *smart coater*, dan *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*.

2.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat jamur asal tanah dari sekitar Kawasan Karst Maros-Pangkep, isolat bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Media *Potato Dextrose Agar* (PDA), media *Potato Dextrose Broth* (PDB), media Nutrient Agar (NA), media Nutrient Broth (NB), *Lactophenol Cotton Blue*, *Ciprofloxacin*, kapas, karbon tip, kain kasa, *aluminium foil*, tisu, *Cling wrap*, *aquades* dan alkohol 70%.

2.3 Metode Kerja

2.3.1 Pengambilan Sampel

Sampel tanah diambil pada gua kawasan karst Maros-Pangkep, diantaranya yaitu gua Leang Karampuang, Leang Lompoa, dan Leang Saluka. Pada setiap gua diambil masing-masing 2 titik tempat, sehingga didapatkan keseluruhan 6 titik tempat pengambilan sampel tanah dari ketiga lokasi. Pengambilan sampel yaitu pada area yang berdekatan dengan dinding gua dengan kondisi tanah yang lembap.

Proses *sampling* diawali dengan mengambil tanah menggunakan sendok plastik steril, kemudian dimasukkan ke dalam wadah plastik steril, lalu wadah plastik tersebut dimasukkan dalam *cool box*. Kemudian, di bawa ke laboratorium Mikrobiologi untuk dilakukan isolasi dan identifikasi lebih lanjut.

2.3.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Peralatan kaca seperti cawan petri, tabung reaksi, erlenmeyer dan gelas kimia, disterilkan dengan metode panas kering dalam oven pada suhu 180°C selama 2 jam, adapun jarum ose, spatula, dan pinset disterilkan menggunakan api bunsen hingga panas membara. Sementara peralatan yang tidak tahan panas, media pertumbuhan dan *aquades* disterilkan dengan metode panas basah dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

2.3.3 Pembuatan Media

Media Nutrient Agar (NA). Ditimbang sebanyak 2,8 gram media NA, kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL *aquades* di dalam erlenmeyer. Media selanjutnya dipanaskan dan dihomogenkan pada *hot plate* dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kain kasa dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Media Nutrient Broth (NB). Ditimbang sebang 8 gram media NB, kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL *aquades* di dalam erlenmeyer. Kemudian ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kain kasa dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Media Potato Dextrose Agar (PDA). Ditimbang sebanyak 3,9 gram media PDA kemudian dilarutkan ke dalam 100 mL *aquades* di dalam erlenmeyer. Media selanjutnya dipanaskan dan dihomogenkan pada *hot plate* dengan bantuan *magnetic stirrer* hingga homogen. Kemudian ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kain kasa dan kapas dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

Media Potato Dextrose Broth (PDB). Ditimbang sebanyak 2,64 gram media PDB kemudian ditambah 100 mL *aquades* di dalam erlenmeyer dan dihomogenkan menggunakan batang pengaduk. Kemudian ditutup mulut erlenmeyer menggunakan kain kasa dan kapas dan disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm.

2.3.4 Isolasi Jamur dari Tanah Gua Kawasan Karst Maros-Pangkep

Sampel tanah dibuat kedalam pengenceran bertingkat hingga 10^{-2} , lalu ditumbuhkan pada media PDA. Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 34°C di inkubator (Zhang et al., 2025). Setelah itu diamati jenis jamur yang tumbuh.

2.3.5 Pemurnian Jamur dari Tanah Gua Kawasan Karst Maros-Pangkep

Dipilih beberapa isolat jamur dari hasil isolasi, lalu ditumbuhkan kembali pada media PDA. Selanjutnya diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 34°C di inkubator. Setelah itu diamati bentuk pertumbuhan jamur tersebut.

2.3.6 Karakterisasi Jamur dari Tanah Gua Kawasan Karst Maros-Pangkep

Karakterisasi Makroskopis. Dilakukan karakterisasi makroskopis pada isolat jamur yang ditumbuhkan pada media PDA setelah inkubasi 3x24 jam pada suhu 34°C di inkubator. Selanjutnya diamati karakteristik makroskopis jamur yaitu warna koloni, permukaan koloni, garis radial maupun lingkaran konsentris dan warna media. Kemudian data karakterisasi makroskopis ditabulasi.

Karakterisasi Mikroskopis. Digunakan metode *slide culture*. Dibuat *slide culture* dengan menyiapkan cawan petri yang telah diberi tisu pada bagian dalamnya, kemudian diberi penyangga berupa batang v untuk kaca preparat dan dipotong kotak media PDA, lalu diletakkan diatas kaca preparat, setelah itu diambil isolat jamur menggunakan ose bulat kemudian ditusuk pada potongan media PDA tersebut, lalu ditutup dengan *objek glas*. Kemudian ditetaskan *aquades* steril pada tisu didalam cawan petri. Selanjutnya diinkubasi selama 2x24 jam. Setelah itu, *objek glas* dipindahkan ke kaca preparat yang baru, lalu ditetesi *lactophenol cotton blue*. Kemudian preparat tersebut diamati dibawah mikroskop binokuler dengan perbesaran 400x untuk melihat morfologi sel jamur (Hakim et al., 2020).

2.3.7 Seleksi Isolat Jamur Penghasil Senyawa Antibakteri

Peremajaan Bakteri Uji. Digunakan bakteri uji untuk bakteri gram positif yaitu *Staphylococcus aureus* dan gram negatif yaitu *Escherichia coli*. Diambil isolat murni kedua bakteri uji sebanyak satu ose, lalu diinokulasikan pada media *Nutrient Agar* miring dengan metode gores sinambung dan diinkubasi pada Inkubator dengan suhu 37°C selama 1x24 jam.

Pembuatan Suspensi Bakteri Uji. Disuspensikan bakteri uji berumur 24 jam dari agar miring menggunakan *aquades* steril. Kemudian di vortex suspensi kedua bakteri uji hingga terjadi kekeruhan. Suspensi ini kemudian dimasukkan kedalam 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.

Tahap seleksi jamur. Dimasukkan sebanyak 1 mL suspensi bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* pada masing-masing 100 mL media *Nutrient Agar* di erlenmeyer. Selanjutnya, dituang media pada cawan petri dan ditunggu hingga memadat, lalu diberi penanda. Dilakukan pengujian dengan metode uji kontak langsung, media PDA yang ditumbuhi isolat jamur di potong menggunakan bor gabus, selanjutnya ditempelkan potongan tersebut pada media *Nutrient Agar* untuk melihat kemampuan isolat jamur murni dalam menghambat pertumbuhan bakteri uji. Diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, diamati dan diukur zona bening yang terbentuk pada area isolat jamur murni.

2.3.8 Pengujian Aktivitas Antibakteri

Tahap Kultur Isolat Jamur. Dipotong Isolat jamur pada media PDA dan diinokulasikan ke dalam 50 mL media Media *Potato Dextrose Broth* (PDB) di erlenmeyer dan dilakukan inkubasi pada *shaker rotator* di suhu ruang pada kecepatan 120 rpm selama 5x24 jam. Setelah itu, diambil kultur jamur dan disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 10 menit, sehingga menghasilkan *supernatan* (metabolit sekunder) yang akan diuji aktivitas antibakteri.

Pembuatan Larutan Kontrol Positif. Disiapkan larutan kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin dengan konsentrasi 30 ppm. Dilarutkan 0,003 gram antibiotik tersebut dalam 100 mL *aquades* steril.

Tahap Pengujian Aktivitas Antibakteri. Pada pengujian aktivitas antibakteri secara *in vitro* dilakukan dengan metode *agar well diffusion* terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Hossain et al., 2022). Dituangkan masing-masing suspensi bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebanyak 0,1 mL secara aseptis ke dalam masing-masing erlenmeyer yang berisi 100 mL media Nutrient Agar, lalu dihomogenkan sehingga bakteri uji dan media tercampur dengan merata. yang telah dicampurkan dengan suspensi bakteri uji Dituangkan media. Selanjutnya dituang sedikit media Nutrient Agar ke dalam cawan petri untuk membuat lapisan tipis, setelah memadat ditempelkan beberapa pencadangan diatasnya secara aseptis, kemudian dituang kembali media Nutrient Agar hingga mendekati ujung pencadangan, lalu ditunggu hingga media memadat dan pencadangan dicabut secara perlahan. Selanjutnya dituang sebanyak 1 mL berbagai metabolit sekunder isolat jamur serta larutan kontrol positif pada setiap sumuran yang tercipta. Kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C di inkubator untuk mengetahui aktivitas antibakteri berdasarkan ukuran diameter zona bening yang terbentuk. Diukur diameter zona bening menggunakan jangka sorong.

2.3.9 Uji Senyawa Bioaktif Isolat Jamur menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Ekstraksi dan Partisi. Dalam mengidentifikasi jenis senyawa antibakteri dari isolat jamur yang memiliki aktivitas antibakteri, dilakukan uji *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). Dikultur isolat jamur pada media *Potato Dextrose Broth* (PDB) dan dilakukan inkubasi pada *shaker rotator* di suhu ruang pada kecepatan 120 rpm selama 5x24 jam. Kemudian kultur jamur disaring untuk memisahkan filtrat dan miselium dari media untuk selanjutnya dihomogenkan dengan etil asetat dengan rasio 1:1 (masing-masing sebanyak 250 mL). Selanjutnya diuapkan ekstrak etil asetat menggunakan evaporator pada suhu 60°C guna mendapatkan fraksi ekstrak etil asetat kental.

Analisis komponen senyawa menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Analisis komponen senyawa dari filtrat fermentasi isolat jamur dilakukan dengan GC-MS. Dimasukkan sampel sebanyak 0,1 gram ke dalam gelas kimia 100 mL dan ditambahkan 5 mL metanol, lalu ditutup dengan *aluminium foil*. Hasil campuran diekstraksi menggunakan sonikator pada suhu 70°C selama 20 menit lalu saring dengan menggunakan *syringe filter* dan masukkan ke dalam

vial. Uji kromatografi menggunakan instrumen GC-MS Ultra QP 2010 Shimadzu. Kondisi instrumen dioperasikan pada suhu injektor 250°C dengan mode *splitless*, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 1.4 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 70°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 30 menit. Data kromatogram yang didapatkan diinterpretasi dengan menggunakan *library* NIST 20 (Rafiq et al., 2024).

2.3.10 Pendekatan *In Silico* dengan metode *Molecular Docking*

Preparasi Protein Target. Adapun protein target yang digunakan dalam menganalisis potensi antibakteri metabolit jamur untuk *Escherichia coli* yaitu *penicillin-binding protein 2* (PBP2) PDB ID: 6G9F, sedangkan untuk *Staphylococcus aureus* yaitu *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a) PDB ID: 3ZG0. Kemudian struktur 3D reseptor diunduh pada RCSB *Protein Data Bank* (PDB), lalu dioptimasi dengan menghilangkan molekul air dan kofaktor lain dengan perangkat lunak Chimera, selanjutnya struktur 3D disimpan dalam format PDB.

Preparasi Ligan. Hasil dari ekstraksi metabolit sekunder isolat jamur yang didapatkan, selanjutnya dianalisis potensi antibakterinya dengan website *Swiss Prediction Target* dan Pubchem. Setelah senyawa yang ingin dijadikan ligan dipilih, lalu diunduh struktur 3D senyawa pada database PubChem. Selanjutnya dioptimasi seluruh ligan dengan cara yang sama pada preparasi protein target.

Proses Docking dan Visualisasi Hasil *Molecular Docking*. Proses penambatan molekul dan visualisasi hasilnya dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak AutoDock4, dan didukung oleh AutoDockTools. Penambatan dimulai dengan senyawa ciprofloxacin menggunakan metode *blind docking* untuk mengidentifikasi koordinat sisi aktif enzim. Validasi hasil *blind docking* dilakukan dengan membandingkannya terhadap referensi. Koordinat pada *grid box* ditentukan berdasarkan koordinat ligan native dari file reseptor. Penambatan antara ligan uji, ligan native (sebagai kontrol), dan reseptor dilakukan menggunakan perangkat lunak PyRx 0.8 untuk menguji interaksi antara senyawa dari metabolit sekunder jamur dengan protein target. Setelah mendapatkan konformasi terbaik pada sisi aktif enzim, *Molecular Docking* dilakukan pada koordinat tersebut untuk semua ligan. *Grid box* yang digunakan berukuran 40 x 40 x 40 Å. *Molecular Docking* diatur guna menghasilkan 10 konfirmasi menggunakan algoritma *Lamarckian Genetic Algorithm*, kemudian divisualisasikan dengan *Discovery Studio Visualizer*.

2.3.11 Analisis *Scanning Electron Microscope* (SEM)

Preparasi Bakteri Uji dan Isolat Jamur. Kultur bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* yang berumur 24 jam diambil sebanyak 2 mL ke tabung sentrifuge dan disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm, setelah itu dibuang supernatan, sehingga menyisahkan pelet sel. Kemudian supernatan

isolat jamur yang telah diperoleh ditambahkan masing-masing 2 mL pada kedua pelet sel bakteri uji, sehingga didapatkan perbandingan 1:1. Setelah itu, kedua tabung sentrifuge divortex untuk menghomogenkan kedua perlakuan. Selain itu diambil kembali masing-masing 2 mL bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* sebagai kontrol. Keempat perlakuan selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 1x24 jam (Herman et al., 2024).

Proses Coating. Diambil sampel menggunakan spatula, lalu diletakkan diatas permukaan *stage blok* yang telah ditempel dengan karbon tip. Dikeringkan terlebih dahulu sampel pada suhu ruang. Kemudian dilakukan *coating* dengan alat *smart coater*. Selanjutnya dimasukkan kedalam *stage holder* dan dikunci pada setiap ujung sisinya menggunakan kunci L. Setelah itu, alat SEM dinyalakan selama 3 menit hingga proses vacuumnya selesai, lalu ditekan tombol *chamber open button* untuk membuka *chamber* alat SEM. Kemudian *stage holder* yang berisi sampel dimasukkan kedalam *chamber* lalu ditutup kembali dan dilakukan analisis dengan alat SEM JCM-5000 NeoScope JEOL (Salah et al., 2024).

2.3.12 Analisis Data

Uji aktivitas antibakteri dianalisis secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat isolat jamur terhadap bakteri uji *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian dilakukan analisis secara kualitatif menggunakan *Scanning Electron Microscope* (SEM) guna melihat kerusakan dinding sel bakteri uji terhadap senyawa alami metabolit sekunder jamur, data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar. Selanjutnya dilakukan analisis kuantitatif dan kualitatif senyawa yang dihasilkan oleh isolat jamur menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dan data hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel dan gambar. Kemudian hasil yang diperoleh dianalisis kuantitatif dan kualitatif dengan uji *in silico* untuk melihat efektivitas antimikroba pada tingkat molekuler, data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel dan gambar.