

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kawasan karst merupakan kawasan yang tersusun atas batuan karbonat CaCO_3 (kalsium karbonat) atau MgCO_3 (magnesium karbonat) (atau campuran keduanya) yang telah mengalami pelarutan oleh CO_2 (karbon dioksida) yang berada di atmosfer melalui air hujan atau CO_2 yang berasal dari sisa-sisa tanaman (Shiska et al., 2017). Indonesia merupakan salah satu negara dengan bentang alam karst yang cukup luas, yakni sekitar 20% dari total luas wilayahnya (Asghaf et al., 2019). Sulawesi Selatan merupakan salah satu provinsi dengan fenomena eksokarst dan endokarst yang menakjubkan dan dianggap paling lengkap di Indonesia. Gugusan bukit batu gamping tersebut membentang mulai dari bagian tengah Kabupaten Maros hingga bagian utara Kabupaten Pangkep, kawasan tersebut kemudian dikenal dengan nama Kawasan Karst Maros-Pangkep. Sebaran perbukitan batuan tersebut menempati wilayah ± 42.000 hektare dengan posisi geografis yang berada antara $119^\circ 34' 17'' - 119^\circ 55' 13''$ BT dan antara $4^\circ 42' 49'' - 5^\circ 06' 42''$ LS (Nuhung, 2016). Kawasan karst Maros-Pangkep memiliki eksokarst dengan tipe batuan menyerupai menara yang menjulang tinggi atau dikenal juga dengan istilah *tower karst*. Selain tersusun atas formasi batuan eksokarst yang menyerupai menara, kawasan karst Maros-Pangkep juga memiliki endokarst berupa gua-gua yang jumlahnya mencapai ratusan (Sambolangi et al., 2021). Kawasan karst Maros-Pangkep diperkirakan memiliki sekitar 257 gua yang telah teridentifikasi, 216 di antaranya merupakan gua alam dan 41 lainnya merupakan gua prasejarah (Magetanapu et al., 2023).

Gua karst memiliki kondisi lingkungan yang relatif tertutup dan ekstrem. Selain itu, gua karst dicirikan dengan kondisi minim cahaya, kelembapan tinggi, suhu yang relatif stabil dan kondisi oligotrofik. Meskipun memiliki kondisi lingkungan yang ekstrem, gua karst menyimpan keanekaragaman mikrobioma yang kaya dan kompleks. Mikrobioma gua memegang peran penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem gua serta proses siklus biogeokimia berbagai unsur. Misalnya, bakteri *Acidithiobacillus thiooxidans* yang berperan dalam siklus sulfur (Zhu et al., 2021). Selain itu, beberapa spesies jamur seperti *Neurospora crassa*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spinulosum*, *Verticillium psalliotae*, dan *Porta plasenta* berperan dalam biomineralisasi tembaga dan uranium (Bohu et al., 2022).

Saat ini, selain maraknya kajian terkait potensi mikrobioma karst dalam siklus biogeokimia, kajian terkait potensi mikrobioma karst dalam eksplorasi dan baru juga banyak dikaji. Kondisi lingkungan gua karst yang unik peneliti untuk mengkaji potensi mikroorganisme dalam wa obat-obatan baru. Pada kondisi lingkungan oligotrofik, in bersaing satu sama lain dan menyebabkan mereka atu mekanisme untuk bertahan hidup, seperti sekresi senyawa ntibiotik/antimikroba, pigmen, dan siderofor) (Zada et al., 2022).



Metabolit sekunder tersebut memberikan perlindungan bagi bakteri terhadap suhu yang ekstrem, kekeringan, dan ancaman dari bakteri lainnya. Pigmen merupakan salah satu dari sekian banyak metabolit sekunder yang dihasilkan oleh bakteri. Produksi pigmen oleh bakteri dipengaruhi oleh lingkungan dan dipicu oleh mekanisme *quorum sense* yang bertujuan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme lain di sekitarnya. Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pigmen yang dihasilkan bakteri bersifat terapeutik yaitu bersifat antimikroba, sitotoksik, antikanker, dan antioksidan (Patkar et al., 2021).

Beberapa jenis pigmen telah diketahui memiliki aktivitas antimikroba dan antioksidan yang baik, misalnya prodigiosin. Prodigiosin merupakan pigmen yang dihasilkan oleh bakteri *Serratia marcescens* dan diketahui memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri gram positif, seperti *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* (Devi et al., 2024). Selain itu, prodigiosin juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri gram negatif, di antaranya *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, dan *Erwinia carotovora* (Danevčič et al., 2016). Selain prodigiosin, pigmen karotenoid juga diketahui memiliki potensi aktivitas antimikroba dan antioksidan (Sereti et al., 2024). Fukosantin merupakan salah satu turunan karotenoid dan diketahui mampu menghambat pertumbuhan baik bakteri gram positif maupun gram negatif, dan lebih efektif menghambat pertumbuhan bakteri gram positif (Karpiński & Adamczak, 2019). Selain memiliki aktivitas antimikroba yang baik, karotenoid juga sangat efisien dalam menghambat dan membersihkan radikal bebas seperti oksigen tunggal dan *reactive oxygen species* (ROS). Pembentukan dan peningkatan kadar ROS yang tidak terkendali dalam tubuh dapat menyebabkan stres oksidatif dan dapat menyebabkan ketidakseimbangan biokimia serta merusak berbagai makromolekul biologis seperti DNA, RNA, lipid, dan protein (Fiedor & Burda, 2014; Lu et al., 2021).

Zaman modern ini, strain bakteri resisten antibiotik mengalami lonjakan (*antibiotic resistant bacterial*/ARB). Antibiotik memegang peran penting dalam mengatasi infeksi bakteri. Antibiotik merupakan senyawa yang bekerja dengan menargetkan bakteri yang dimaksudkan untuk mencegah dan mengatasi infeksi bakteri. Melonjaknya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik menjadi sebuah tantangan baru dalam upaya melawan infeksi bakteri patogen. Resistensi antibiotik pada bakteri telah diakui oleh WHO sebagai masalah global yang kritis bagi kesehatan manusia dan lingkungan. Lonjakan tersebut diakibatkan oleh peredaran dan penggunaan antibiotik yang tidak bijaksana. Berdasarkan data WHO per 2019 terdapat 1,27 juta kasus kematian akibat resistensi antibiotik, angka tersebut diproyeksikan terus meningkat dan pada 2050 diperkirakan menyentuh angka 10 juta. Studi terbaru



saat ini lebih dari 70% bakteri patogen resisten terhadap antibiotik, lebih dari 2 juta kasus infeksi dan 23.000 kematian setiap tahunnya disebabkan oleh infeksi bakteri resisten (al., 2022). *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* dan *E. coli* merupakan salah satu strain *S. aureus* dan *E. coli* yang resisten terhadap antibiotik golongan β -laktam (penicillin, methicillin, oxacillin, dan

cephalosporin) dan merupakan jenis antibiotik yang paling banyak digunakan untuk mengatasi infeksi akibat bakteri patogen (Alghamdi et al., 2023; Kremer et al., 2022).

Selain bakteri resisten antibiotik, spesies oksigen reaktif (ROS) dan radikal bebas juga menjadi salah satu penyumbang kematian dengan angka yang cukup besar. Penumpukan ROS dan radikal bebas dalam tubuh dapat menyebabkan stres oksidatif yang berperan dalam memicu berbagai penyakit mematikan seperti kanker, penyakit kardiovaskular, gangguan ginjal dan neurologis, serta penyakit metabolisme. Berdasarkan data WHO, saat ini kasus kejadian kanker dunia menyentuh angka 19,9 juta dan menyebabkan 9,7 juta kematian (Yoshikawa & You, 2024). Stres oksidatif dan radikal bebas di dalam tubuh dapat diatasi dengan penggunaan antioksidan.

Berdasarkan hal di atas, diperlukan eksplorasi untuk memperoleh senyawa-senyawa alami yang memiliki potensi antimikroba untuk dijadikan alternatif pengobatan dalam melawan bakteri patogen dan memperoleh senyawa alami yang memiliki potensi antioksidan sebagai alternatif penggunaan senyawa sintetik yang dapat memberikan dampak negatif terhadap tubuh. Pigmen bakteri merupakan salah satu senyawa yang dapat dijadikan sebagai alternatif dalam mengatasi infeksi bakteri patogen dan sebagai antioksidan alami. Pemanfaatan pigmen bakteri dalam melawan bakteri patogen serta sebagai antioksidan membuka jalan baru bagi dunia medis serta dapat menjadi sumber obat alami baru, sebab pigmen yang dihasilkan oleh mikroorganisme tidak beracun dan ramah lingkungan. Oleh sebab itu, dilakukan penelitian ini untuk mengetahui potensi aktivitas antimikroba dan antioksidan pigmen bakteri, serta mengidentifikasi pigmen dan jenis bakteri penghasil pigmen yang berasal dari Kawasan Karst Maros-Pangkep.

1.2 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini yakni:

1. Mengisolasi bakteri penghasil pigmen asal Kawasan Karst Maros-Pangkep serta menganalisis potensi antimikroba dan antioksidan pigmen yang dihasilkan secara *in vitro*.
2. Menganalisis jenis dan efektivitas antimikroba serta antioksidan pigmen yang dihasilkan oleh bakteri penghasil pigmen asal Kawasan Karst Maros-Pangkep secara *in silico*.
3. Mengetahui jenis isolat bakteri penghasil pigmen asal Kawasan Karst Maros-Pangkep.

1.3 Manfaat Penelitian



Manfaat penelitian ini yakni diharapkan dapat memberikan informasi s antimikroba dan antioksidan dari pigmen yang dihasilkan oleh Karst Maros-Pangkep.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juli-Desember 2024. Pengambilan sampel dilakukan di sekitar lukisan gua Kawasan Karst Maros-Pangkep. Isolasi, karakterisasi, ekstraksi, dan analisis aktivitas antimikroba dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin. Analisis aktivitas antioksidan dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan, Universitas Hasanuddin. Analisis GCMS dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia, Politeknik Negeri Ujung Pandang.

2.2 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri, erlenmeyer, gelas kimia, gelas ukur, gelas arloji, tabung reaksi, labu ukur, batang pengaduk, pipet kapiler, *object glass*, *spin column*, ose bulat, ose lurus, bunsen, pipet tetes, spoit, sendok tanduk, spatula, penggaris, tabung sentrifus, penjepit tabung, rak tabung, labu semprot, pelat tetes, cetakan gel agarosa, *chamber*, *comb*, *cuvet*, *cool box*, *collection tube*, *cotton swab*, *micropipet*, *blue tip*, lemari pendingin, enkas, vortex, mikroskop, elektroforesis, UV-transilluminator, *gel documentation*, mesin PCR, shaker (Health), oven (Heraeus), spektrofotometer UV-Vis (Thermo), timbangan analitik (Ohaus), sentrifuge (Hettich), *gass chromatography mass spectrometry* (GC-MS) (Ultra QP 2010 Shimadzu), komputer, laminar air flow, autoklaf (American), perangkat lunak PyMol, PyRx, Chimera, *Discovery Studio Visualizer*, MEGA 12, website *Protein Data Bank* (PDB), *Swiss Target Prediction*, *National Center for Biotechnology Information*, PubChem, dan UniProt.

2.3 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sampel swab dari sekitar lukisan prasejarah Kawasan Karst Maros-Pangkep, medium Nutrient Agar (NA), medium Tryptone Soya Broth (TSB), medium Sulfid Indol Motility (SIM), medium Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP), medium Simmon's Citrate Agar (SCA), medium Urea Agar Base Christensen, *pepton water*, *crystal violet*, JKJ, alkohol-aseton, safranin, urea 40%, alkohol 70%, methanol, chloroform, etanol absolut, DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl), ciprofloxacin, primer forward (63F), primer reversal, amida, TE buffer, GD buffer, GA buffer, TAE buffer, PW buffer, me, NaCl fisiologis, *aquades*, *blank disc*, kapas, tisu, dan



2.4 Prosedur Kerja

2.4.1 Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel dilakukan di Leang Jarie, Leang Kassi, dan Leang Ulu Wae. Proses *sampling* dilakukan dengan menggunakan *cotton swab* di sekitar lukisan pada dinding gua, sampel kemudian dimasukkan dalam tabung yang berisi larutan *pepton water* dan dimasukkan dalam *cool box*. Sampel kemudian di bawa ke laboratorium untuk pengujian lebih lanjut.

2.4.2 Teknik Sterilisasi Alat dan Bahan

Teknik sterilisasi untuk alat-alat gelas seperti cawan petri, tabung reaksi dan *object glass*, yaitu dengan metode panas kering menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Kemudian untuk jarum ose disterilkan dengan metode panas kering menggunakan nyala api bunsen hingga panas membara. Adapun untuk medium pertumbuhan dan *aquades* disterilkan dengan metode panas basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm.

2.4.3 Pembuatan Medium

Medium Nutrient Agar (NA). Pembuatan medium NA dimulai dengan ditimbang sebanyak 2 gram medium NA dan dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Medium Tryptone Soya Broth (TSB). Pembuatan medium TSB dimulai dengan ditimbang sebanyak 3 gram medium TSB dan dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades* kemudian diaduk menggunakan batang pengaduk hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

Medium Sulfide Indole Motility (SIM). Pembuatan medium SIM dimulai dengan ditimbang sebanyak 3 gram medium SIM dan dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Kemudian, medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 4 ml dan kemudian ditutup dengan kapas. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah disterilisasi, medium diletakkan dalam kondisi tabung berdiri hingga memadat.

Medium Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP). Pembuatan medium MR-VP dimulai dengan ditimbang sebanyak 1,7 gram medium MR-VP dan dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml dan kemudian ditutup menggunakan kapas. Setelah disterilisasi, medium diletakkan dalam kondisi tabung berdiri hingga memadat. Kemudian medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm.



Medium Simmon's Citrate Agar (SCA). Pembuatan medium SCA dimulai dengan ditimbang sebanyak 2,42 gram medium SCA dan dilarutkan ke dalam 100 ml *aquades* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Kemudian, medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 7 ml dan ditutup dengan kapas. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Setelah disterilisasi, medium diletakkan dalam kondisi tabung dimiringkan hingga memadat.

Medium Urea Agar Base Christensen. Pembuatan medium urea agar base dimulai dengan ditimbang sebanyak 2,4 gram medium urea agar base dan dilarutkan ke dalam 95 ml *aquades* kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga homogen. Selanjutnya, medium disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Sebelum digunakan, medium didinginkan terlebih dahulu hingga mencapai suhu 40°C-50°C, kemudian medium ditambahkan larutan urea 40% sebanyak 5 ml lalu dihomogenkan.

2.4.4 Isolasi Bakteri Penghasil Pigmen

Sampel swab yang berasal dari dinding gua diisolasi dengan metode tuang, sampel diambil sebanyak 1 ml kemudian diinokulasikan pada medium NA. Selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C lalu diamati pertumbuhan koloni yang terbentuk. Koloni dengan penampakan morfologi yang berbeda dan menghasilkan pigmen selanjutnya dilakukan pemurnian pada medium NA hingga diperoleh isolat murni.

2.4.5 Karakterisasi Bakteri

Pengamatan Morfologi Koloni. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium NA dengan metode gores kuadran, kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C. Koloni yang terbentuk kemudian diamati bentuk, tepian, elevasi dan warnanya menggunakan mikroskop stereo.

Pengamatan Morfologi Sel. Pengamatan morfologi sel bakteri dilakukan dengan teknik pewarnaan gram. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diulas pada kaca preparat kemudian ditetesi *aquades* dan difiksasi. Setelah difiksasi, ulasan ditetesi larutan *crystal violet* 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan *aquades*. Selanjutnya ulasan ditetesi larutan JKJ sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 60 detik lalu dibilas menggunakan *aquades*. Kemudian, ulasan ditetesi larutan alkohol-aseton sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan *aquades*. Ulasan selanjutnya ditetesi safranin dan didiamkan selama 30 detik lalu dibilas menggunakan *aquades*. Ulasan selanjutnya ditetesi minyak imersi dan diamati di bawah mikroskop dengan



i biokimia dilakukan untuk melihat motilitas, produksi H₂S, methyl Red (MR), uji Voges Proskauer (VP), uji sitrat, uji urease

Uji Motilitas. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM tegak dengan bantuan ose lurus, kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

Uji H₂S. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM tegak dengan bantuan ose lurus, kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

Uji Indol. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan dengan cara ditusuk pada medium SIM tegak dengan bantuan ose lurus, kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, medium ditambahkan reagen Kovac's untuk mendeteksi adanya senyawa indol yang ditandai dengan terbentuknya cincin berwarna merah lembayung pada permukaan medium.

Uji Methyl Red (MR). Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium MR-VP kemudian diinkubasi selama 5x24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, medium ditambahkan reagen *methyl red* untuk mendeteksi adanya senyawa asam campuran yang ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada permukaan medium.

Uji Voges Proskauer (VP). Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium MR-VP kemudian diinkubasi selama 3x24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, medium ditambahkan 0,2 ml larutan KOH 40% dan 0,6 ml larutan α -naftol kemudian dikocok untuk mendeteksi adanya senyawa asetoin yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah lembayung.

Uji Sitrat. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium SCA kemudian diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37°C.

Uji Urease. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diinokulasikan pada medium urea base agar kemudian diinkubasi selama 2x24 jam pada suhu 37°C.

Uji Katalase. Sebanyak 1 ose isolat bakteri diulas pada kaca preparat kemudian ditambahkan 2-3 tetes reagen H₂O₂ untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim katalase yang ditandai dengan terbentuknya gelembung-gelembung gas akibat hidrolisis H₂O₂ oleh enzim katalase yang dihasilkan oleh bakteri.

2.4.6 Ekstraksi Pigmen

Ekstraksi pigmen dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Sel bakteri ditumbuhkan terlebih dahulu selama 2x24 jam pada 20 ml medium TSB. Selanjutnya sebanyak 1 ml kultur bakteri yang ditumbuhkan sebelumnya dipindahkan ke dalam 100 ml medium TSB dan diinkubasi pada suhu ruang selama 2x24 jam. Kultur kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 6.000 rpm selama 15 menit. Biomassa sel bakteri kemudian dikumpulkan dan diekstraksi menggunakan 5 ml methanol

gasi, supernatan yang diperoleh kemudian dikeringkan pada oven untuk mendapatkan ekstrak pigmen kering bebas



2.4.7 Pengujian Aktivitas Antibakteri secara *In Vitro*

Pengujian aktivitas antimikroba secara *in vitro* dilakukan dengan metode *agar disk diffusion* terhadap bakteri patogen *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Balouiri et al., 2016). Pelat agar diinokulasi dengan inokulum dari bakteri uji. Kemudian kertas cakram yang berisi ekstrak pigmen bakteri dan kontrol positif berupa ciprofloxacin diletakkan pada permukaan agar lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam untuk mengetahui daya antibakteri berdasarkan besarnya diameter zona bening yang terbentuk.

2.4.8 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan pigmen dilakukan dengan metode DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil). Larutan DPPH 0,1 mM dibuat dengan melarutkan 4 mg DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) dalam 100 ml methanol. 5 mg ekstrak pigmen bebas pelarut dilarutkan dalam 50 ml methanol, selanjutnya larutan dibuat dalam beberapa konsentrasi (10 ppm, 20 ppm, 40 ppm, 80 ppm, dan 120 ppm). Kemudian setiap larutan dengan konsentrasi yang berbeda ditambahkan 2 ml larutan DPPH 0,1 mM dan diinkubasi pada suhu kamar selama 30 menit. Larutan kemudian disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 6000 rpm. Supernatan kemudian diambil dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 517 nm (Kumar et al., 2024).

2.4.9 Identifikasi Pigmen

Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Plat KLT diaktivasi terlebih dahulu menggunakan oven pada suhu 100°C selama 30 menit. Plat KLT yang telah diaktivasi kemudian diletakkan di dalam *chamber* yang berisi fase gerak/eluen (methanol:chloroform 6:4) untuk menghilangkan zat pengotor. Plat KLT kemudian diangkat dan ditunggu hingga seluruh eluennya menguap. Selanjutnya ekstrak pigmen ditotol pada bagian dasar plat KLT dengan bantuan pipet kapiler. Plat KLT kemudian diletakkan di dalam *chamber* yang berisi fase gerak. Nilai retardasi kemudian dihitung dengan persamaan di bawah (Chaturwedi et al., 2024):

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh zat terlarut}}{\text{jarak yang ditempuh pelarut}}$$

Analisis Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GCMS). Pigmen yang telah diekstraksi kemudian diambil sebanyak 1.5 ml dimasukkan ke dalam *microtube* lalu divortex selama 1 menit kemudian disentrifugasi pada kecepatan 6.000 rpm selama 3 menit. Supernatan yang terbentuk kemudian diambil untuk dilakukan uji



r 250°C dengan mode *splitless*, tekanan 76,9 kPa dan laju alir 1:10. Suhu sumber ion dan *interface* 200°C dan 280°C, waktu 00-700 m/z. Jenis kolom SH-Rxi-5Sil MS panjang kolom 30 m am 0,25 mm. Suhu awal kolom 700°C dengan waktu tahan 2 iikkan hingga 200°C dengan laju 100°C/min dan suhu akhir 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).

2.4.10 Pendekatan Bioinformatika dengan Metode *Molecular Docking*

Preparasi Protein Target. Protein target yang digunakan dalam menganalisis potensi antimikroba pigmen ekstrak bakteri untuk *Escherichia coli* adalah *penicillin-binding protein 1b* (PBP1b) PDB ID: 5HLD, sedangkan untuk *Staphylococcus aureus* adalah *penicillin-binding protein 2a* (PBP2a) PDB ID: 1VVQ. Adapun protein target yang digunakan dalam menganalisis potensi antioksidan ekstrak pigmen bakteri adalah *monoamine oxidase A* (MAOA) PDB ID: 2Z5Y. Struktur 3D reseptor kemudian diunduh pada PDB kemudian dioptimasi dengan menghilangkan molekul air dan ko-faktor lain menggunakan perangkat lunak Chimera, kemudian struktur 3D reseptor disimpan dalam format PDB.

Preparasi Ligan. Hasil ekstraksi pigmen bakteri yang diperoleh kemudian dianalisis potensi antibakteri dan antioksidannya menggunakan website *Swiss Prediction Target* (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) dan PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). Setelah senyawa yang ingin dijadikan ligan dipilih, struktur 3D senyawa kemudian diunduh pada database PubChem. Seluruh ligan kemudian dioptimasi 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, dibantu oleh AutoDockTools (Morris et al., 2009). 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 pigmen bakteri dengan protein target (Husain & Wardhani, 2021). Setelah mendapatkan konformasi terbaik pada sisi aktif enzim, *molecular docking* dilakukan pada koordinat tersebut untuk semua ligan. *Grid box* yang digunakan berukuran 40 × 40 × 40 Å. *Molecular docking* diatur untuk menghasilkan 10 konformasi menggunakan algoritma Lamarckian Genetic Algorithm (Morris et al., 1998), kemudian divisualisasikan dengan Discovery Studio Visualizer (Biovia, 2019).

2.4.11 Identifikasi Isolat Bakteri Penghasil Pigmen dengan Analisis Sekuensing



RNA

Ekstraksi DNA genom dilakukan dengan mengikuti protokol tertera pada Geneaid Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit. Langkah persiapan sampel, untuk bakteri gram positif (+) sebanyak 10×10^9 sel ke dalam 1,5 ml tube mikrosentrifugasi, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 13.900 rpm dan supernatan kemudian dibuang. Tambahkan 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 ethanol (96%-100%) dan vortex selama 15 detik hingga tercampur merata.

Semua 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 di erlenmeyer kemudian dipanaskan ke dalam *microwave* selama 2 menit hingga mendidih, lalu ditambahkan 8 µl Ethidium Bromida. Cairan gel lalu didinginkan pada suhu kamar. Setelah dingin, cairan gel dituang ke cetakan gel elektroforesis dengan



el (*comb*) dengan jumlah sisir 17 sumur. Sebanyak 5 µl produk an ke dalam sumur gel agarosa 1,5% yang terendam dengan E Buffer. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 50 menit rstan 100 volt. Setelah 50 menit elektroforesis dihentikan dan imati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA yang ukuran yang mendekati dengan *marker* pada ukuran 1500 bp 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.

2.4.12 Analisis Data

Uji aktivitas antimikroba dan antioksidan dianalisis secara kuantitatif dengan mengukur diameter zona hambatan untuk pengujian antimikroba dan persen inhibisi serta IC_{50} untuk pengujian antioksidan, data hasil pengujian disajikan dalam bentuk tabel. Hasil pengujian KLT dianalisis secara kualitatif dan disajikan dalam bentuk gambar dan tabel, kemudian dianalisis secara kuantitatif dan kualitatif dengan menggunakan GC-MS dan data hasil analisis disajikan dalam bentuk tabel. Pigmen kemudian dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif dengan uji *in silico* untuk efektivitas antimikroba dan antioksidan, data hasil pengujian kemudian disajikan dalam bentuk gambar dan tabel. Isolat kemudian diidentifikasi secara molekuler berbasis gen 16S rRNA, selanjutnya data hasil sekuensing dianalisis dengan membandingkannya dengan data gen bank pada NCBI.

