

BAB I**PENDAHULUAN****1.1 Latar Belakang**

Penyebaran bakteri patogen melalui kontak langsung antara penderita dan staf medis banyak terjadi di rumah sakit. Data dari *World Health Organization* (WHO) 2009 menunjukkan pasien rumah sakit yang mengalami infeksi nosokomial sebesar 8,7% dan lebih dari 1,4 juta orang di dunia menderita infeksi yang didapat di rumah sakit. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang terjadi di fasilitas pelayanan kesehatan seperti rumah sakit setelah 2 x 24 jam sebelum dirawat, pasien belum merasakan gejala dan sudah menularkan penyakit yang diderita kepada petugas, pengunjung dan keluarga, pasien lain, alat-alat di rumah sakit, dan lain-lain (Purwaningsih *et al.*, 2019). Beberapa bakteri dapat menyebabkan infeksi nosokomial antara lain dari genus *Staphylococcus*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, dan lain-lain. Salah satu bakteri dari spesies *Staphylococcus* yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial adalah MRSA (Khan *et al.*, 2016).

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu strain *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotika metisilin. MRSA banyak ditemukan di alam maupun kulit, rongga hidung, dan rongga mulut, yang menyebabkan terjadinya morbiditas dan mortalitas infeksi di rumah sakit. MRSA menyebabkan infeksi kulit dan infeksi dalam aliran darah (bakteremia) yang akhirnya menyebabkan sepsis dan kematian (Akilandeswari dan Ruckmani, 2016). Survei klinis dari Pusat Pengendalian dan Pencegahan Infeksi AS (2013) melaporkan kasus infeksi berat MRSA sebanyak 80.461 per tahun dengan 11.285 kematian per tahunnya di Amerika Serikat. Di Indonesia, prevalensi infeksi di rumah sakit akibat MRSA pada tahun 2014 yaitu sebesar 4,3%, salah satunya di Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Saiful Anwar menunjukkan prevalensi infeksi MRSA tertinggi yaitu sebesar 8,0% (Santosaningsih *et al.*, 2014; Santosaningsih *et al.*, 2019). Hal yang dapat dilakukan untuk mengatasi infeksi akibat MRSA yaitu dengan pemberian terapi antibiotika yang masih aktif terhadap MRSA. Meskipun MRSA telah mengalami resistensi terhadap antibiotika β -laktam, namun antibiotika β -laktam seperti seftarolin dan seftobiprol dari golongan sefalosporin; telavansin, dalbavansin, dan oritavansin dari golongan lipoglikopeptida; daptomisin dari golongan lipopeptida, dan lain-lain masih dapat digunakan dalam terapi MRSA (Choo dan Henry, 2016).

Antibiotika β -laktam yang digunakan sebagai manajemen terapi infeksi *S. aureus*, seperti penisilin dan ampisilin mengalami resistensi melalui pemberian terapi secara terus-menerus. Hal ini dikarenakan enzim β -laktamase menginaktifkan struktur cincin β -laktam dari penisilin dan ampisilin serta adanya perubahan struktur PBP2 menjadi *Penicillin-binding protein 2a* (PBP2a) (Alexander *et al.*, 2020). PBP2a merupakan *Penicillin-binding protein 2* (PBP2) yang telah mengalami perubahan struktur menyebabkan PBP2a memiliki afinitas yang rendah terhadap turunan penisilin, sehingga turunan penisilin tidak dapat berikatan dengan PBP2a dan MRSA menjadi resisten terhadap turunan penisilin (Fishovitz *et al.*, 2014).

Upaya untuk mengatasi resistensi terhadap antibiotika adalah dengan menemukan obat antibiotika baru, dimana dilakukan dengan mencari senyawa penuntun yang memiliki aktivitas antibakteri. Senyawa penuntun merupakan senyawa yang dapat menimbulkan aktivitas biologis, seperti aksi terapeutik, aksi toksik, regulasi fisiologi, hormon, dan feromon, serta senyawa yang berpengaruh terhadap proses biokimia dan patologi pada hewan atau tumbuh-tumbuhan. Senyawa penuntun dapat berasal dari ekstrak tanaman, hewan, mikroba, hasil sintesis obat, dan lain-lain (Siswandono, 2016).

Penelitian mengenai obat antibakteri dibutuhkan untuk memberikan bukti ilmiah bahwa suatu tanaman memiliki khasiat sebagai antibakteri dan dapat digunakan sebagai sumber senyawa penuntun untuk pengembangan obat baru. Berbagai ekstrak tanaman dan rempah-rempah dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri dari berbagai senyawa, dimana senyawa-senyawa tersebut mengandung antimetabolit dari berbagai kelompok struktur, salah satunya fenolik seperti flavonoid, asam fenolik, asam elagat, dan proantosianidin. Flavonoid diketahui sebagai salah satu sumber senyawa yang bermanfaat untuk penyakit menular, salah satunya senyawa antibakteri. Flavonoid dikombinasikan dengan antibiotika telah dilaporkan memiliki aktivitas terhadap bakteri yang resisten terhadap antibiotika (Akilandeswari dan Ruckmani, 2016). Flavonoid termasuk dalam polifenol dan merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan tanaman. Flavonoid banyak terdapat dalam berbagai tanaman seperti markisa, seledri, peterseli, paprika merah, kamomil, mint, ginkgo biloba, dan lain-lain (Panche *et al.*, 2016). Dikarenakan memiliki kandungan flavonoid yang melimpah, bagian dari tanaman markisa seperti buah dan bijinya banyak dikonsumsi oleh masyarakat dan digunakan sebagai obat tradisional.

Tanaman markisa (*Passiflora edulis*) tersebar luas di daerah tropis dan subtropis serta populer akan berbagai manfaatnya terutama dalam kesehatan antara lain untuk mengobati batuk, konstipasi, dismenore, antralgia, disentri, insomnia, dan lain-lain (He

et al., 2020). Beberapa bagian dari tanaman markisa (*P. edulis*) yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri antara lain buah dan biji. Ekstrak metanol dari perikarpium buah markisa dapat menghambat pertumbuhan strain bakteri seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Providencia stuartii* dengan rentang Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) 128 sampai 1024 $\mu\text{g/mL}$. Hal ini dikarenakan dalam ekstrak metanol buah markisa terkandung flavonoid, tannin, steroid, dan saponin yang memiliki aktivitas antibakteri (Dzotam *et al.*, 2016). Minyak dari biji buah markisa menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteriditis*, dan *Bacillus cereus* (Pereira *et al.*, 2018).

Buah markisa mengandung senyawa flavonoid dan glikosidanya seperti apigenin, kuersetin, luteolin, luteolin-6-C-chinovosida, luteolin-6-C-glukosida, sianogenik glikosida passibiflorin, epipassibiflorin, passikapsin, passikoriasin, rutin-sipassikogen, epipassikogen epitetraphilin B, amigdalina, prunasin, triterpenoid glikosida, dan glikosida salisilat (Nurrosyidah *et al.*, 2020). Buah markisa memiliki nilai gizi yang tinggi dengan kandungan multimineral seperti magnesium dan fosfor, berbagai vitamin, serta karbohidrat dan air yang tinggi (Nurrosyidah *et al.*, 2020). Beberapa flavonoid yang terkandung dalam buah markisa memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antara lain apigenin, luteolin, isoorientin, kuersetin, dan turunannya (Cushine *et al.*, 2005). Dari total flavonoid 158,0 $\mu\text{g/mL}$ yang terkandung dalam buah markisa, 0,9% bagiannya merupakan apigenin atau sebesar 1,422 $\mu\text{g/mL}$ (He *et al.*, 2020). Dari analisis dengan menggunakan HPLC-DAD dari ekstrak perikarpium buah markisa, senyawa utama flavonoid yang ditemukan dalam jumlah yang paling banyak adalah apigenin dengan puncak absorbansi paling tinggi (Gazolaa *et al.*, 2015). Beberapa senyawa turunan apigenin yang terkandung dalam buah markisa antara lain vitexin (apigenin-8-C-glukosida), isovitexin (apigenin-6-C-glukosida), dan vitexin-4'-rhamnosida (He *et al.*, 2020).

Berdasarkan struktur kimianya apigenin termasuk ke dalam flavon, salah satu sub kelas dari flavonoid (Wang *et al.*, 2019). Apigenin memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antinflamasi, antioksidan, dan antikarsinogenik (Eumkeb, 2013). Konjugat glikosida, terutama apigenin-7-O-glukosida dan turunan terasilasinya lebih larut dalam air daripada apigenin. Struktur apigenin glikosida mempengaruhi besarnya absorpsi dan bioavailabilitasnya, apigenin memiliki bioavailabilitas tinggi ketika terikat dengan β -glikosida. Aktivitas antibakteri apigenin-C-8-glukosida dilaporkan lemah dibandingkan

dengan apigenin aglikon. Adanya glikosilasi menyebabkan pengurangan lipofilisitas dan akibatnya mengurangi kemampuan untuk menembus membran bakteri (Wang *et al.*, 2019).

Secara umum senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma dengan mempengaruhi pembentukan biofilm, porin, permeabilitas membran, dan interaksi dengan enzim yang penting (Xie *et al.*, 2015). Flavonoid juga dapat menghambat superkoil DNA, dimana flavonoid akan berinteraksi dengan sisi pengikatan (*binding site*) ATPase dari DNA girase sub unit B (Fang *et al.*, 2016). Apigenin sebagai antibakteri mempunyai mekanisme dengan menghambat D-alanin ligase yang terlibat dalam sintesis dinding sel bakteri (Wang *et al.*, 2019).

Apigenin juga menghambat DNA girase dari bakteri *E. coli* (Adamczack *et al.*, 2019). DNA girase merupakan enzim yang berperan penting dalam replikasi DNA yang menjadi target kerja dari antibiotika. Apigenin menghambat superkoil DNA dengan berinteraksi secara kompetitif dengan tempat ATP yang terikat pada DNA girase-B. Adanya ikatan apigenin dengan DNA akan menstabilkan kompleks DNA girase yang mengarah pada induksi pembelahan DNA (Gorniak *et al.*, 2018).

DNA girase merupakan topoisomerase DNA tipe II bakteri yang mengubah topologi DNA dengan memutus ikatan *double-strand* transien dan DNA strain. DNA girase-B terdiri dari N-terminal ATPase yang pada C-terminal terdapat Toprim dan *Tail*. Girase-B menggunakan energi dari hidrolisis ATP untuk mengubah superkoil negatif menjadi DNA, hal ini menyebabkan girase-B memiliki peran penting dalam proses transkripsi dan replikasi. Penghambatan pada girase-B menjadi fokus utama dalam pengobatan infeksi bakteri, sehingga girase-B digunakan sebagai target dari obat antibakteri (Verma *et al.*, 2021). Antibiotika yang bekerja dengan menghambat DNA girase adalah siprofloksasin, levofloxasin, koumermisin, novobiosin, dan lain-lain (Shirude dan Shahul, 2012). Penelitian yang dilakukan Champion *et al* (2004) menyebutkan bahwa siprofloksasin dapat menghambat MRSA dengan KHM sebesar 0,5 µg/mL dan Kadar Bakterisidal Minimal (KBM) sebesar 1 dan 2 µg/mL, dimana pada konsentrasi 1 dan 2 µg/mL siprofloksasin mampu membunuh 99,9% bakteri.

Berdasarkan pada penelitian sebelumnya yang dilakukan Akilandeswari dan Ruckmani (2016), apigenin memiliki efek sinergis dengan ampicilin dan seftriakson dalam menekan pertumbuhan MRSA dengan merusak membran sitoplasma MRSA dan menyebabkan keluarnya komponen intrasel. Kombinasi apigenin dengan ampicilin dan

seftriakson menunjukkan efek penghambatan yang signifikan dan pengurangan jumlah koloni sebesar 99% setelah 8 jam. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari apigenin terhadap bakteri gram positif dan bakteri gram negatif berkisar antara 32,5 hingga 62,5 $\mu\text{g/mL}$. Apigenin mengurangi KHM ampisilin 800 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 107 $\mu\text{g/mL}$ dan KHM seftriakson 58 $\mu\text{g/mL}$ menjadi 2,6 $\mu\text{g/mL}$ terhadap MRSA.

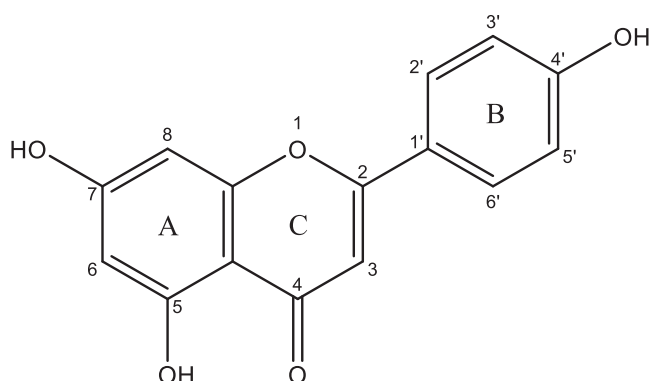
Antibiotika golongan β -laktam yang masih dapat digunakan dalam terapi MRSA adalah golongan sefalosporin seperti seftarolin. Antibiotika seftarolin bersifat bakterisid yang diberikan secara intra vena (IV) untuk pengobatan infeksi jaringan ikat dan kulit bakterial akut yang disebabkan berbagai mikroorganisme termasuk MRSA. Seftarolin memiliki afinitas yang tinggi terhadap PBP2a. Seftarolin akan berikatan dengan sisi alosterik PBP2a menyebabkan perubahan konformasi sehingga sisi aktif molekul terbuka, memungkinkan pengikatan molekul seftarolin kedua (Choo *et al.*, 2016). Penelitian yang dilakukan pada 29 pasien dengan infeksi MRSA yang diberi seftarolin 600 mg selama 8 jam secara IV yang apabila dikombinasikan dengan trimetoprim-sulfametoksazol atau daptomisin, akan memiliki KHM sebesar <1 mg/mL (Fabre *et al.*, 2014).

Berdasarkan uraian di atas, maka apigenin berpotensi dikembangkan sebagai senyawa antibakteri yang aktif terhadap MRSA. Namun, masih belum diketahui apakah apigenin dapat berinteraksi dengan PBP2a, sehingga perlu dilakukan penelitian tentang interaksi antara apigenin dengan PBP2a dari MRSA dan DNA girase-B dari MRSA. Interaksi antara apigenin dengan kedua target tersebut dilakukan secara *in silico* dengan menggunakan metode *docking* molekul. Perkembangan teknologi komputerisasi membantu dalam merancang obat baru. Struktur molekul tiga dimensi enzim sebagai reseptor obat dalam melakukan pengembangan obat dapat dijadikan sebagai dasar dalam menentukan mekanisme kerja obat pada tingkat molekul (Siswandono, 2016).

Untuk mengetahui aktivitas apigenin dalam penghambatan PBP2a digunakan pembanding seftarolin yang merupakan antibiotika golongan sefalosporin yang dapat menghambat PBP2a, sedangkan aktivitas apigenin dalam menghambat girase-B digunakan pembanding siprofloksasin. Yang digunakan sebagai target molekul (reseptor) PBP2a adalah 6H5O yang merupakan kode Protein Data Bank (PDB) untuk struktur kristal PBP2a dengan ligan asal piperasilin. Yang digunakan sebagai target molekul (reseptor) Girase-B adalah 4URO yang merupakan kode PDB untuk struktur kristal girase-B dengan ligan asal novobiosin (www.pdb.org).

Uji *docking* molekul dilakukan menggunakan program komputer Molegro Virtual Docker. Molegro Virtual Docker merupakan program simulasi *docking* protein-ligan

yang memungkinkan untuk melakukan simulasi *docking* menggunakan komputer (Thomsen dan Mikael, 2006). Afinitas antara ligan-reseptor dalam program MVD dapat dinilai dari *Rerank Score* yang menunjukkan energi kompleks ligan-reseptor, semakin rendah nilai *Rerank Score* maka semakin stabil ikatan ligan-reseptor sehingga diprediksi memiliki aktivitas biologis semakin tinggi (Kusumaningrum *et al.*, 2015).



Gambar 1.1 Struktur senyawa apigenin (He *et al.*, 2020).

Adanya gugus 4', 5, 7- OH, dan gugus 4-karbonil pada apigenin dapat meningkatkan aktivitas antibakteri (Akilandeswari dan Ruckmani, 2016; Fang *et al.*, 2016), sehingga dilakukan penelitian senyawa apigenin dan turunannya terhadap PBP2a dan girase-B untuk mengetahui apakah senyawa apigenin dan turunannya mempunyai afinitas tinggi terhadap PBP2a dan girase-B sehingga akan menghasilkan aktivitas antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah senyawa apigenin dan turunannya mempunyai aktivitas antibakteri secara *in silico* terhadap target PBP2a dengan menggunakan pembandingan Seftarolin?
2. Apakah senyawa apigenin dan turunannya mempunyai aktivitas *in silico* terhadap Girase-B dengan menggunakan pembandingan Siprofloksasin?

1.3. Tujuan Penelitian

1. Menentukan aktivitas *in silico* senyawa apigenin dan turunannya terhadap PBP2a dengan menggunakan pembandingan Seftarolin.
2. Menentukan aktivitas *in silico* senyawa apigenin dan turunannya terhadap Girase-B dengan menggunakan pembandingan Sipprofloksasin.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi bahwa senyawa apigenin dan turunannya yang berasal dari *Passiflora edulis* dapat dikembangkan sebagai calon obat antibakteri setelah melalui uji *in vitro* dan *in vivo*. Adanya potensi senyawa apigenin dan turunannya sebagai antibakteri terhadap bakteri yang resisten dapat menjadi dasar untuk merancang metode sintesis turunan apigenin.