

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pada tahun 2019 resistensi antimikroba menyebabkan sekitar 3,57 juta kematian di seluruh dunia (Irfan et al., 2022; Murray et al., 2022). Jika pengembangan antimikroba tidak tercapai maka diperkirakan angka kematian akan meningkat menjadi 10 juta pada tahun 2050 (Dias et al., 2022; Willyard, 2017). Kemunculan resistensi antimikroba terjadi melalui beberapa mekanisme (Altınöz & Altuner, 2019), salah satunya yaitu protein pompa efflux pada membran bakteri (Cruz et al., 2023). Pompa efflux diklasifikasikan menjadi lima superfamili yang berbeda: *major facilitation super family* (MFS), *multidrug toxic composite extrusion* (MATE) *transporters*, *resistance nodulation-division* (RND) *super family*, *ATP binding cassette* (ABC) *transporters*, *small multidrug resistance* (SMR) *family* (Fernando & Kumar, 2013; Verma et al., 2021). Ada beberapa mekanisme yang dapat digunakan dalam melawan resistensi yang dimediasi oleh pompa efflux yaitu menekan ekspresi gen pengkode pompa efflux, memblok protein membran dalam atau luar yang terlibat dalam efflux, menghambat pompa efflux menggunakan inhibitor (EPI), gangguan perakitan pompa, gangguan kekuatan motif proton, dan perubahan struktur obat (Verma et al., 2021).

Pompa efflux menjadi perhatian dari semua mekanisme resistensi, hal ini disebabkan karena pompa efflux memiliki substrat dan distribusi yang luas di berbagai spesies bakteri. Selain itu, pompa efflux juga berkontribusi pada pembentukan biofilm, virulensi, dan patogenesis (Verma et al., 2021). Pompa efflux dianggap sebagai target yang berpotensi untuk mengatasi resistensi antimikroba, sehingga menghambat fungsi pompa efflux merupakan metode yang memungkinkan untuk mengatasi resistensi antimikroba (Kumawat et al., 2023). Salah satu mikroorganisme yang menyebabkan resistensi yaitu bakteri *A.baumannii* dan *S.aureus* (Dharmawan et al., 2023; Jadimurthy et al., 2022).

Bakteri Gram-negatif *A. baumannii* merupakan patogen utama yang menyebabkan infeksi di rumah sakit dengan angka kematian diperkirakan mencapai 30-40% (Anggraini et al., 2022; Esterly et al., 2011). *A. baumannii* menjadi resisten terhadap hampir semua antibiotik (Id et al., 2021; Sohail et al., 2016). Jumlah resistensi *A. baumannii* terhadap sefoperazon-sulbaktam berada pada kisaran 46,3% (Deng et al., 2022), terhadap kuinolon (ciprofloxacin dan levofloxacin) sebesar 73,6%, terhadap sulfonamid sebesar 71,3%, dan lebih dari separuh (50-70%) terhadap sefalosporin (cefazidime dan cefepime), kombinasi penghambat β -e. (tazobactam-piperacillin), dan karbapenem (doripenem, penem). Sedangkan sebesar 26,7% menunjukkan resistensi ecycline (Chen et al., 2017; Rosalino et al., 2020).

aureus merupakan bakteri Gram-positif yang menunjukkan beberapa antibiotik (Pignataro et al., 2020), dengan angka 10% hingga 30% akibat infeksi (Cheung et al., 2021; Hindy et al., 2021). Paling tidak efektif terhadap obat azitromisin sebesar 82,28%,



eritromisin 82,82%, klindamisin 82,32% (An et al., 2024), penisilin G 96,6%, oksasilin 61,2%, ampicilin 84,4%, amoksisilin 64,9%, cefoxitin 49,8%, cefuroxime 39,2%, cefalotin 22,4%, cefotaxime 60,4%, ceftriaxone 36,7% dan imipenem 17,9% (Rosdi et al., 2021).

Pengobatan di Indonesia terkait infeksi merujuk pada pedoman penggunaan antibiotik yang ditetapkan oleh Kemenkes, dimana untuk infeksi yang disebabkan oleh bakteri *A. baumannii* menggunakan antibiotik sefoperazon-sulbaktam, levofloksasin, amikasin, seftazidim, karbapenem, dan gentamisin (Permenkes RI, 2021). Sedangkan infeksi yang disebabkan oleh *S.aureus* menggunakan antibiotik cefotaxime, ceftriaxone, ampicilin-sulbaktam kombinasi dengan klaritromisin atau azitromisin, levofloksasin (Permenkes RI, 2021).

Akibat resistensi antibiotik ini, diperlukan alternatif lain untuk mengatasinya dengan ditemukannya terapi anti-pompa efflux atau melalui terapi pengobatan kombinasi (Kuok et al., 2017). Salah satu senyawa yang dapat dikembangkan adalah asam sinamat dan turunannya. Asam sinamat merupakan asam karboksilat tak jenuh yang memiliki toksisitas rendah, dapat ditemukan di berbagai tanaman termasuk kayu manis (*Cinnamomum cassia*) (Zhuo et al., 2022).

Asam sinamat dan turunannya (ester, amida, aldehida, dan alkohol) terdiri dari sembilan atom karbon (C6-C3) (Adisakwattana, 2017) dan memiliki banyak aktivitas farmakologis (de Morais et al., 2023), salah satunya yaitu antimikroba (Carvalho et al., 2014; Chiriach et al., 2005; Guzman, 2014; Hemaiswarya & Doble, 2010; Naz et al., 2006; Utcharyyakiat et al., 2016; Zhu et al., 2000). Turunan asam sinamat dikenal dengan aktivitas antimikrobanya (de Morais et al., 2023), dimana untuk nilai MIC turunan asam sinamat ester terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, berkisar antara 43 dan 301 μ M. Cinnamoyl 2-methylphenylamine dengan nilai MIC masing-masing 114, 139 dan 139 μ M terhadap *B. subtilis*, *E. coli* dan *S. aureus*. Cinnamaldehyde dengan nilai MIC masing-masing 15 dan 7,6 μ M terhadap *H. Phylori* dan *E. Coli*. Sedangkan Cinnamyl alcohol menunjukkan sedikit efek penghambatan terhadap semua spesies bakteri dan jamur (Guzman, 2014).

Upaya yang dapat dilakukan untuk mengatasi resistensi antimikroba adalah terapi kombinasi sinergis. Kombinasi Trans-Cinnamaldehyde (TCA) dengan amikasin dapat mengurangi MIC amikasin sebesar 16 kali lipat terhadap MRSA dengan nilai FICI (indeks konsentrasi penghambatan fraksional) serendah 0,19 dan TCA dikombinasikan dengan gentamisin, vankomisin, dan amoksisilin memiliki efek sinergis yang signifikan (S. Wang et al., 2021). TCA juga berpotensi digunakan dengan kombinasi antibiotik β -laktam untuk mengatasi infeksi MDR *A.baumannii* (Karumathil et al., 2018).



penelitian yang menunjukkan aktivitas turunan asam sinamat dan salah satu turunan asam sinamat yaitu cinnamaldehyde tambahan untuk mengobati infeksi *P. aeruginosa* yang memiliki ikombinasikan dengan antibiotik karena aktivasi pompa efflux (d et al., 2019), sehingga dapat dilakukan tahap awal dengan *in silico* untuk melihat interaksi antara protein target dengan sangat penting untuk mengembangkan alternatif terapeutik di

masa mendatang (Guzman, 2014) dan membantu mengidentifikasi senyawa asam sinamat dan turunannya sebagai anti pompa efflux terhadap bakteri *A. baumannii* dan *S. aureus*. Oleh karena itu, maka perlu dilakukan penelitian dengan analisis secara *in silico* terhadap beberapa protein target dari sepuluh senyawa asam sinamat dan turunannya. Senyawa yang terpilih sebagai kandidat anti pompa efflux akan dilakukan uji aktivitas secara *in vitro* terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana afinitas dan model interaksi senyawa asam sinamat dan turunannya dengan beberapa protein target penyebab resistensi *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*?
2. Bagaimana prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa asam sinamat dan turunannya?
3. Bagaimana gambaran dinamika molekul senyawa asam sinamat dan turunannya dengan beberapa protein target penyebab resistensi *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*?
4. Bagaimana menentukan aktivitas senyawa asam sinamat dan turunannya sebagai anti pompa efflux secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Menganalisis afinitas dan model interaksi senyawa asam sinamat dan turunannya dengan beberapa protein target penyebab resistensi *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*.
2. Memprediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa asam sinamat dan turunannya.
3. Memberikan gambaran dinamika molekul senyawa asam sinamat dan turunannya dengan beberapa protein target penyebab resistensi *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*.
4. Menentukan aktivitas senyawa asam sinamat dan turunannya sebagai anti pompa efflux secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Dengan menggunakan prediksi *in silico* dan *in vitro*, penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi dan mengembangkan ilmu pengetahuan terutama dibidang ilmu farmasi dengan menawarkan terapi tambahan dengan antibiotik untuk mengatasi resistensi antibiotik.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian *in silico* dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan penelitian *in vitro* akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang dimulai bulan Februari 2024 sampai dengan November 2024.

2.2 Alat dan Bahan

1. Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah perangkat keras berupa PC dengan spesifikasi: AMD Ryzen 7 5800X 8-Core Processor @ 3.80 GHz, RAM 32,00, 64-bit *Operating system*, Autodock Vina, Chem Draw, USFC Chimera, BIOVIA *Discovery Studio Visualizer*, dan Yasara Structure, dan pkCSM *Online Tools*. Alat pengujian observatif meliputi, 96-well microplate (Nest®), Autoclav (All American model 25x-2®), Cawan petri (OneMed®), Cotton Swab Steril (OneMed®), Elisa Reader (ThermoScientific), Bio-Rad Gel Doc XR, Inkubator (Mettler®), Laminar air flow (Enviroco®), Lemari pendingin (Pannasonic®), Mikro pipet (FisherBrand®), Oven (Mettler®), dan Timbangan analitik (ACIS Model AD 6001®).

2. Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Alkohol 70%, Air steril, biakan murni *Acinetobacter baumannii* dan *Staphylococcus aureus*, etidium bromida, ephendorf, media MHA (Mueller-Hinton Agar), media MacConkey Agar, media MSA (Mannitol Salt Agar), media TSB (Tryptic Soy Broth), NaCl 0,9%, senyawa asam sinamat dan turunannya (*p-coumaric acid*, *caffeic acid*, *trans-4-methoxycinnamic acid*, *3,4-dimethoxycinnamic acid*, *4-bromocinnamic acid*, *4-chlorocinnamic acid*, *4-fluorocinnamic acid*, *4-nitrocinnamic acid*, *4-methylcinnamic acid*), serta protein target dengan kode PDB: *A. baumannii* (7KGG, 5WS4), *S.aureus* (7LO7, 5C6N).

2.3 Metode Kerja

1. Analisis *Molecular Docking*

Struktur ligan dibuat menggunakan aplikasi Chem Draw. Struktur kristal protein target diunduh dari protein data bank (<https://www.rcsb.org/>) dengan kode PDB: *A. baumannii* (7KGG, 5WS4), *S.aureus* (7LO7, 5C6N). UCSF-Chimera yang terhubung dengan Autodock Vina digunakan untuk melakukan *molecular docking*. Tahap pertama dimulai dari preparasi struktur ligan dan protein dengan menggunakan menu *dock-prep*. Selanjutnya dilakukan proses docking dengan menentukan *grid-box* dan



Optimized using
trial version
www.balesio.com

n file melalui menu Autodock Vina. Adapun visualisasi hasil menggunakan aplikasi Biovia Discovery Studio Visualisizer (Butt

molecular Dynamic

eks dari hasil konformasi terbaik pada tahap penambatan lebih lanjut menggunakan simulasi dinamika molekuler pada YASARA Structure (YASARA Bioscience GmbH, Wina, Austria)

(Land & Humble, 2018). Medan gaya yang digunakan adalah Amber14 dalam kondisi batas periodik (J. Wang et al., 2004). Kompleks diatur pada suhu 310 K dan pH 7,4. Pelarut TIP3P (Mark & Nilsson, 2001) dan counterion (Na^+ , Cl^-) ditambahkan untuk menetralkan sistem. Kemudian, sistem dijalankan selama 100 ns pada rentang waktu 0,25 fs. Data lintasan dikumpulkan setiap 25 ps dan digunakan untuk menganalisis deviasi kuadrat rata-rata (RMSD), fluktuasi kuadrat rata-rata (RMSF), dan jari-jari putaran.

3. Prediksi ADMET

Prediksi sifat fisikokimia dan toksisitas senyawa turunan asam sinamat yang dilakukan menggunakan web server pkCSM online tools (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) yang akan diklasifikasikan ke dalam *Lipinski Rule of Five* (Shil et al., 2023)

4. Pengujian Aktivitas Anti-Pompa Efflux

4.1 Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci dengan deterjen, kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan. Alat-alat gelas disterilkan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Untuk alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan dengan menggunakan bunsen dan alat-alat yang terbuat dari karet dan plastik serta alat-alat ukur disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

4.2 Pembuatan Medium

Media Mueller-Hinton Agar (MHA). Ditimbang medium MHA sebanyak 3,4 gram, masukkan ke dalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan air steril 100 mL, diaduk, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media Tryptic Soy Broth (TSB). Ditimbang medium TSB sebanyak 6 gram, masukkan ke dalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan air steril 200 mL, diaduk, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media MacConkey Agar. Ditimbang medium MacConkey sebanyak 9,9 gram, masukkan ke dalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan air steril 200 mL, diaduk, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media Mannitol Salt Agar. Ditimbang medium Mannitol Salt Agar sebanyak 11,1 gram, masukkan ke dalam erlenmayer, kemudian dilarutkan dengan air steril 100 mL, diaduk, selanjutnya disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit

4.3 Penyiapan Bakteri Uji

Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Acinetobacter baumannii* dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Kedua strain disimpan pada suhu 4°C dan disubkultur pada media agar sebelum dilakukan



eri dibuat dengan menumbuhkan *A. baumannii* pada media 1 MRSA pada Mannitol Salt Agar (MSA), kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, suspensi bakteri uji disiapkan hingga kekeruhan hingga setara dengan standar 0,5 Mc Farland atau dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/mL.

Larutan Uji

Senyawa asam sinamat dan turunannya, omeprazole serta antibiotik meropenem dan antibiotik cefoxitin, dibuat sebagai larutan stok dengan konsentrasi 6400 µg/mL, dengan cara melarutkan 6,4 mg senyawa asam sinamat dan turunannya ke dalam 1 ml DMSO 100%.

4.5 Checkerboard Assay

Larutan stok asam sinamat dan turunannya disiapkan dan diambil 1 µL lalu diencerkan secara serial dalam media Tryptic Soy Broth (TSB) menggunakan metode dilusi dua kali lipat untuk menghasilkan serangkaian konsentrasi awal, yaitu 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 µg/mL. Prosedur serupa diterapkan pada antibiotik meropenem (untuk *Acinetobacter baumannii* dengan target protein AdeB efflux pump) dan cefoxitin (MRSA dengan target protein NorA efflux pump), yang juga diencerkan secara serial dalam media TSB untuk memperoleh rentang konsentrasi yang sama. Selanjutnya, dilakukan inokulasi pada microplate 96-well, dimana 50 µL larutan meropenem atau cefoxitin ditambahkan ke setiap baris dengan konsentrasi yang menurun secara horizontal, sementara 50 µL larutan asam sinamat dan turunannya ditambahkan ke setiap kolom dengan konsentrasi yang menurun secara vertikal. Dengan cara ini, setiap kolom dan baris didalam microplate memiliki konsentrasi yang bervariasi, sehingga memungkinkan pengujian interaksi antara asam sinamat dan turunannya, antibiotik dan bakteri dengan berbagai konsentrasi. Setelah penambahan larutan, 100 µL suspensi bakteri *A. baumannii* atau MRSA yang telah diencerkan (dengan perbandingan 1:100) ditambahkan ke setiap sumur dalam microplate dan menghasilkan serangkaian konsentrasi akhir, yaitu 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0 µg/mL. Konsentrasi akhir bakteri dalam setiap sumur setelah penambahan suspensi tersebut adalah sekitar $7,5 \times 10^5$ CFU/mL. Microplate tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah periode inkubasi, pengukuran kepadatan optik (OD) dilakukan pada panjang gelombang 620 nm. Hasil pengukuran kemudian dianalisa dengan menggunakan software *combeneft* untuk menentukan sinergitas/antagonism dari kombinasi obat (Ajiboye et al., 2018; Sultan et al., 2021).

4.6 Efflux Pump Inhibitory Assay

Uji penghambatan pompa efflux dilakukan untuk memeriksa aktivitas penghambatan pompa efflux dari asam sinamat dan turunannya. Isolat *Acinetobacter baumannii* dikultur semalam pada media MacConkey, sementara *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dikultur pada media Mannitol Salt Agar (MSA). Setelah 18-20 jam inkubasi, kultur bakteri disiapkan dengan membuat larutan McFarland 0,5 untuk mendapatkan konsentrasi standar bakteri. Media Mueller-Hinton Agar (MHA) 100mL disiapkan dengan menambahkan Etidium Bromida 1% sebanyak 1 mL untuk mendeteksi aktivitas pompa efflux, selanjutnya dituang ke



wan petri lalu ditunggu hingga memadat. Kultur bakteri yang sudah jadi diusapkan menggunakan cotton swab steril ke dalam HA+EtBr yang telah dipersiapkan. Setelah inokulasi, larutan senyawa asam sinamat dan turunannya diteteskan pada media sama dengan omeprazole sebagai kontrol positif dan DMSO 1% negatif. Cawan petri yang telah diberi perlakuan kemudian diinkubasi selama 16-24 jam. Setelah inkubasi, cawan petri diperiksa di bawah

sinar UV menggunakan perangkat gel documentation system (gel doc). Hasil yang menunjukkan cincin fluoresensi di sekitar zona penghambatan dianggap sebagai indikasi adanya penghambatan aktivitas pompa efflux, yang mengindikasikan bahwa senyawa yang diuji berhasil menghambat aktivitas pompa efflux bakteri (Asim et al., 2024; Chowdhury et al., 2019; Sepehr et al., 2022).

