

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Resistensi antimikroba merupakan krisis kesehatan global yang sangat besar dan salah satu ancaman paling serius yang dihadapi manusia saat ini (Breijyeh *et al.*, 2020). Berdasarkan data yang diperoleh pada tahun 2019, CDC (*Central of Disease Control*) menyampaikan bahwa terdapat lebih dari 2,8 juta infeksi yang terjadi akibat resistensi antibiotika setiap tahunnya di Amerika Serikat. Resistensi antimikroba ini telah meningkat secara dramatis selama beberapa tahun terakhir dan saat ini diakui sebagai tantangan medis utama di sebagian besar pengaturan perawatan kesehatan di seluruh dunia. Kematian yang dikaitkan dengan resistensi cukup besar dan dengan demikian menambah beban penyakit menular (Theuretzbacher, 2013). Resistensi antimikroba adalah resistensi yang timbul pada obat antimikroba pada agen infeksi seperti pada bakteri, jamur, parasit, dan virus (WHO, 2021).

Bakteri dapat mengakibatkan resistensi akibat pemberian antibiotika yang tidak tepat dosis, diagnosis yang salah, dan ketidaktepatan sasaran bakteri penyebab resistensi tersebut (Sugireng, 2021). Mekanisme resistensi antibiotika dapat terjadi melalui penurunan *influx* dan peningkatan *efflux* antibiotika, modifikasi antibiotika dengan adanya degradasi secara enzimatis sehingga tidak dapat mengikat targetnya sendiri seperti enzim β -laktamase, serta modifikasi pada target antibiotika (Petchiappan dan Chatterji, 2017).

Resistensi antibiotika paling tinggi terjadi pada bakteri *Enterobacteriaceae* spp. (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp.), *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, dll. (Petchiappan dan Chatterji, 2017). Angka kejadian resistensi antibiotika terus meningkat terutama disebabkan karena bakteri gram negatif, utamanya pada *Enterobacteriaceae* seperti *E. coli* dan *K. pneumoniae* (Paterson, 2006). Diantara bakteri tersebut terdapat beberapa bakteri seperti *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, dan *E. coli* yang dapat menghasilkan ESBL (*Extended Spectrum Beta-Lactamase*). ESBL merupakan enzim yang dimediasi plasmid yang diproduksi oleh bakteri yang menghidrolisis cincin β -laktam (Rawat dan Nair, 2010). Penelitian sebelumnya di Jepang bakteri penghasil ESBL yang telah menyebar terdiri dari 23,0%

strain *E. coli* dan 10,7% *K. pneumoniae* dari 2014 hingga 2015 (Kawamoto *et al.*, 2019). Penghasil ESBL dari *E. coli* memiliki potensi untuk mentranslokasi dan menyebabkan sepsis pada pasien rawat inap dengan infeksi saluran kemih (Eumkeb *et al.*, 2012).

Perhatian khusus tertuju pada *E. coli* penghasil ESBL karena dapat menyebabkan peningkatan insiden dan resistensi terhadap berbagai antibiotika β -laktam dari tahun 1990-an (Peralta *et al.*, 2007 dan Ortega *et al.*, 2009). ESBL merupakan enzim yang dapat menyebabkan hampir keseluruhan dari antibiotika β -laktam mengalami resistensi, sehingga adanya infeksi oleh bakteri penghasil ESBL ini dapat meningkatkan angka kejadian resistensi. Bakteri yang menghasilkan ESBL ini menyebabkan hidrolisis pada penisilin, sefalosporin generasi I, II, III, serta pada aztreonam. ESBL berasal dari bakteri penghasil β -laktamase yang mengalami mutasi sehingga dapat menyebabkan adanya peningkatan aktivitas enzimatis dari β -laktamase dan menghidrolisis aztreonam dan sefalosporin yang generasi III. ESBL ini juga dapat menyebabkan bakteri penghasil ESBL resisten terhadap beberapa antibiotika disebabkan adanya mutasi atau perubahan pada genetiknya (Sugireng, 2021).

Terapi pengobatan yang dilakukan untuk menghambat dan membunuh bakteri *E. coli* tidak hanya sebatas pada pemberian antibiotika namun juga untuk penghambatan terhadap ESBL ini karena *E. coli* merupakan bakteri penghasil ESBL sehingga dapat meningkatkan insiden resistensi pada antibiotika β -laktam. Salah satu antibiotika yang aktif terhadap Gram-negatif adalah fluorokuinolon, umumnya sangat efektif terhadap bakteri aerob Gram-negatif dan banyak isolat Gram-positif. Golongan fluorokuinolon terdiri dari siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, gatifloksasin, dll. (Scheld, 2003). Golongan fluorokuinolon yang paling banyak digunakan di Indonesia adalah siprofloksasin yang merupakan antibiotik posisi nomor ketiga yang paling banyak digunakan baik di puskesmas atau rumah sakit di Indonesia pada tahun 2012 sampai 2014 (Raini, 2016). Berdasarkan penelitian sebelumnya, sensitifitas *E. coli* terhadap siprofloksasin mengalami penurunan (dari 99% menjadi 89% dalam periode 3 tahun). Selain itu siprofloksasin umumnya dua kali lipat lebih aktif terhadap *E. coli* dibanding levofloksasin dan moksifloksasin (Scheld, 2003). Konsentrasi hambat minimum (KHM) siprofloksasin terhadap *E. coli* 0,08-0,047 mg/L yang ditentukan melalui Etest sesuai dengan instruksi dari pabriknya (AB Biodisk, Solna, Swedia) dengan pelat agar Mueller-Hinton. Siprofloksasin bekerja dengan menghambat DNA girase yang mengkatalisis superkoil negatif DNA sirkular tertutup sehingga proses replikasi dan transkripsi tidak bisa berjalan dan sintesis protein terganggu (Olofsson *et al.*, 2006; Bansal dan Tandon,

2011; Lafitte *et al.*, 2002). DNA girase dikenal sebagai target agen antibakteri karena penghambatannya dalam menginduksi kematian bakteri karena merupakan protein bakteri utama yang terlibat dalam replikasi dan transkripsi (Lafitte *et al.*, 2002). Siprofloksasin mengalami resistensi terhadap *E. coli* dengan melalui mutasi pada gen yang mengkode DNA girase dan topoisomerase IV. Mutasi gen tersebut umumnya termasuk mutasi yang mempengaruhi dua gen target obat yang berbeda, *gyrA* dan *parC* (Huseby *et al.*, 2017).

Cara lain yang digunakan untuk mengatasi *E. coli* yang resisten adalah dengan pemberian antibiotika bersama antibiotika yang tahan terhadap β -laktamase seperti asam klavulanat, sulbactam, dan tozobactam (Saudagar *et al.*, 2008). Asam klavulanat lebih efisien dibanding sulbaktam, sulbaktam membutuhkan sekitar delapan kali lebih banyak untuk menghambat ESBL yang serupa dengan asam klavulanat. Asam klavulanat meniru molekul substrat penisilin melalui interaksi pada situs katalitik β -laktamase dengan melekat lebih kuat sehingga menghalangi situs katalitik dan mencegah aksi enzim pada molekul substrat penisilin sehingga tidak mengalami resistensi. Penggunaan asam klavulanat ini tidak efektif jika tidak digunakan bersama dengan antibiotik yang aktif terhadap bakteri penghasil β -laktamase (Cole, 1982). Penggunaan asam klavulanat dengan konsentrasi 4 $\mu\text{g/ml}$ bersama dengan amoksisilin dapat menurunkan KHM terhadap ESBL CTX-M-15 amoksisilin menjadi 8-32 $\mu\text{g/ml}$ yang jika penggunaan amoksisilin sendiri nilai KHMnya adalah $>256 \mu\text{g/ml}$ (Lartigue *et al.*, 2007).

Senyawa alternatif yang mempunyai aktivitas antibakteri diperlukan untuk membantu mengatasi permasalahan resistensi antibiotika utamanya yang disebabkan oleh bakteri penghasil ESBL. Senyawa tersebut yang bisa berasal dari bahan alam seperti tumbuhan, hewan, mikroba, dan mikroorganisme laut, serta sintesis kimia (Gyawali dan Ibrahim., 2014 dan Bernan *et al.*, 2004). Senyawa antibakteri yang terdapat dalam tanaman berasal dari metabolit sekunder yang dapat menghasilkan aktivitas antibakteri seperti flavonoid, tanin, dan saponin (Nyong *et al.*, 2009). Flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C6-C3-C6 (Maslarova, 2001). Senyawa golongan flavonoid tersebar pada berbagai tanaman yaitu famili Passifloraceae (*Passiflora edulis*), Apiaceae (*Foeniculum vulgare* Mill.), Acanthaceae (*Graptophyllum pictum* (L.) Griff.), dll. (Adamczak *et al.*, 2020). Terdapat penelitian yang menyatakan bahwa sari buah markisa (*Passiflora edulis*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E.coli* ESBL (Nurrosyidah dan Mertaniasih, 2020). Aktivitas antibakteri pada senyawa flavonoid yang telah terbukti antara lain terdapat pada luteolin-8-C-glukosida, luteolin-

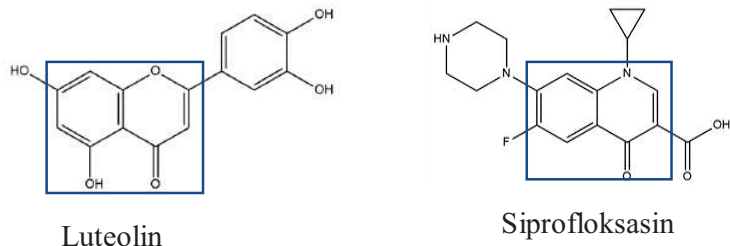
6-C-glukosida, apigenin 8-C-glukosida, dan apigenin 6-C-glukosida (Karpiński *et al.*, 2020). Markisa (*Passiflora edulis*) mengandung senyawa turunan luteolin antara lain luteolin-8-C- β -digitoksopiranosida, luteolin-8-C- β -boivinopiranosida (Xu *et al.*, 2013), luteolin-8-C- β -digitoksopiranosil-4'-O- β -D-glukopiranosida, luteolin-6-C-sinovosida, luteolin-6-C-fukosida (Mareck *et al.*, 1991). Senyawa golongan flavonoid bekerja sebagai antibakteri dengan menyebabkan penurunan integritas membran dan kerusakan membran sitoplasma, dengan KHM yang dapat menghambat bakteri *E. coli* 3,9 $\mu\text{g/ml}$ yang diuji dengan teknik *microbroth dilution* sesuai dengan petunjuk *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. KHM yang rendah dari flavonoid (<10 $\mu\text{g/ml}$) menunjukkan bahwa senyawa flavonoid memiliki aktivitas antibakteri yang baik (Babii *et al.*, 2016). Tingkat substitusi gugus glukosida pada luteolin mempengaruhi aktivitas antibakteri tetapi tidak mempengaruhi efek toksisitas akut pada mencit (Akroum *et al.*, 2009). Luteolin memiliki ketahanan yang lebih besar terhadap bakteri Gram-negatif daripada Gram-positif, terutama senyawa *luteolin-8-C-glucoside* dan *luteolin-6-C-glucoside* (Karpiński *et al.*, 2020).

Penelitian lain juga menunjukkan bahwa luteolin memiliki efek sinergis dengan amoksisilin terhadap bakteri *amoxicillin-resistant Escherichia coli* dan dapat bekerja melalui tiga mekanisme yaitu dengan melakukan penghambatan terhadap struktur α -helix protein dan sintesis peptidoglikan serta ribosom, penghambatan aktivitas ESBL dan perubahan permeabilitas membran luar dan dalam sel bakteri. Dengan adanya mekanisme penghambatan aktivitas ESBL oleh luteolin dan hambatan sintesis struktur α -helix protein maka luteolin berpotensi untuk dikembangkan sebagai antibakteri yang tahan terhadap β -laktamase (Eumkeb *et al.*, 2012). Senyawa antibakteri alami yang tidak memiliki struktur inti β -laktam tidak terpengaruh oleh adanya mutasi sehingga bakteri membutuhkan waktu yang lama untuk timbulnya resistensi, sehingga hal tersebut merupakan salah satu keuntungan tersendiri (Sariyer dan Saral, 2021).

Dengan melihat potensi luteolin sebagai antibakteri dapat dikembangkan turunan senyawa luteolin sebagai obat antibakteri baru yang tahan terhadap β -laktamase. Nilai KHM luteolin dalam menurunkan pertumbuhan *E. coli* yang resisten amoksisilin adalah 200 mg/L (Eumkeb *et al.* 2012). Sebagai antibakteri yang aktif menghambat dan membunuh *E. coli*, luteolin dapat menghambat DNA girase sehingga replikasi dan transkripsi bakteri *E. coli* tidak berlangsung. Selain itu, senyawa turunan luteolin juga diharapkan mampu menghambat ESBL dan tidak menginduksi produksi ESBL seperti

penghambat ESBL asam klavulanat yang bisa menghambat β -laktamase, termasuk ESBL (Chaudhary & Aggarwal, 2004).

Luteolin memiliki struktur yang mirip dengan siprofloksasin yang memiliki mekanisme kerja sebagai penghambat DNA girase.



Gambar 1.1 Struktur senyawa luteolin dan siprofloksasin

In Silico merupakan eksperimen yang dilakukan oleh komputer yang membantu kita dalam membuat keputusan dan mensimulasikan hampir setiap aspek penemuan dan pengembangan obat (Ekins *et al.*, 2007). Studi *in silico* ini dilakukan dengan menggunakan metode *docking* molekul prediksi aktivitas senyawa uji dengan reseptor atau sel target yang dipilih. *Docking* berperan dalam pengembangan obat baru dengan upaya untuk mensejajarkan antara ligan ke dalam sel target. Pemodelan molekul tersebut digunakan untuk mempelajari sifat molekul senyawa obat, molekul biologis reseptor, dan untuk memahami aksi obat pada tingkat molekul maupun atom yang dilakukan dengan simulasi proses interaksi obat-reseptor (*docking*) dengan bantuan komputer (Siswandono, 2016). Proses komputasi ini dilakukan untuk mencari konformasi ligan yang paling sesuai dengan reseptor secara geometris dengan penghitungan energi interaksi ligand-reseptor yang ditunjukkan oleh nilai afinitas ikatan ligan-reseptor. Senyawa dinyatakan lebih aktif dan stabil jika memiliki energi bebas yang lebih rendah (Siswandono, 2016). *Docking* molekul dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa program seperti *AutoDock*, *AutoDock Vina*, *DockThor*, dan *Molegro Docker Virtual* dll. (Torres *et al.*, 2019). Oleh karena itu, dengan melakukan simulasi *docking* maka dapat diketahui gambaran aktivitas senyawa sebelum senyawa tersebut diisolasi dan disintesis sehingga faktor coba-coba (*trial and error*) yang akan memakan waktu, energi, serta biaya yang dibutuhkan dapat diminimalisir (Siswandono, 2016). Pada penelitian ini digunakan *Autodock Vina* karena mudah digunakan serta parameter yang diukur adalah afinitas terhadap reseptor.

Sejauh ini belum ada yang menyatakan bahwa luteolin memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* melalui penghambatan DNA girase yang merupakan target agen antibakteri karena penghambatannya menginduksi kematian bakteri. Oleh karena itu, untuk mengetahui senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *E. coli* akan dilakukan studi interaksi senyawa turunan luteolin secara *in silico* melalui *docking* molekul terhadap DNA girase-

Menurut hasil penelitian Eumkeb *et al.*, 2012, luteolin mampu membalikkan *amoxicillin-resistant Escherichia coli* serta penelitian Nurrosyidah dan Mertaniasih, 2020, tentang sari buah markisa yang salah satu kandungannya adalah luteolin mampu menghambat ESBL berpotensi untuk mengembangkan senyawa turunan luteolin sebagai antibakteri *E. coli* dengan cara menghambat DNA girase dan ESBL. Berdasarkan skema taksonomi Molekuler Ambler, β -laktamase dibagi dalam empat kelas yaitu serin β -laktamase yang terdiri dari kelas A, B, C, dan D, serta metallo β -laktamase kelas B. ESBL termasuk dalam kelas β -laktamase A yang terdiri dari ESBL tipe TEM, SHV, dan CTX-M serta kelas D yang terdiri dari ESBL tipe OXA. ESBL tipe TEM dapat ditemukan pada *E. coli*, *H. influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*, ESBL jenis SHV ditemukan terutama di *K. Pneumoniae*, serta ESBL tipe lain seperti tipe OXA, tipe CTX-M yang ditemukan dalam berbagai spesies berbeda dalam famili Enterobacteriaceae dan *P. Aeruginosa*. CTX-M memiliki beberapa jenis seperti CTX-M-1, CTX-M-9, dan CTX-M-15. Kemunculan bakteri penghasil ESBL di rumah sakit meningkat terutama yang dihasilkan oleh *E. coli* dan CTX-M-15 menjadi strain penghasil ESBL yang dominan serta merupakan reseptor dari ESBL pada berbagai antibiotik yang memiliki ketahanan terhadap ESBL. Meskipun demikian, hal ini dapat memungkinkan timbulnya resistensi terhadap inhibitor β -laktamase dengan mutasi pada saluran porin, hidrolisis struktur inti inhibitor, dan overekspresi β -laktamase, sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menemukan antibiotik baru dengan struktur non- β -laktam (Lewis *et al.*, 2007; Sah dan Hemalatha, 2015; Sariyer dan Saral, 2021).

Senyawa yang akan digunakan pada uji *in silico* diambil dari senyawa luteolin, turunan luteolin yang memiliki aktivitas antibakteri *E.coli* secara *in vitro* (luteolin-8-C-glukosida, luteolin 6-C-glukosida), turunan luteolin pada markisa (luteolin-8-C- β -digitoksopyranosida, luteolin-8-C- β -boivinopiranosida, luteolin-8-C- β -digitoksopiranosil-4'-O- β -D-glukopiranosida, luteolin-6-C-sinivosida, luteolin-6-C-fukosida), serta turunan luteolin dengan variasi berupa gugus metil pada OH luteolin

(luteolin 3'-metil eter, luteolin 4'-metil eter, luteolin 5'-metil eter, luteolin tetrametil eter, luteolin 3',4'-dimetil eter, dan luteolin 5,3'-dimetil eter).

Perbedaan substitusi pada senyawa turunan luteolin akan menghasilkan perbedaan sifat fisikokimia dan farmakokinetik maka diperlukan prediksi profil ADMET. Obat yang diberikan dengan rute pemberian oral akan melalui fase farmasetik dan farmokokinetik yang meliputi absorpsi, distribusi, metabolisme dan ekskresi serta mengenai toksisitas dari suatu senyawa. Suatu obat harus larut dalam cairan biologis tubuh dan mampu menembus membran agar bisa terdistribusi menuju tempat aksinya (reseptor obat). Dengan prediksi ADMET, tingkat toksisitas senyawa juga akan diketahui baik dari nilai toksisitas akut, sifat hepatotoksik ataupun mutageniknya. Oleh karena hal tersebut, prediksi ADMET diperlukan untuk memilih senyawa yang mempunyai farmakokinetik yang baik dan toksisitas yang rendah dari senyawa turunan luteolin (Pires *et al.*, 2015).

Pada uji aktivitas secara *in silico* digunakan 2 reseptor yaitu DNA girase (kode PDB: 1KZN) dan CTX-M-15 ESBL (kode PDB: 4HBU).

1KZN merupakan struktur kristal domain *E. coli* 24kDa dengan klorobiosin sebagai ligan standar (Lafitte *et al.*, 2002).

Sejauh ini belum ada yang menyatakan bahwa turunan luteolin mampu menghambat ESBL melalui penghambatan ESBL CTX-M-15. Oleh karena itu, untuk mengetahui senyawa yang memiliki potensi sebagai penghambat CTX-M-15 *E. coli* akan dilakukan studi *in silico* senyawa turunan luteolin melalui *docking* molekul terhadap reseptor CTX-M-15 (kode PDB: 4HBU). Protein dengan kode PDB 4HBU merupakan struktur kristal ESBL CTX-M-15 yang mengandung ligan standar (2*S*,5*R*)-1-formyl-5-[(sulfooxy)amino]piperidine-2-carboxamide (NXL104) yang dapat memberikan aktivitas penghambatan ESBL pada *E. coli* (Lahiri *et al.*, 2013).

Ligan standar dalam 1KZN mempunyai gugus farmakofor C=O pada *chromene* yang mengikat asam amino Arg 136A, gugus O-H pada gula mengikat asam amino Asn46A melalui ikatan hidrogen, dan gugus amina sekunder pada cincin pirol yang mengikat Asn 46A sedangkan Ligan standar dalam 4HBU mempunyai gugus farmakofor amin sekunder pada cincin piperidin yang mengikat asam amino Ser 130A melalui ikatan hidrogen, gugus C=O pada amida yang mengikat Asn 132A(Proteinplus).

Variasi gugus metil pada OH luteolin merupakan modifikasi struktur dengan model pendekatan Topliss yang memasukkan gugus metil pada OH luteolin yang diprediksi akan mempengaruhi ikatan hidrogen yang akan mempengaruhi aktivitas antibakteri dari senyawa penuntun, senyawa tersebut berasal dari Pubchem (Siswandono, 2016).

1.2 Rumusan Masalah

- (1) Apakah senyawa luteolin dan tiga belas turunannya mempunyai aktivitas antibakteri dengan cara menghambat DNA girase *Escherichia coli* lebih besar dibanding siprofloksasin secara *in silico*?
- (2) Apakah senyawa luteolin dan tiga belas turunannya mempunyai aktivitas penghambat ESBL dengan cara menghambat ESBL CTX-M-15 *Escherichia coli* lebih besar dibanding asam klavulanat secara *in silico*?
- (3) Apakah profil ADMET senyawa luteolin dan tiga belas turunannya memenuhi persyaratan farmakokinetik dan toksisitas sebagai calon obat secara *in silico*?

1.3 Tujuan Penelitian

- (1) Membuktikan senyawa luteolin dan tiga belas turunannya mempunyai aktivitas antibakteri dengan cara menghambat DNA girase *Escherichia coli* lebih besar dibanding siprofloksasin secara *in silico*.
- (2) Membuktikan senyawa luteolin dan tiga belas turunannya mempunyai aktivitas penghambat ESBL dengan cara menghambat ESBL CTX-M-15 *Escherichia coli* lebih besar dibanding asam klavulanat secara *in silico*.
- (3) Membuktikan profil ADMET senyawa luteolin dan tiga belas turunannya memenuhi persyaratan farmakokinetik dan toksisitas sebagai calon obat secara *in silico*.

1.4 Manfaat Penelitian

Memberikan informasi bahwa senyawa luteolin dan tiga belas turunannya diprediksi mempunyai efek antibakteri terhadap *E. coli* dengan cara menghambat DNA girase dan aktivitas hambatan terhadap ESBL CTX-M-15, sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai calon obat antibakteri setelah melalui uji-uji preklinik dan klinik.