

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK KUDA (*Ipomoea pes caprae*) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA IN VITRO DAN IN SILICO**

ANTIBIOFILM ACTIVITY OF TAPAK KUDA (*Ipomoea pes caprae*) AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* and *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA): IN-VITRO AND IN-SILICO EVALUATION.



Oleh :  
Nur Hasfiana Baktiar  
H072211002

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
SEKOLAH PASCASARJANA  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR  
2023**

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK KUDA (*Ipomoea pes caprae*)  
SEBAGAI ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Methicillin-*  
*Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA  
IN VITRO DAN IN SILICO**

Tesis

Sebagai Salah Satu Syarat untu Mencapai Gelar Magister

Program Studi Biologi

Disusun dan diajukan oleh

**NUR HASFIANA BAKTIAR**

**H072211002**

Kepada

**PROGRAM MAGISTER BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS HASANUDDIN  
MAKASSAR**

**2023**

**TESIS**

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN TAPAK KUDA (*Ipomoea pes caprae*)  
SEBAGAI ANTIBIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Methicillin Resistant  
Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA IN VITRO DAN IN SILICO**

**NUR HASFIANA BAKTIAR**

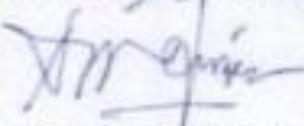
**NIM. H072211002**

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Magister Program Studi Magister Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Universitas Hasanuddin  
Pada tanggal 02 Agustus 2023  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui

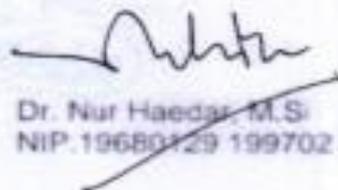
ii

Pembimbing Utama



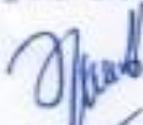
Prof. Dr. Dirayah R. Husain, DEA  
NIP. 19600525 198601 2 001

Pembimbing Pendamping



Dr. Nur Haedar, M.Si  
NIP. 19680129 199702 2 001

Ketua Program Studi  
Magister Biologi



Dr. Juhan, M.Si  
NIP. 19631231 198810 2 001

Dekan Fakultas Matematika dan  
Ilmu Pengetahuan Alam



Dr. Amruddin, M.Si  
NIP. 19720515 199702 1 002

### PERNYATAAN KEASLIAN TESIS

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Nur Hasfiana Baktiar  
Nomor Pokok : H072211002  
Program Studi : Biologi

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tesis yang saya tulis ini merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan dan pemikiran orang lain. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa Sebagian atau keseluruhan isi tesis ini merupakan hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 30 November 2023

Yang menyatakan



Nur Hasfiana Baktiar

## KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahiim

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah swt yang telah memberikan segenap kekuatan, kesehatan, dan keteguhan serta semua nikmat tak hingga, sehingga penulisan tesis dengan judul Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*) Sebagai Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara In Vitro Dan In Silico dapat terselesaikan sebagaimana mestinya. Pada penyusunan tesis ini penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan, olehnya itu penulis mengharapkan koreksi dan kritikan membangun dari semua pihak demi kesempurnaannya. Ucapan tulus dan rasa terimakasih yang begitu besar penulis persembahkan kepada orang tua penulis tercinta Ayahanda Alm. Hanafi Baktiar dan Ibunda Almh. Salumah yang senantiasa mendidik dan membesarkan penulis dengan doa tulus yang terus mengalir hingga saat ini serta ananda Faiqha Ramadhani dan Raja Abdullah Syabani menjadi penyemangat dalam perjalanan menyelesaikan studi pascasarjana yang ditempuh penulis.

Terimakasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dirayah Rauf Husain, DEA dan Ibu Dr. Nur Haedar M,Si selaku pembimbing pertama dan pembimbing kedua yang telah banyak mengasuh, meluangkan waktu, tenaga dan pikiran dalam mengarahkan dan membimbing penulis selama proses penyelesaian tugas akhir

Pada kesempatan ini pula tidak lupa penulis menyampaikan terima kasih yang tulus kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc selaku Rektor Universitas Hasanuddin
2. Bapak Dr. Eng. Amiruddin, M.Si selaku Dekan Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar
3. Ibu Dr. Juhria, M.Si selaku Ketua Program Studi Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam Program Pascasarjana Universitas Hasanuddin Makassar.

4. Ibu Prof. Dr. Sjafaraenan, M.Si., Dr.Eva Johannes, M.Si., Dr. Zaraswati Dwyana, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan kritikan dan arahan yang membangun kepada penulis selama proses penyelesaian tugas akhir.
5. Kepada seluruh dosen dan staf Biologi Fakultas MIPA dan Program Pascasarjana untuk semua pelayanan dan fasilitas yang telah diberikan selama penulis menuntut ilmu.
6. Kepada keluarga besar bpk Hj. Samiun, ibu Hj. Siti Rukiyah, Kakak Safruddin, sahabat saya Marni Ipaenin Terima kasih atas doa, motivasi dan sumbangan materinya selama penulis melaksanakan studi.
7. Seluruh pihak dan teman-teman pascasarjana angkatan 2021 yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu terimakasih atas dukungan bantuannya penulis dapat menyelesaikan tesis ini .

Akhirnya penulis mengucapkan banyak terimakasih atas kebaikan semua pihak dalam membantu demi terselesainya tesis ini. Semoga tesis ini dapat memberikan banyak manfaat dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya bidang ilmu biologi baik di masyarakat maupun Perguruan Tinggi.

Makassar, Agustus 2023

Nur Hasfiana Baktiar

## ABSTRAK

**Nur Hasfiana Baktiar.** Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*) Sebagai Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara In Vitro Dan In Silico. (Dibimbing oleh **Dirayah R. Husain** dan **Nur Haedar**)

Daun Tapak Kuda (*Ipomea pes caprae*) merupakan salah satu tanaman herbal yang dapat mengobati berbagai gangguan kesehatan seperti infeksi kulit, luka bakar, bisul, dan berbagai penyakit akibat infeksi mikroba. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) dan mengevaluasi aktivitas antibiofilmnya melalui uji in-vitro dan in-silico. Penelitian ini menggunakan dua bakteri uji yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus*. Aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar dan antibiofilm menggunakan microplate reader. Aktivitas biologis senyawa tersebut juga dievaluasi secara komputasi menggunakan aplikasi molekuler docking. Studi uji in vitro menunjukkan aktivitas antibakteri pada *Pseudomonas aeruginosa* dan MRSA dengan konsentrasi 100 mg/mL menunjukkan zona hambat kuat 13,9 mm dan sedang dengan zona hambat 8,5 mm. Penelitian Antibiofilm dengan nilai *optical density* dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan MRSA adalah 0,396 dan 0,494, dengan persentase penghambatan biofilm tertinggi sebesar 82,58% dan 78,29%. Molekular docking menunjukkan adanya interaksi antara senyawa ekstrak dengan makromolekul yang berperan dalam pembentukan biofilm yaitu Phenazine biosynthesis protein PhzD2 dan *Biofilm associated protein*. 1,2,3,4 Butanetetrol -5,6, Kkal/Mol, Phenol 2- Methoxy-3-(2-Propenyl) -5,7Kkal/Mol dan benzeneacetic acid -5,9 Kkal/Mol, memiliki ikatan energi terendah pada setiap reseptor target. Studi ini menunjukkan potensi antibiofilm dari ekstrak daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) yang diperlihatkan melalui studi penambatan molekuler docking.

Kata kunci : Daun Tapak Kuda, Biofilm, Antibakteri, In-silico

## ABSTRACT

**Nur Hasfiana Baktiar.** Antibiofilm Activity of Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*) against *Pseudomonas aeruginosa* and *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA): In-Vitro and In-Silico Evaluation. (Supervised by **Dirayah R. Husain** dan **Nur Haedar**)

Leaf Tapak Kuda (*Ipomea pes caprae*) is one of the herbal plants that can treat various health problems such as skin infections, burns, boils, and various diseases caused by microbial infections. This study aims to identify ethanol extract compounds of leaf tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) and evaluate their antibiofilm activity through in-vitro and in-silico assays. This study used two test bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Antibacterial activity is carried out using the agar diffusion method and antibiofilm using a microplate reader. The biological activity of the compound was also evaluated computationally using molecular tethering applications using Vina auto dock. In vitro test studies showed antibacterial activity in *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA with a concentration of 100 mg/mL showing a strong inhibitory zone of 13.9 mm and medium with an inhibitory zone of 8.5 mm. Antibiofilm research with optical density values from both *Pseudomonas aeruginosa* and MRSA bacteria is 0.396 and 0.494, with the highest percentage of biofilm inhibition of 82.58% and 78.29%. Molecular docking shows the interaction between extract compounds and macromolecules that play a role in biofilm formation, namely Phenazine biosynthesis protein PhzD2 dan *Biofilm associated protein*. 1,2,3,4 Butanetetrol -5,6, Kkal/Mol, Phenol 2- Methoxy-3-(-2-Propenyl) -5,7Kkal/Mol dan benzeneacetic acid -5,9 Kkal/Mol at each target receptor. This study demonstrated the antibiofilm potential of leaf Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*) extract, which was clarified through molecular docking studies.

Keywords: *Ipomoea pes caprae*, Biofilm, Antibacterial, In-silic

## DAFTAR ISI

KATA PENGANTAR .....	i
ABSTRAK.....	iii
ABSTRACT .....	iii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL.....	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tinjauan Umum Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoes pes caprae</i> ).....	5
2.1.1 Senyawa Bioaktif Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoes pes caprae</i> ) .....	6
2.1.2 Aktivitas Antimikroba Senyawa Fenolik Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoea pes caprae</i> ) .....	11
2.1.3 Target Dan Mekanisme Pembentukan Biofilm .....	11
2.1.4 Deteksi Pembentukan Biofilm.....	16
2.2 Tinjauan Umum Mikroba .....	19
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	19
2.2.2 <i>Methicillin Resistant Staphyococcus aureus</i> (MRSA).....	20
2.3 Metode Ekstraksi.....	22
2.4 Identifikasi Senyawa Dengan Kromatografi .....	23
2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	23
2.4.2 KLT Bioautografi.....	24
2.4.3 Kromatografi Gas Spektrometer Massa (GC-MS) .....	24
2.5 Analisis In Silico .....	25
2.6 Molekuler Docking.....	25
2.7 Kerangka Pikir.....	27
2.8 Alur Penelitian .....	28
BAB III METODE PENELITIAN.....	29
3.1 Rancangan Penelitian .....	29
3.2 Waktu Dan Lokasi Penelitian.....	29

3.3	Bahan Dan Alat .....	29
3.4	Populasi Dan Sampel .....	29
<b>DAFTAR ISI</b>		
3.5	Prosedur Kerja .....	30
3.5.1	Pengambilan Sampel.....	30
3.5.2	Pembuatan Ekstraks.....	30
3.5.3	Uji Aktivitas Antibakteri .....	30
3.5.4	Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm .....	31
3.7	Uji Fitokimia Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoea pes caprae</i> ).....	32
3.7.1	Kromatografi Lapis Tipis (KLT) .....	32
3.7.2	KLT Bioautografi.....	32
3.7.3	Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS).....	32
3.9	Molekuler Docking.....	32
3.10	Analisis Data .....	34
BAB IV HASIL PENELITIAN .....		35
4.1	Hasil .....	35
4.1.1	Hasil Determinasi Tanaman.....	35
4.1.2	Hasil Uji Antibakteri .....	36
4.1.3	Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm.....	39
4.2	Uji Fitokimia Daun Tapak Kuda .....	42
4.2.1	Kromatografi Lapis Tipis .....	42
4.2.2	Uji KLT Bioautografi.....	44
4.2.3	Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS).....	45
4.3	Molekuler Docking.....	47
BAB V PENUTUP .....		58
DAFTAR PUSTAKA.....		58
LAMPIRAN .....		69

## DAFTAR TABEL

1. Tabel 1 Interpretasi Metode Tabung .....	17
2. Tabel 2 Interpretasi Cango Red Agar .....	18
3. Tabel 3 Kategori Diameter Zona Hambat .....	31
4. Tabel 4 Hasil Determinasi Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoea pes caprae</i> ) .....	35
5. Tabel 5 Diameter Zona Hambat <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> .....	37
6. Tabel 6 Hasil Pengamatan KLT Secara Visual .....	42
7. Tabel 7 Hasil Uji GC-MS Dengan Nilai Retensi Time Dan Luas Area .....	46
8. Tabel 8 Nilai Avinity Energi Pengikatan (Binding Avinity) .....	48
9. Tabel 9 Analisis Lipinski Rule of live .....	55

## DAFTAR GAMBAR

1	Gambar 1 Daun Tapak Kuda ( <i>Ipomoea pes caprae</i> ) .....	5
2	Gambar 2 Struktur Flavonoid.....	7
3	Gambar 3 Struktur Alkaloid.....	9
4	Gambar 4 Struktur Tanin .....	10
5	Gambar 5 Struktur Antosianin.....	11
6	Gambar 6 Pembentukan Biofilm .....	13
7	Gambar 7 Gambar Representatif Dari Seluruh Komponen Matrix Biofilm Bakteri Gram Negatif Dan Gram Positif .....	15
8	Gambar 8 Target Nanogel Carbol Pada Biofilm Bakteri.....	16
9	Gambar 9 Metode Tabung .....	17
10	Gambar 10 Metode Congo Red Agar .....	18
11	Gambar 11 Metode Plate Kultur Jaringan.....	19
12	Gambar 12 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Yang membentuk biofilm dan setelah 24 jam diobati dengan 1,0 ml minyak kayu putih .....	20
13	Gambar 13 Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> yang membentuk biofilm dan setelah 24 jam diobati dengan 1,0 ml minyak kayu putih .....	21
14	Gambar 14 Molekuler Docking .....	26
15	Gambar 15 Kerangka Pikir .....	27
16	Gambar 16 Skema Alur Penelitian.....	28
17	Gambar 17 Zona hambat <i>pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Methicillin</i> <i>resistant staphylococcus aureus</i> .....	36
18	Gambar 18 Hasil optikal density (OD) penghambatan ekstrak daun tapak kuda ( <i>Ipomoea pes caprae</i> ) terhadap biofilm <i>pseudomonas aeruginosa</i> dan MRSA.....	39
19	Gambar 19 Persentasi aktivitas penghambatan ekstrak daun tapak kuda terhadap <i>pseudomonas aeruginosa</i> dan MRSA .....	40
20	Gambar 20 Hasil UV KLT ekstrak daun tapak kuda.....	43
21	Gambar 21 Uji KLT Bioautografi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dan <i>Methicillin</i> <i>Resistant Staphylococcus aureus</i> .....	44
22	Gambar 22 Hasil GC-MS ekstrak etanol daun tapak kuda.....	45
23	Gambar 23 visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 1,2,3,4,5-Tetrahydroxy-Cyclohexanecarboxylic Acid, makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	50

24	Gambar 24. visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 2-Cyclohexen-1-One, 4-(3-Hydroxy-1-Butenyl)-3,5,5-Trimethyl-, [R-[R,, makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	50
25	Gambar 25 visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 3-Hydroxy-beta-damascon, makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	51
26	Gambar 26 visualisasi 3D Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand <i>Phenol, 2-Methoxy-3-(2-Propenyl)</i> , makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	51
27	Gambar 27 (a): visualisasi 3D, (b): Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 1,2,3,4 Butaneterol makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	52
28	Gambar 28 (a): visualisasi 3D, (b): Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand Ciprofloxacin makromolekul <i>Phenazine Biosynthesis Protein PhzD2</i> .....	52
29	Gambar 29 visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand C1,2,3,4,5-Tetrahydroxy-Cyclohexanecarboxylic Acid makromolekul Biofilm-associated surface.....	52
30	Gambar 30 (a): visualisasi 3D, (b): Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 2-Cyclohexen-1-One, 4-(3-Hydroxy-1-Butenyl)-3,5,5-Trimethyl-, [R-[R, makromolekul Biofilm-associated surface .....	53
31	Gambar 31 visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand <i>Phenol, 2-Methoxy-3-(2-Propenyl)</i> makromolekul Biofilm-associated surface .....	53
32	Gambar 32 visualisasi 3D Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand 1,2,3,4 Butaneterol makromolekul Biofilm-associated surface protein .....	53
33	Gambar 33 visualisasi 3D Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand Benzeneacetid acid makromolekul Biofilm-associated surface protein ....	54
34	Gambar 34 visualisasi 3D, Visualisasi 2D interaksi Senyawa ligand Ciprofloxacinacid makromolekul Biofilm-associated surface protein .....	54

## DAFTAR SINGKATAN

cm (centimeter)

DNA (Deosiribonukleat acid)

EPS (Eksopolisakarida)

GC-MS ( Gas Chromatography-Mass Spectrometry)

KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

LPS (Lipopolisakarida)

mg (Miligram)

MHA (Muler Hinton Agar)

mL (Mililiter)

MRSA (*Methicilin Resisten Staphylococcus aureus*)

m (meter)

NA (Natrium Agar)

OD (Optical Density)

PBP (Penicilin Binding Protein)

(PBS) Phosphate Buffer Saline

Rf (Retensi Faktor)

TA (Asam Teikoat)

TSB (Trypticase Soy Broth)

μL (Mikroliter)

UV (Ultra Violet)

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Hasil Uji Antibakteri

Lampiran 2 Hasil Uji Penghambatan Biofilm

Lampiran 3 Hasil Uji KLT

Lampiran 3 Hasil Uji GCMS

Lampiran 4 Hasil Uji Molekuler Docking

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Pengobatan herbal dewasa ini telah banyak digunakan oleh masyarakat dalam mengatasi berbagai masalah kesehatan. Obat herbal yang digunakan telah ditemukan dari berbagai tumbuhan karena memiliki senyawa bioaktif dengan keuntungan dan kemanjuran terapeutik yang tinggi, sehingga penerimaan tanaman obat herbal semakin meningkat. Ini diakibatkan karena kemampuannya dalam mencegah dan mengobati masalah kesehatan dengan efek samping yang rendah. Menurut Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) penduduk negara berkembang memanfaatkan tanaman obat karena sulitnya mendapatkan obat resep. Terutama di daerah pedesaan telah menjadi satu-satunya akses kesehatan primer yang tersedia dengan biaya yang rendah jika dibandingkan dengan produk sintetik (Xavier-santos *et al.*, 2022)

Tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) mempunyai peranan penting yang mampu mengatasi berbagai masalah kesehatan. Tanaman ini memiliki kandungan senyawa fenolik yang dapat mengobati infeksi luka pada jaringan lunak, dalam penelitiannya (Xavier-santos *et al.*, 2022), daun tapak kuda mengandung senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin, antosianin yang di modifikasi dalam bentuk gel mampu mengobati penyakit kulit inflamasi dan penyembuhan luka. Penelitian lainnya menyebutkan senyawa fenolik daun tapak kuda memiliki efek pada sistem saraf pusat yang mampu melepaskan *oksidat nitrat* dari tapak kuda dan berkontribusi pada kontrol tekanan darah. Senyawa fenolik berfungsi sebagai antioksidan tinggi, yang merupakan dasar untuk mengendalikan keseimbangan fisiologis dan menghambat stres oksidatif (Manhães *et al.*, 2020). Tanaman ini telah digunakan di beberapa negara sebagai pengobatan berbagai penyakit seperti peradangan, gangguan pencernaan, nyeri, hipertensi dan penyakit ginjal (Akinniyi *et al.*, 2022) sedangkan di Indonesia telah menggunakan tanaman ini dalam mengobati sengatan ubur-ubur, bisul dan luka pada penderita diabetes (Linggar *et al.*, 2021). Di Maluku tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai obat herbal dalam mengobati penyakit infeksi kulit ringan sampai dengan yang membahayakan kesehatan berupa infeksi luka bakar dan luka diabetes. Selain itu daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) dimanfaatkan

oleh ibu-ibu yang baru selesai melahirkan dengan merebus daun tapak kuda dijadikan air mandi atau diminum sebagai obat tekanan darah.

Kulit merupakan organ kompleks dan lapisan luar terbesar tubuh manusia yang terpapar berbagai stres dan patogen. Kulit terdiri dari berbagai jenis sel yang bersama-sama melakukan fungsi penting seperti penginderaan patogen, pemeliharaan penghalang dan kekebalan, sekaligus memberikan garis pertahanan pertama melawan infeksi mikroba dan memastikan homeostasis kulit (Garcia *et al.*, 2017). Namun kulit dapat juga mengalami infeksi yang mudah di kolonisasi oleh bakteri. Terganggunya jaringan kulit umumnya disebut sebagai luka, kerusakan kulit dapat disebabkan oleh adanya trauma atau luka bakar, yang apabila tidak ditangani secara serius dapat menyebabkan infeksi pada jaringan kulit yang dapat disebabkan oleh bakteri bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* (Wijesinghe *et al.*, 2021)

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat menginfeksi jaringan kulit, Selain itu *Pseudomonas aeruginosa* mampu merusak organ tubuh lainnya seperti infeksi saluran kemih, infeksi gastrointestinal, dapat menjadi invasif, toksikogenik, dan *multidrug resistant* (MDR) (Kariminik *et al.*, 2017). Sedangkan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan suatu infeksi tidak dapat lagi diatasi dengan berbagai golongan antibiotik yang umum dipakai. MRSA tidak hanya dikenal sebagai bakteri yang banyak terdapat di Rumah Sakit namun MRSA dikalangan masyarakat telah meningkat diseluruh dunia (Algammal *et al.*, 2020). *Pseudomonas aeruginosa* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) telah sering diisolasi dari luka kronis yang terinfeksi, cystic fibrosis, otitis media supuratif kronis (OMSK), keduanya cenderung melakukan pembentukan biofilm untuk mempertahankan penyebarannya di dalam sel inang (Yadav *et al.*, 2017)

Biofilm adalah suatu kumpulan sel substrat mikroba yang melekat dan berkembang dengan sangat aktif dipermukaan, Sel nya dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang dapat membuat sel mikroba bertahan hidup pada lingkungan yang tidak menguntungkan sehingga mikroba menjadi resistensi. Kemampuan biofilm tersebut dapat tergantung pada komposisi media pertumbuhan, pH dan faktor biologis lainnya. Adapun tahapan dalam pembentukan biofilm yaitu perlekatan, pembentukan matriks pada permukaan sel bakteri dan penyebaran (Ramadan *et al.*, 2017)

Pembentukan biofilm menjadi sangat aktif sehingga menyebabkan patogen pada manusia dan dapat menyebabkan infeksi kronis yang membahayakan kesehatan tubuh (Bi *et al.*, 2021). Biofilm merupakan dasar dari berbagai infeksi jaringan dan implan. Penyebaran biofilm dapat menyebabkan karies gigi, periodontitis, otitis media, sinusitis kronis, perubahan luka kronis, infeksi muskuloskeletal (osteomielitis), infeksi saluran empedu, prostatitis bakteri, endokarditis katup asli, dan infeksi terkait perangkat medis (Tuon *et al.*, 2022)

Kemajuan dalam bidang Sains Biologi telah membuka beberapa jalan baru untuk pengembangan obat herbal yang ditargetkan dari senyawa yang potensial. Eksperimen yang dilakukan melalui uji *in vitro* menggambarkan adanya kesinambungan antara senyawa kimia yang didapat dari tanaman terhadap mikroorganisme (Puvača *et al.*, 2021) dan uji *in silico* adalah uji yang memanfaatkan teknik skrining virtual atau metode komputasi yang digunakan untuk mensimulasikan penemuan dan pengembangan obat-obatan (Vanhaelen *et al.*, 2017)

Berdasarkan latar belakang diatas maka dilakukan penelitian dengan menggunakan bahan alam sebagai penghasil antibiofilm dengan penelitian yang berjudul Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Tapak Kuda (*Ipomea pes caprae*) Sebagai Antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Methicillin Resisten Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara *In Vitro* Dan *In Silico*

## 1.2 Rumusan Masalah

Adapun rumusan masalah dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Apakah ekstrak etanol daun tapak kuda memiliki aktivitas antibakteri terhadap patogen *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?
2. Apakah ekstrak etanol daun tapak kuda memiliki aktivitas antibiofilm terhadap patogen *Pseudomonas aeruginosa* Dan *Methicillin resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?
3. Komponen senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomea pes caprae*)
4. Menganalisis mekanisme aktivitas antibiofilm pada pengikatan ligan senyawa ekstrak etanol daun tapak kuda terhadap reseptor Penicilin Binding Protein (PBP) dalam dinding sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan

*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) berdasarkan analisis molekuler docking.

### 1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pescapare*) memiliki aktivitas antibakteri bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)
2. Mengetahui ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pescapare*) memiliki aktivitas antibiofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)
3. Mengetahui komponen senyawa kimia yang terkandung didalam ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*)
4. Mengetahui mekanisme aktivitas antibiofilm pada pengikatan ligan senyawa ekstrak etanol daun tapak kuda terhadap reseptor Penicilin Binding Protein (PBP) dalam dinding sel bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) berdasarkan analisis molekuler docking.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Diharapkan senyawa bioaktif yang dihasilkan dari ekstrak etanol daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) dalam menghambat biofilm bakteri *Pseudomona aeruginosa* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dapat dimanfaatkan sebagai obat herbal secara global.
2. Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Umum Daun Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*)

Tapak kuda merupakan tanaman yang liar yang tumbuh di sepanjang pesisir pantai berpasir, terdapat di daerah tropis dan subtropis. daunnya lebar dengan bunga berwarna ungu menjadikan daun ini mudah ditemukan, selain dimanfaatkan sebagai obat herbal daun ini juga mempunyai manfaat yang unik yaitu menahan pengikisan pesisir dari pasangunya air laut (Zheng *et al.*, 2018)

Berikut merupakan klasifikasi daun tapak kuda (*Ipomoea pes caprae*) :

(Falahudin *et al.*, 2020)

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Salonales
Famili	: Convolvulaceae
Genus	: Ipomea
Spesies	: <i>Ipomea pes caprae</i> L. sweet



Gambar 1. Daun Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*)

Tumbuhan yang merupakan family Convolvulaceae memiliki ukuran daun yang tebal dengan panjang 3 m dan diameternya 5 cm panjang yang tumbuh menjalar serta menyebar ke segala arah. Daunnya sederhana tersusun berselang-seling, berwarna hijau tua, bentuk daun dapat bervariasi tetapi biasanya ovate, orbicular, atau lonjong. Tangkai daun bervariasi panjangnya

mulai dari 2 hingga 15 cm. Memiliki bunga berwarna merah ungu berbentuk kerucut yang mekar disetiap musim panas dan gugur, buahnya bulat telur sampai pipih. Bijinya berbentuk bulat hingga segitiga, ditutupi dengan rambut tebal seperti beludru, dan panjangnya 1,5-2,5 cm (Akinniyi *et al*, 2022)

### **2.1.1 Senyawa Bioaktif Daun Tapak Kuda**

Daun tapak kuda memiliki kandungan metabolit sekunder, diantaranya, fenolik, alkaloid, flavonoid, tanin. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh (Xavier-santos *et al*, 2022) terdapat 18 senyawa fenolik dengan menunjukkan senyawa tinggi adalah senyawa asam neoklorogenik, klorogenat, dan asam isoklorogenik, dalam penelitiannya senyawa ini menjadi antiinflamasi kronis, antiinflamasi akut, anti iritasi, penyembuhan luka yang sangat efektif. Secara struktural senyawa fenolik mencakup sejumlah senyawa yang memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dapat bervariasi dari molekul sederhana hingga polimer kompleks asam fenolat, senyawa fenolik terdapat dalam bentuk bebas atau terkonjugasi dengan gula, asam dan biomolekul lain yang larut atau tidak larut dalam air (De Araújo *et al.*, 2021)

#### **1. Senyawa Fenolik**

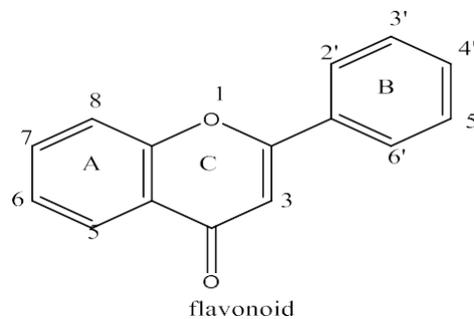
Senyawa fenolik merupakan kelompok terbesar yang dihasilkan dari tumbuhan berfungsi untuk melindungi pengaruh stres lingkungan. Dengan mempunyai beberapa fungsi yaitu sebagai pelindung terhadap sinar UV-B dan kematian sel untuk melindungi DNA dari kekeringan dan kerusakan. Komponen senyawa ini diketahui memiliki peranan penting sebagai agen pencegah dan pengobatan dari berbagai jenis penyakit ketegangan, kelelahan, kelemahan, nyeri, dan peradangan akibat sengatan, radang sendi, dan rematik, Gangguan usus seperti maag, disentri, dan kram, penyakit kulit seperti bisul, luka baring, dan dermatitis dan diabetes (Akinniyi *et al*, 2022)

Komposisi bioaktif senyawa fenolik diketahui seperti asam klorogenat menunjukkan aktivitas antikanker, antivirus, dan hepatoprotektif. Asam galat dikenal sebagai antimikroba, antimalaria, antiinflamasi, antitumor, dan efek neuroprotektif. Catechin mengandung sifat antiplak, antivirus, hipotensi, hipoglikemik, dan antikanker (Qasim *et al.*, 2017) Beberapa mekanisme aktivitas antibakteri fenolik yaitu dapat berinteraksi dengan protein bakteri dan struktur dinding sel, menghambat sintesis asam nukleat sehingga menyebabkan kerusakan membran sitoplasma, sintesis dinding sel, atau metabolisme energi. Penelitian lain aktivitas antibiofilm terdapat juga aktivitas yang mengarah pada

penekanan biofilm. hal ini dilakukan dengan mempengaruhi mekanisme pengaturan bakteri seperti quorum sensing atau system pengatur global lainnya yang menyebabkan adanya efek pertumbuhan bakteri (Daglia, 2012)

## 2. Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan senyawa fenolik yang mempunyai fungsi melindungi kulit dan otak gula darah dan regulasi tekanan darah, flavonoid terdapat hampir di semua bagian tumbuhan seperti akar, kulit tepung sari, nectar, bunga, buah dan biji (Nur *et al.*, 2018). Selain aktivitas antioksidan dan anti-inflamasi, flavonoid terdiri dari dua cincin benzene yang diikat oleh rantai pendek tiga karbon. Berikut struktur flavonoid terdiri dari enam kelas (Bakoyiannis *et al.*, 2019)



Gambar 2. Struktur Flavonoid

- a. Anthocyanidins (cyanidin, delphinidin, malvidin, peonidin, petunidin dll)
- b. flavan-3-ols (catechin, epicatechin, gallic acid dll)
- c. flavonol (isorhamnetin, kaempferol, myricetin, quercetin)
- d. flavon (misalnya apigenin, luteolin, baicalein, chrysin)
- e. flavanon (eriodictyol, hesperetin, naringenin)
- f. isoflavone (daidzein, genistein, glycitein, biochanin)

Studi lain mengemukakan bahwa dalam mengkonsumsi makanan yang mengandung flavonoid dapat memberikan manfaat bagi kesehatan dalam mengatasi risiko kematian dini. Konsumsi makanan yang kaya flavonoid dalam jangka panjang memberikan manfaat kesehatan bagi individu dengan faktor risiko kematian dini (Qasim *et al.*, 2017). Selain itu beberapa penelitian telah mengatakan asupan flavonoid dengan peningkatan perilaku dan kognisi, penurunan peradangan saraf dan pelemahan stres oksidatif, senyawa ini berperan penting pada proliferasi dan kelangsungan hidup neuron

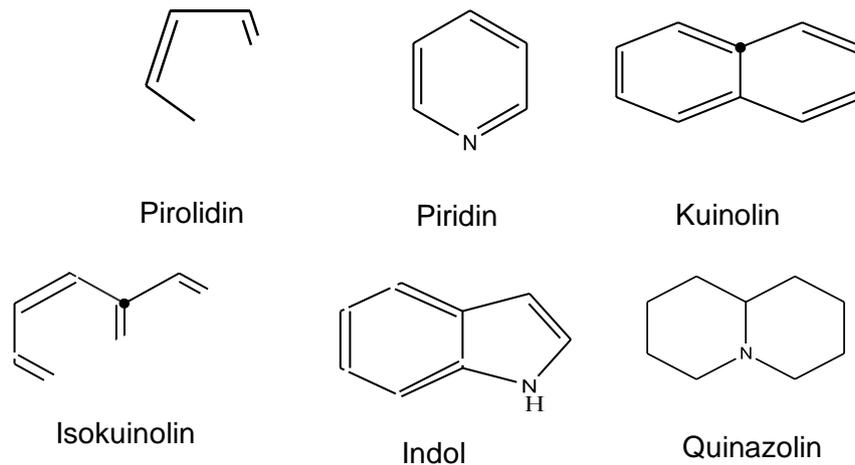
(ERK/CREB/BDNF dan PI3K)/Akt) dan dengan demikian melemahkan gejala terkait Alzheimer (De Araújo *et al.*, 2021)

Senyawa flavonoid telah memberikan dampak positif pada berbagai jenis fungsi kognitif melalui berbagai mekanisme molekuler, misalnya, luteolin telah ditemukan untuk meningkatkan ketebalan lapisan piramidal CA1 hipokampus, sementara flavonoid lain, seperti myricetin, telah dikaitkan dengan peningkatan ketebalan CA3 dan promosi perlindungan saraf, anti-oksidan, anti-apoptosis dan anti-inflamasi dari flavonoid (Bakoyiannis *et al.*, 2019)

### 3. Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa alami yang mengandung atom nitrogen terbagi menjadi alkaloid sejati, alkaloid poliamina, pseudo alkaloid, alkaloid peptide dan siklopeptida mempunyai aktivitas dalam proses penyembuhan luka. Mekanisme lain yang diamati termasuk pengurangan kolesterol total, trigliserida, pelemahan aktivitas glukosa-6-fosfatase dan peningkatan kandungan glikogen hati. Salah satu senyawa metabolit sekunder dengan keaneragaman strukturnya, penyebarannya di alam serta mempunyai aktivitas biologisnya yang sangat penting. Alkaloid adalah salah satu golongan senyawa organik yang terbanyak ditemukan di alam (Emeka & Uzoma, 2018).

Alkaloid merupakan merupakan golongan senyawa metabolit sekunder yang bersifat basa dengan atom nitrogen yang umumnya berada dalam gabungan system siklik. Ditemukan bahwa 20% spesies tumbuhan mengandung alkaloid. Orang kuno menggunakan ekstrak tumbuhan yang mengandung alkaloid untuk mengobati sejumlah besar penyakit termasuk: gigitan ular, demam, dan kegilaan (Roy, 2017). Golongan senyawa ini biasanya memiliki aktivitas farmakologis pada manusia dan hewan. Ciri-ciri alkaloid umumnya berbentuk padat (kristal), berasa pahit, bentuk garam larut dalam air dan larut dalam pelarut organik dalam bentuk bebas atau basanya, sejumlah alkaloid telah diisolasi mempunyai fungsi sebagai antitumor dan sitotoksik (N. Nwodo *et al.*, 2015). Klasifikasi alkaloid adalah adanya atom nitrogen dasar pada setiap posisi dalam molekul, misalnya, pada alkaloid tanaman yang terkenal termasuk analgesik narkotika, morfin dan kodein, apomorfin (turunan dari morfin) yang digunakan pada penyakit parkinson, papaverin relaksan otot, dan agen antimikroba sanguinarine dan berberine. Kelas alkaloid tersusun atas pyrrolidine, pyridine, quinoline, isoquinoline, indole, quinazoline, steroidal, diterpenoid (Noureddine, 2018)



Gambar 3. Struktur Kimia Alkaloid

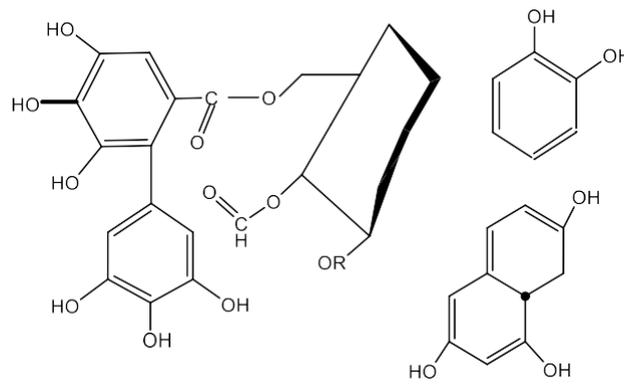
#### 4. Tanin

Tanin yang banyak terdapat pada tumbuh tumbuhan berupa rempah-rempah alami yang digunakan sebagai obat herbal tradisional mempunyai tiga kelas di antaranya :

1. Tanin terhidrolisis : asam galat
2. Tanin tidak terhidrolisis : flavon
3. Phlorotannins : phloroglucinol.

Tanin merupakan senyawa antioksidan yang banyak terdapat pada tanaman kacang-kacangan, biji-bijian dan tanaman daun hijau lainnya mempunyai kandungan asam tanat kuat dalam menghambat diferensiasi adiposity 3T3-L1 dan adipogenesis (Emeka & Uzoma, 2018). Tanin memiliki beberapa sifat seperti antidiare, antibakteri dan antioksidan. Mekanisme kerja tanin dalam menghambat bakteri dilakukan dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel bakteri dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan terhambatnya aktivitas dan biosintesa enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme dan kondisi ini yang pada akhirnya menyebabkan kematian pada bakteri (Saragih & Arsita, 2019)

Berdasarkan struktur dan sifatnya tanin memiliki sifat antimikroba yang sangat besar, terlihat bahwa struktur senyawa tannin terdiri dari cincin benzena (C6) yang berikatan dengan gugus hidroksil (-OH). Tanin memiliki peranan biologis yang besar karena fungsinya sebagai pengendap protein dan penghelat logam. Oeh karena itu tannin diprediksi dapat berperan sebagai antioksidan biologis berikut struktur kimia tanin: (Govindarajan *et al.*, 2016)



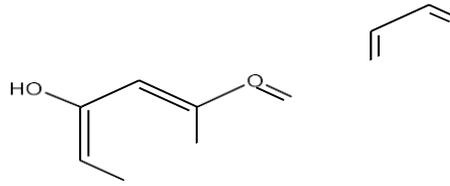
Gambar 4. Struktur Tanin

Secara umum tanin metabolit polifenol sekunder yang tersebar luas di kayu, kulit kayu, daun, buah, akar, dan biji, dan untuk banyak tanaman yang berbeda mereka melindungi terhadap infeksi dan serangga. Kompleksitas struktur, sifat, dan kimianya sangat tergantung pada asalnya, perannya dalam kehidupan tanaman, lokasi, dan vegetasi disekitarnya. Selain itu, tanin dapat ditemukan di hampir semua tanaman dan iklim di seluruh dunia (Grenda *et al.*, 2018)

#### 5. Antosianin

Antosianin merupakan senyawa tumbuhan turunan dari senyawa fenolik yang mempunyai fungsi memberikan pigmen tumbuhan sehingga tumbuhan akan terlihat berwarna merah, biru dan ungu (De Araújo *et al.*, 2021). Antosianin adalah glukosida dari antosianidin, turunan flavonoid yang diproduksi melalui jalur fenilpropanoid. Potensi bioaktif yang dimiliki senyawa ini memiliki kapasitas untuk melawan stres oksidatif, untuk bertindak sebagai zat antimikroba dan untuk melawan timbulnya dan perkembangan berbagai penyakit tidak menular seperti seperti neurodegeneratif, kardiovaskular, penyakit metabolik dan kanker (Mattioli, 2020).

Kelompok dari antosianin adalah pelargonidin, cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin dan malvidin (Lin *et al.*, 2017). Secara kimia, antosianin termasuk bebas gula dan antosianidinaglikon dan glikosida antosianin Struktur terglukosilasi dikenal sebagai antosianin, sedangkan yang tidak terglukosilasi adalah antosianidin. Tempat glukosilasi yang paling umum adalah posisi 3 di mana glukosa biasanya ditemukan sebagai gula tunggal, terutama untuk sianidin. Fungsi lain dari Antosianin mengurangi ekspresi neuropeptida Y, memodulasi nafsu makan dan asupan makanan, dan meningkatkan reseptor asam gamma-aminobutirat, mengurangi protein kinase Aalpha dan protein pengikat elemencAMP-respons terfosforilasi di hipotalamus, mengendalikan berat badan dan ukuran jaringan adiposa (Mozos *et al.*, 2021)



Gambar 5. Struktur Antosianin

### 2.1.2 Aktivitas Antimikroba Senyawa Daun Tapak Kuda (*Ipomoea pes caprae*)

Pada penelitian sebelumnya telah menjelaskan ekstrak dari fitokimia daun tapak kuda mengandung asam fenolat dengan analisis kuantitatif senyawa fenolik yang teridentifikasi pada ekstrak daun tapak kuda menunjukkan kandungan tinggi senyawa fenolik daun tapak kuda yaitu asam neoklorogenik, klorogenat, dan asam isoklorogenik ketiga senyawa yang merupakan golongan fenolik sangat aktif dalam penyembuhan luka (Xavier-santos *et al.*, 2022). Selain komposisi senyawa fenolik diatas senyawa fenolik memiliki satu asam karboksil fungsional dan terhidroksilasi turunan benzoikum (misalnya asam galat, *protocatechuic*, dan *hydroxybenzoicacids*) dan asam sinamat (misalnya *p-coumaric* dan asam ferulat). Asam *p-coumaric* dan asam ferulat dapat menyebabkan perubahan pada sifat membrane sel bakteri yang meliputi muatan permeabilitas intraseluler dan ekstraseluler, dan sifat fisikokimia. Perubahan ini mengakibatkan sifat fisik molekul mengalami penurunan muatan negative permukaan membran, dan terjadinya rupture lokal atau pembentukan pori dalam membrane sel sehingga terjadi kebocoran membran intraseluler (Borges *et al.*, 2013)

### 2.1.3 Target Dan Mekanisme Pembentukan Biofilm

Biofilm pada permukaan biotik dan abiotik terdiri dari koloni bakteri yang terbungkus dalam matriks ekstraseluler yang terdiri dari protein, eksopolisakarida dan DNA ekstraseluler (eDNA). Bakteri gram positif tidak memiliki membran luar seperti bakteri gram negatif, tetapi bakteri ini menghasilkan peptidoglikan tebal yang dianggap tidak berubah-ubah dan permukaan glikopolimer yang mungkin beragam, seperti yang ditunjukkan pada dinding sel glikopolimer asam teichoic (TA) di *Pneumococcus*. Sedangkan bakteri gram negatif memiliki lipopolisakarida (LPS) yang merupakan komponen penting dari membran luar dan dibagi menjadi

tiga bagian yaitu antigen-O, inti dan lipid A. Sedangkan asam teikoat (TA) ditemukan di dalam dinding sel bakteri Gram-positif. Salah satu sifat umum LPS dan TA adalah memberikan muatan pada permukaan luar bakteri, yang dapat mempengaruhi perlekatan pada permukaan sehingga terbentuk biofilm (Ruhul & Kataria, 2021)

Adapun mekanisme pembentukan biofilm sebagai berikut : ((Bi *et al.*, 2021)

a. Pembentukan Biofilm Awal

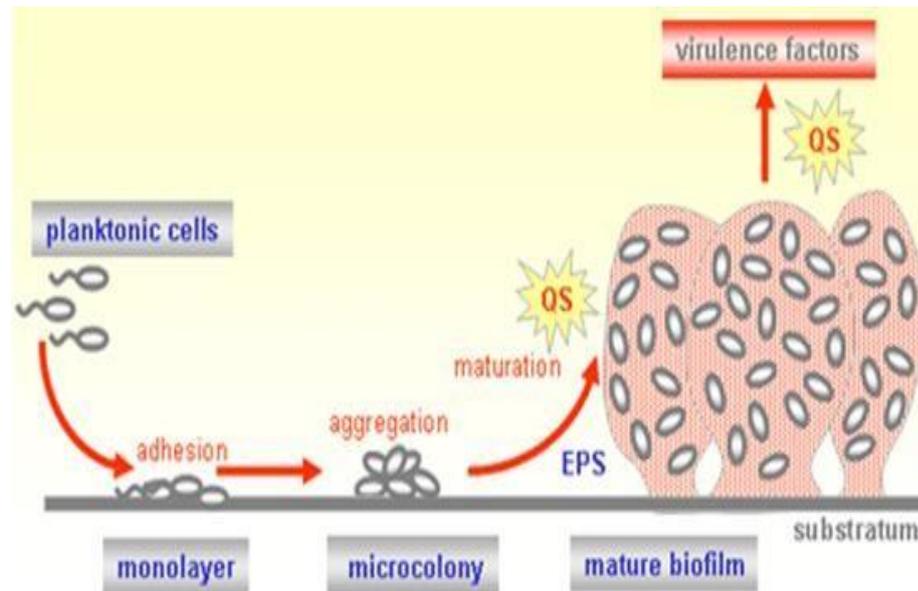
Perlekatan mikroorganisme pada permukaan tertentu dapat terjadi secara aktif atau pasif, sel bakteri akan membelah dan menghasilkan eksopolisakarida yang menyebabkan perlekatan secara irreversibel, pada tahapan ini sel akan memerlukan nutrisi yang terdiri dari polisakarida, protein, lipid, dan DNA. Sehingga pembentukan ini akan mengarahkan sel mikroba membentuk mikrokoloni yang semakin meluas dan menyatu membentuk lapisan sel yang menutupi permukaan.

b. Pematangan Biofilm

Pada tahap ini proliferasi sel-sel bakteri yang melekat secara irreversibel dapat terjadi dengan menggunakan nutrisi yang ada di lingkungan cairan sekitarnya dan ini mengarah pada pembentukan mikrokoloni yang membesar dan menyatu untuk membentuk lapisan sel yang menutupi permukaan. Sel-sel yang melekat menghasilkan polimer tambahan eksopolisakarida (EPS), yang membantu dalam perlekatan sel-sel ke permukaan dan dalam menstabilkan koloni dari fluktuasi lingkungan kemudian biofilm telah menuju pematangan setelah 24 jam membentuk lapisan tebal biomolekul. Pembentukan biofilm terjadi akibat dari adanya perlekatan secara terus menerus bersama dengan produksi EPS.

c. Disperse

Setelah terbentuk biofilm matang, bakteri yang menempel tersebut untuk bertahan hidup dan membuat relung baru harus mampu melepaskan diri dan menyebar dari biofilm. Sel anak dapat menjadi individu baru atau terkelupas. Bakteri yang terlepas kemudian dapat berpindah ke lokasi baru dan memulai kembali proses biofilm. sehingga disperse bukan hanya tahap akhir dari siklus hidup biofilm tetapi juga merupakan awal dari siklus hidup lain. Disperse dibagi menjadi dua disperse aktif dan disperse pasif. Disperse aktif tergantung pada mortalitas sel atau degradasi EPS. Sedangkan disperse pasif tergantung pada faktor fisik seperti gaya geser dalam kondisi aliran cair.



Gambar 6. Pembentukan Biofilm

Resistensi umumnya merupakan kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dari serangan antibiotik. Hal ini dapat terjadi apabila bakteri mengubah dirinya sehingga efektivitas obat bahan kimia atau bahan lain yang dirancang untuk membunuh bakteri pun berkurang. Akibatnya bakteri dapat tetap hidup kebal terhadap pengobatan dan berkembang biak, serta menimbulkan lebih banyak masalah. Resistensi ini diperantarai oleh adanya matriks EPS yang menyebabkan penetrasi antibiotik ke dalam biofilm menjadi lebih sulit (Samrot *et al.*, 2021). Karakteristik eksopolisakarida berbeda di antara berbagai bakteri dan tergantung pada kondisi pertumbuhan, media dan ketersediaan nutrisi. Dalam beberapa bentuk biofilm, manosa, galaktosa, dan glukosa merupakan karbohidrat yang paling melimpah, diikuti oleh N-asetil-glukosamin, asam galakturonat, arabinosa, fukosa, rhamnosa, dan xilosa, yang terdapat dalam komposisi matriks biofilm. Hal ini menyebabkan bakteri lebih tidak sensitive terhadap antibiotik yang menargetkan pembelahan sel (Somma *et al.*, 2020)

#### 1. Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

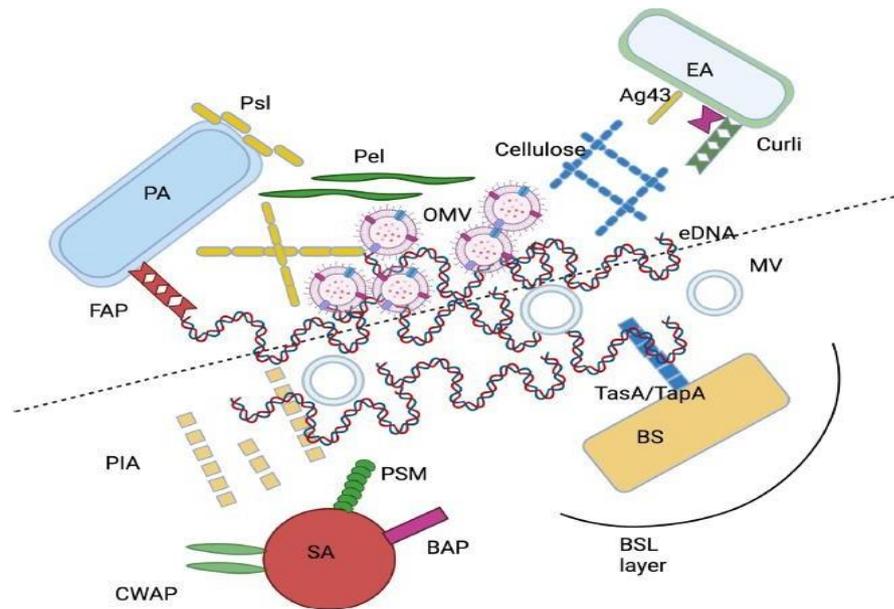
Secara umum semua bakteri tipe Gram berflagel mendekati dengan motilitas dan mengkondisikan permukaan dengan sekresi polisakarida untuk membantu sel menempel. Bakteri Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan motilitas flagella (berenang atau berkerumun) untuk mencapai permukaan dan selanjutnya mengatur motilitas flagellar dan menggunakan motilitas twitching pili berbasis Tipe IV untuk merangkak dipermukaan, melepaskan polisakarida Psl

pada permukaan dan menciptakan jalur untuk mempromosikan sel-sel adhesi. Pembentukan eksopolisakarida membantu bakteri berflagel menempel pada permukaan dan menurunkan regulasi ekspresi flagella (Ruhul & Kataria, 2021)

Vesikel ekstraseluler merupakan faktor pendukung penting biofilm, hal ini dapat memodulasi bakteri dengan lingkungan mikroba lainnya. Interaksi semacam itu memungkinkan perilaku bakteri yang terkoordinasi melalui pensinyalan sel-ke-sel dan meningkatkan keragaman genetik bakteri melalui transfer gen horizontal. Selain itu vesikel ekstraseluler bakteri Gram-negatif dapat bertindak dalam beberapa cara dalam interaksi bakteri-bakteri seperti penginderaan kuorum, pembentukan biofilm, dan persenjataan yang bersaing. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dilaporkan menggunakan vesikel ekstraseluler mereka dalam mengangkut PQS salah satu molekul penginderaan kuorum dan PQS vesikular ini dapat berinteraksi dengan bakteri secara langsung melalui LPS. Vesikel ekstraseluler *Pseudomonas aeruginosa* yang membawa protein lactamase memediasi kelangsungan hidup bakteri lain yang rentan terhadap antibiotik. Selain itu, pompa penghabisan multidrug terkait vesikel juga dapat berkontribusi terhadap resistensi antibiotik. Reseptor yang bergantung pada TonB terkait vesikel dan transporter ABC dapat meningkatkan ketersediaan nutrisi dengan bertindak sebagai sensor nutrisi dan transporter masing-masing. (Kim *et al.*, 2015)

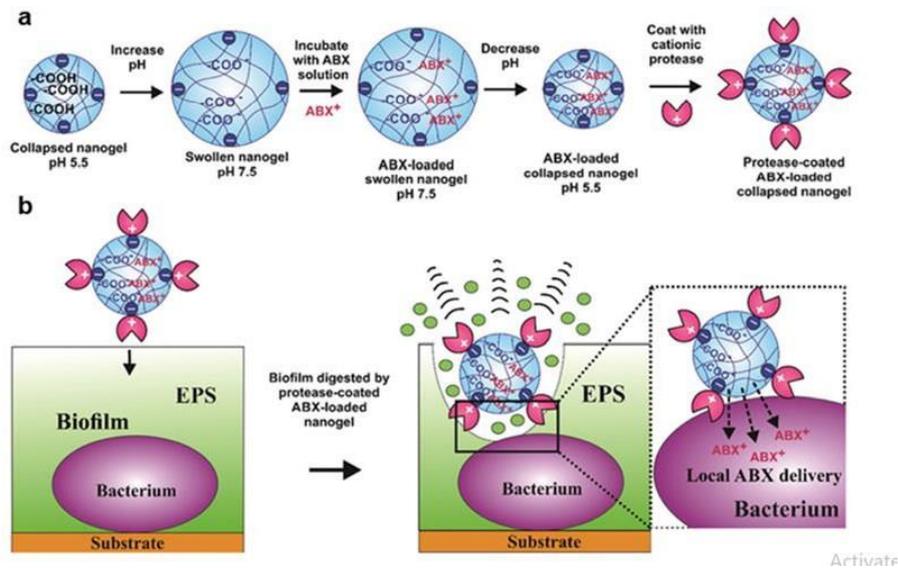
## 2. Pembentukan Biofilm *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Gen *mecA*, yang terletak di kromosom staphylococcus, meningkatkan virulensi nya sehingga menyebabkan resisten terhadap antibiotik methicillin. Biofilm MRSA dibentuk secara ica-independent (PIA-independent) oleh protein permukaan yang mengandung peptidoglikan oleh sortase sebagai transpeptidase dan dikodekan oleh gen *srtA*. *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* melekat pada substrat padat setelah itu terjadi adhesi sel-sel bakteri kemudian berkembang biak untuk membentuk biofilm berlapis-lapis yang terbungkus dalam EPS. Pembentukan biofilm melibatkan produksi adhesi antar sel polisakarida yang tergantung pada ekspresi adhesi antar sel (*icaADBC*) operon yang mengkode tiga protein membran (*IcaA*, *IcaD* dan *IcaC*) dan satu protein ekstraseluler (*IcaB*). Selain itu beberapa protein permukaan telah terlibat dalam proses pembentukan biofilm yang disebut dengan protein pengikat fibronektin atau protein *Staphylococcus aureus* (Neopane, 2018)



Gambar 7. Gambar representatif dari sekumpulan komponen matriks biofilm bakteri Gram-negatif dan Gram-positif (Ruhul & Kataria, 2021)

Komponen matriks biofilm bakteri gram negatif dan gram positif merupakan salah satu proses umum melibatkan pelepasan eDNA dan vesikel membran luar (OMV) oleh bakteri gram negative, vesikel membran (MV) oleh bakteri gram positif yang berkontribusi pada pengembangan biofilm. Gambar 7 menunjukkan bahwa polisakarida yang disekresikan oleh *Pseudomonas aeruginosa* (PA) adalah Psl (lokus polisakarida) dan Pel (pelikel), dan selulosa dari *Escherichia coli* (EA), sedangkan bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* (SA) dan *Bacillus subtilis* (BS) masing-masing mensekresikan adhesi antar sel polisakarida (PIA) dan lapisan hidrofobik Bsl (lapisan permukaan *Bacillus*). Sejumlah protein amiloid seperti curli dan Ag43 dari *Escherichia coli*, amiloid fungsional *Pseudomonas* (Fap) dari *Pseudomonas aeruginosa*, protein larut fenol (PSM) dan protein terkait Biofilm (Bap) dari *Staphylococcus aureus* dan komponen spora antimikroba yang bergantung pada translokasi (TasA/TapA) dari *Bacillus subtilis*. Protein amiloid ini disekresikan, diproses dan dipolimerisasi dan mungkin memerlukan ion tertentu sehingga kehadiran protein seperti amiloid berada dalam biofilm membuka jalan bagi penyaringan molekul yang dapat mengganggu produksi dan pembentukannya sehingga menyebabkan biofilm menjadi tidak stabil, dalam hal ini telah diketahui bahwa polisakarida berperan penting dalam pemeliharaan biofilm matang. (Ruhul & Kataria, 2021)



Gambar 8. Target nanogel carbopol pada biofilm bakteri

Target antibiofilm merupakan senyawa kimia maupun sintetik yang mampu merusak matriks eksopolisakarida (EPS), ekstraseluler DNA (eDNA) dan protein lainnya penyusun biofilm bakteri, sehingga bakteri menjadi lemah dan tidak mampu melakukan pertahanan biofilm. Nanopartikel membuat lubang atau saluran buatan di EPS lebih memudahkan dalam kerusakan fisik secara halus pada EPS hal ini juga dapat mengurangi efek samping pada tubuh manusia. Pada gambar 8. Nanogel Carbopol Aqua SF1 sarat dengan antibiotik (ABX+) dan dilapisi dengan protease pada permukaan luarnya dan mekanisme nanopartikel yang bekerja pada biofilm menempel pada substrat dengan membuat lubang pada saluran eksopolisakarida (EPS). Hal ini akan memudahkan antibiotik yang diperantarai oleh nanogel carbopol masuk menembus dinding sel bakteri sehingga dapat merusak protein bakteri (Bi *et al.*, 2021)

#### 2.1.4 Deteksi Pembentukan Biofilm

Uji pembentukan biofilm dapat dilakukan dengan beberapa metode kualitatif sederhana yaitu : (Indwelling, 2018)

##### 1. Metode Tabung

Metode tabung merupakan salah satu metode untuk mendeteksi biofilm secara kualitatif. Pada metode ini mikroba diuji dikultur semalaman diinokulasi dalam tabung kaca borosilikat yang berisi 10 ml Trypticase Soy Broth (TSB) dengan glukosa 1%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam secara aerob. Setelah inkubasi, tabung dicuci dengan larutan Phosphate Buffer

Saline (PBS) pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai menggunakan kristal violet (0,1%) selama 15 menit, skoring untuk metode tabung dilakukan sesuai dengan hasil galur kontrol. Pembentukan biofilm dianggap positif ketika film terlihat melapisi dinding dan dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk diberi skor 1-lemah/tidak ada, 2- sedang dan 3-tinggi/kuat. Adapaun interpretasi dari uji tabung seperti table 1.

Tabel 1. Interpretasi Metode Tabung

Skor	Interpretasi
1	Weak/ None biofilm production
2	Moderate biofilm production
3	High/Strong biofilm production



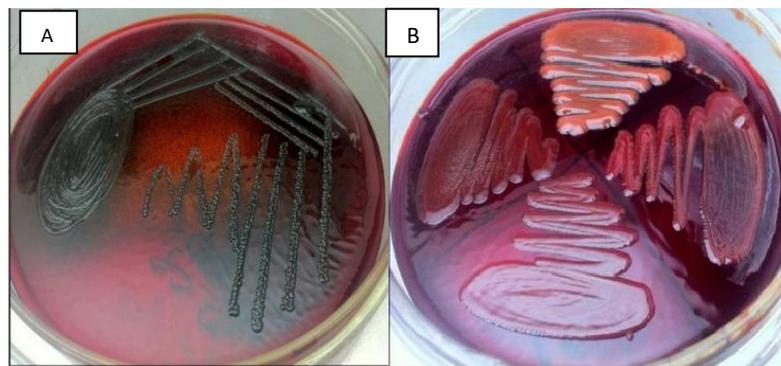
Gambar 9. Metode tabung (Indwelling, 2018)

## 2. Metode *Congo Red Agar* (CRA)

Metode ini merupakan metode uji biofilm yang cukup mudah dan murah. Metode ini memiliki kriteria evaluasi berdasarkan analisis visual warna koloni yang tumbuh pada media agar seperti congo red stain, glukosa, blood agar. metode agar merah kongo (CRA) ini merupakan metode sederhana yang dapat mendeteksi produksi biofilm secara kualitatif, selanjutnya disterilkan pada autoklaf. Kemudian dilakukan inokulasi organisme uji dan dilanjutkan dengan penginkubasian pada suhu 37 ° C selama 24 jam. Produksi biofilm koloni pada media berwarna merah kehitaman terlihat pada gambar A dan koloni berwarna merah/orange bukan penghasil biofilm terlihat pada gambar B. Interpretasi dilakukan dengan menggunakan skala warna pada tabel 2

Tabel 2. Interpretasi Metode *Congo Red Agar* (CRA)

Warna	Interpretasi
Hitam, dry crystalline colonies	Menghasilkan biofilm
Koloni merah/merah muda/ Bordeaux colonies	Tidak menghasilkan biofilm



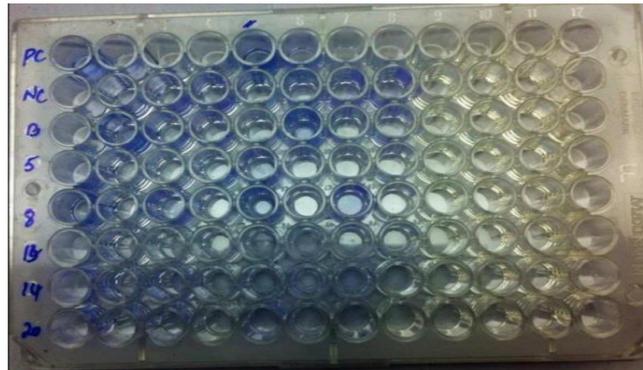
Gambar 10. Metode Congo Red Agar (CRA (Indwelling, 2018))

### 3. Metode Kultur Plate Jaringan

Metode Kultur Plate Jaringan atau yang disebut sebagai microtiter adalah metode standar untuk menentukan deteksi biofilm. Bakteri yang diisolasi dari pelat agar segar diinokulasi dalam 10 mL kaldu kedelai trypticase dengan glukosa 1%. Kaldu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur kemudian diencerkan 1:100 dengan medium segar. Sumur individu dari 96 pelat perlakuan kultur jaringan polistiren dasar datar yang rata diisi dengan 200  $\mu$ L kultur yang diencerkan. Organisme kontrol juga diinkubasi, diencerkan dan ditambahkan ke piring kultur jaringan. Sumur kontrol negatif berisi kaldu steril yang diinokulasi. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, setelah inkubasi isi masing-masing sumur dikeluarkan dengan cara ditepuk pelan. Sumur dicuci dengan 0,2 mL fosfat buffer saline (pH 7,2). Biofilm yang terbentuk oleh bakteri yang menempel pada sumur difiksasi dengan natrium asetat 2% dan diwarnai dengan kristal violet (0,1%), noda berlebih dihilangkan dengan menggunakan air deionisasi dan pelat disimpan untuk dikeringkan. Densitas optis (OD) biofilm perekat yang diwarnai diperoleh dengan menggunakan micro ELISA auto reader (model 680, Biorad, UK) pada panjang

gelombang 570 nm, percobaan dilakukan dalam rangkap tiga dan diulang tiga kali.

$OD \leq OD_c$ ,	= Tidak ada produser biofilm
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	= Produsen biofilm lemah
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	= Produser biofilm moderat
$4 \times OD_c < OD$	= Produser biofilm kuat



Gambar 11. Metode Plate Kultur Jaringan. (Indwelling, 2018)

## 2.2 Tinjauan Umum Mikroba

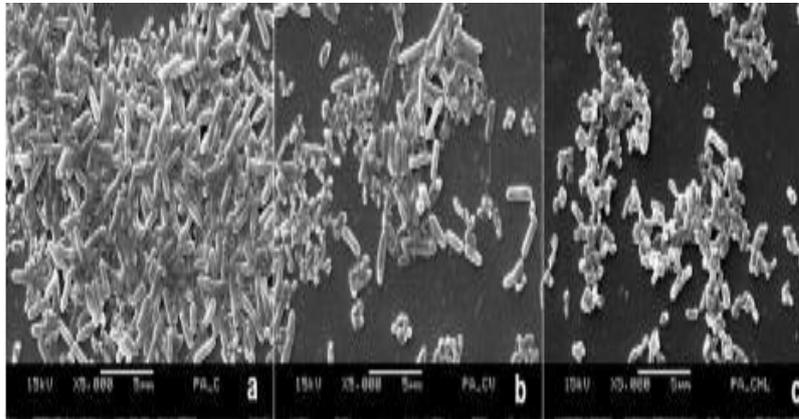
### 2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* bakteri aerob obligat yang mudah tumbuh pada berbagai medium kultur, kadang-kadang menghasilkan aroma yang manis dan berbau seperti anggur atau seperti jagung taco. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni yang bundar dan licin dengan warna kehijauan yang berfluoresensi. Bakteri ini sering menghasilkan pigmen kebiruan tak berfluoresensi dan piosianin yang berdifusi ke dalam agar. tersebar luas di alam serta dapat tumbuh baik pada suhu 37 – 42°C Bakteri ini juga dapat ditemukan di lingkungan lembab di rumah sakit seperti wastafel, toilet, alat bantu pernapasan mekanis, dan peralatan dialisis. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen oportunistik yang dapat menginfeksi individu yang mengalami penurunan imunitas seperti pasien luka bakar, neutropenia, dan cystic fibrosis (Medicine *et al.*, 2021)

#### 1. Klasifikasi (Proteobacteria, n.d.)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria

Ordo : Pseudomonadales  
 Family : Pseudomonadaceae  
 Genus : Pseudomonas  
 Species : *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 12. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang membentuk biofilm dan setelah 24 jam di obati dengan 1,0 ml minyak kayu putih dalam penelitian (Wijesinghe *et al*, 2021)

## 2. Sifat Dan Morfologi

*Pseudomonas aeruginosa* bersifat gram negatif berbentuk batang dan terlihat berbentuk tunggal, berpasangan, kadang-kadang rantai pendek dan dapat bergerak (motil) karena adanya satu flagel berukuran sekitar 0,6 x 2 mikro meter. *Pseudomonas aeruginosa* adalah pathogen oportunistik yang menyebabkan beberapa infeksi pada manusia seperti infeksi luka operasi, infeksi saluran kemih, infeksi luka bakar, keratitis, dan otitis media. Bakteri ini dapat hidup dan berkembang dalam keadaan tanpa oksigen, sehingga mampu beradaptasi dengan lingkungan melakukan pembentukan biofilm dan dapat menjadi resisten terhadap antibiotik (Tuon *et al.*, 2022)

### 2.2.2 Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap antibiotik. Bakteri ini sering di temukan di saluran pernapasan bagian atas dalam keadaan flora normal. Dapat menjadi pathogen dengan bertambahnya koloni bakteri yang membentuk biofilm. Infeksi yang dapat disebabkan infeksi kulit ringan hingga berat dan meningitis yang dapat mengancam jiwa, Kemunculan jenis bakteri MRSA juga sering disebabkan oleh kebiasaan menggunakan antibiotik yang tidak tepat, seperti mengonsumsi atau menggunakan antibiotik pada kondisi yang sebenarnya tidak

perlu (tidak tepat indikasi). Kebiasaan semacam ini meningkatkan risiko bakteri *Staphylococcus* menjadi kebal atau resisten terhadap antibiotik (Pidwill *et al.*, 2021)

#### 1. Klasifikasi (D. P. Sari & Basyarahil, 2021)

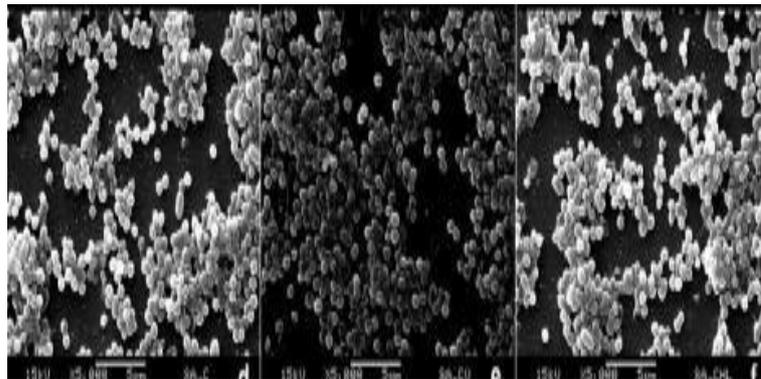
Kingdom : Bacteria

Ordo : Bacillales

Family : Micrococcaceae

Genus : *Staphylococcus*

Species : *Staphylococcus aureus*



Gambar 13. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang membentuk biofilm dan setelah 24 jam di obati dengan 1,0 ml minyak kayu putih dalam penelitian (Wijesinghe *et al.*, 2021)

#### 2. Sifat Dan Morfologi

*Staphylococcus aureus* berbentuk kokus seperti buah anggur dengan diameter 0,5-1,0 mm, tidak membentuk spora dan tidak bergerak, hidup berkelompok atau berpasangan dan kadang berantai pendek. *Staphylococcus* berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat. Dinding sel terluar bakteri gram positif terdiri dari peptidoglikan tebal tanpa lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida sedangkan bakteri gram negatif memiliki dinding selnya terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida (Karimela *et al.*, 2017)

Methicilin Resistens *Staphylococcus aureus* (MRSA) disebabkan karena adanya pertumbuhan biofilm secara ketat oleh faktor genetik yang kompleks, Respon imun pejamu terhadap infeksi biofilm persisten sebagian besar tidak efektif dan menyebabkan penyakit kronis. *Staphylococcus aureus* menunjukkan toleransi yang lebih tinggi terhadap antibiotik yang menargetkan berbagai proses

seluler dari pada sel planktonik fase diam, mungkin karena peningkatan jumlah sel persisten sehingga dapat resisten terhadap antibiotik (Kamble *et al.*, 2022)

### **2.3 Metode Ekstraksi**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan bahan organik dengan menggunakan bantuan pelarut organik. Proses ini biasanya dilakukan untuk mengambil suatu komponen senyawa organik yang diinginkan dari suatu bahan. Ekstraksi memanfaatkan pembagian suatu zat terlarut antar dua terlarut yang tidak saling tercampur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut lain. Tujuan ekstraksi adalah untuk mendapatkan zat aktif sebanyak mungkin dari zat-zat yang tidak berguna sehingga lebih mudah digunakan dari bahan komponen asal (Manigaha & Ganesh, 2022). Ukuran partikel yang dibuat semakin kecil maka makin besar luas permukaan partikel yang akan diekstrak, sehingga dapat memperbesar luas permukaan transfer massa pelarut ke dalam permukaan partikel dengan demikian laju difusi pelarut ke dalam bahan ekstrak menjadi lebih besar. Pengecilan ukuran juga bertujuan untuk memecahkan struktur dinding sel yang menjadi penghalang bagi terjadinya difusi pelarut ke dalam partikel, namun demikian ukuran bahan juga tidak boleh terlalu kecil karena apabila ukurannya teramat kecil (terlalu halus), maka akan menyebabkan sulitnya proses pemisahan ampas dari ekstrak yang didapat. Metode ini menggunakan pelarut yang akan berdifusi masuk ke dalam sel partikel yang selanjutnya senyawa aktif akan keluar akibat dari tekanan osmosis (Maleta *et al.*, 2018)

Berbagai jenis pelarut yang dapat digunakan untuk proses ekstraksi. Jenis dan mutu pelarut yang digunakan sangat menentukan keberhasilan proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan harus mempunyai persyaratan antara lain harus dapat melarutkan zat yang diinginkan, mempunyai titik didih yang cukup rendah, murah, tidak toksik, dan tidak mudah terbakar (Mattioli, 2020), Jenis pelarut yang digunakan salah satunya yaitu etanol. Etanol merupakan cairan mudah menguap yang biasa digunakan sebagai pelarut bagi kebanyakan senyawa organik. Etanol bersifat semi polar yang dapat melarutkan senyawa polar maupun non polar dan dapat digunakan pada berbagai metode ekstraksi, serta aman untuk ekstrak yang akan dijadikan bahan obat-obatan dan makanan. Alasan lainnya, adalah karena etanol merupakan pelarut yang mudah didapatkan, efisien, aman untuk lingkungan, dan memiliki tingkat ekstraksi yang tinggi (Thoo *et al.*, 2013)

konsentrasi pelarut etanol sangat mempengaruhi hasil dari ekstrak yang didapatkan. Penggunaan etanol sebagai pelarut dapat dikombinasikan dengan air yang dinyatakan dengan satuan persen (%) dan sekaligus dapat dijadikan parameter dalam proses ekstraksi. Kombinasi etanol - air menghasilkan perbedaan konsentrasi polaritas dari pelarut ekstraksi. Konsentrasi dari etanol sangat menentukan kekuatan hidrofobik pada proses pelarutan serta kekuatan ikatan-ikatan hidrogen atau gaya van der Waals dari komponen target dalam proses pelarutan dan penyarian dari komponen target. Mengacu kepada teori kesamaan dan kemampuan saling bercampur, semakin mirip polaritas pelarut dengan zat terlarut, semakin cepat pelarutan zat terlarut dari sel tumbuhan. Meningkatnya konsentrasi etanol dapat meningkatkan laju disolusi dan ekstraksi. Ketika konsentrasi etanol lebih besar dari 70%, tingkat ekstraksi komponen target sedikit menurun, kemungkinan karena denaturasi protein meningkatkan resistensi difusi pada konsentrasi etanol yang lebih tinggi (Fan *et al.*, 2020)

## **2.4 Identifikasi Senyawa Dengan Kromatografi**

Kromatografi adalah teknik pemisahan molekul untuk mendapatkan karakteristik dari suatu partikel yang didasarkan atas perbedaan distribusi dari komponen-komponen molekul yang meliputi dua fase yaitu fase diam (padat atau cair) dan fase gerak (cair atau gas). Bila fase diam berupa zat padat yang aktif, maka dikenal istilah kromatografi penyerapan (adsorption chromatography). Bila fase diam berupa zat cair, maka teknik ini disebut kromatografi pembagian (partition chromatography). Adapun fasa diam dan fasa gerak itu sendiri adalah: (Kuntaarsa *et al.*, 2021)

1. Fase gerak : sistem kromatografi yang berfungsi untuk mendorong agar komponen – komponen cuplikan tidak dapat bergerak
2. Fase diam : sistem kromatografi yang berfungsi untuk mempengaruhi komponen – komponen cuplikan tetap diam pada posisinya.

### **2.4.1 Kromatografi Lapis Tipis/ KLT**

Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah metode fitokimia yang di gunakan untuk memisahkan sampel ekstrak tanaman dan menghitung jumlah (kadar) dalam sampel tersebut. Sampel terdiri dari senyawa tanaman berupa senyawa fenolik, flavonoid, alkaloid, tanin, senyawa-senyawa tersebut akan terpisah dalam pelat silika. Silika gel adalah fase diam mengandung zat yang berfluoresensi dalam sinar UV. Fase gerak adalah pelarut cair yang cocok atau campuran pelarut, fase gerak yang dikenal sebagai pelarut pengembang akan bergerak sepanjang fase

diam karena pengaruh kapiler pada pengembangan secara menaik atau pengaruh gravitasi pada pengembangan secara menurun ( Falabiba *et al.*, 2019)

KLT merupakan metode kualitatif dengan membandingkan nilai Rf solute dengan nilai Rf senyawa baku, nilai Rf dihitung dengan menggunakan perbandingan : (Nanda & Darayani, 2018)

$$R_f = \frac{\text{Jarak titik pusat bercak dari titik awal}}{\text{Jarak pengembangan}}$$

Angka Rf berjarak antara 0,00 sampai 1,00 dan hanya dapat ditentukan 2 desimal. Nilai ini merupakan ukuran kecepatan pemindahan suatu senyawa pada kromatografi dan pada kondisi konstan merupakan besaran karakteristik dan reproduibel (Nanda & Darayani, 2018)

#### **2.4.2 KLT Bioautografi**

Bioautografi termasuk metode skrining mikrobiologi yang biasa digunakan untuk mendeteksi aktivitas antimikroba. Skrining merupakan prosedur pertama yang dilakukan pada sampel yang akan dianalisis untuk mengetahui ada atau tidaknya analit yang didapat. Prosedur bioautografi untuk skrining aktivitas antimikroba dengan mengetahui lokasi aktivitas antibakteri pada kromatogram. Agen antimikroba ditransfer dari lempeng KLT ke plat agar yang diinokulasi dengan cara difusi dan menampilkan zona hambat. Skrining metode bioautografi pada dasarnya untuk menguji aktivitas biologis, misalnya antibakteri, antijamur, dan antiprotozoa zat uji. Metode deteksi ini dapat berhasil dengan dikombinasikan dengan teknik 15 kromatografi lapis tipis. Prosedur dalam metode bioautografi hampir sama dengan yang digunakan dalam metode difusi agar. Perbedaannya adalah senyawa yang diuji berdifusi ke media agar yang diinokulasi dari lapisan kromatografi, yang merupakan adsorben atau kertas (Choma & Grzelak, 2011)

#### **2.4.3 Gas Chromatography and Mass Spectroscopy (GC-MS)**

Penggunaan GC-MS adalah untuk menganalisis kadar atau kandungan senyawa kimia dengan cara yang lebih cepat. Memiliki detektor ionisasi nyala dan detektor penangkapan elektron dengan sensitivitas sangat tinggi. Kromatografi gas dapat menganalisis secara kuantitatif menentukan bahan yang ada pada konsentrasi yang sangat rendah, salah satu metode pemisahan yang cukup baik dengan mekanisme pemisahan antara beberapa senyawa terjadi karena perbedaan harga kelarutan masing-masing dalam pelarut yang bergerak,

dan perbedaan keterserapan masing-masing senyawa kepada fasa diam dan fasa gerak adalah gas helium pada Spektroskopi massa (MS). (Al-rubaye *et al.*, 2017)

GC-MS dimodifikasi dengan bagian-bagian pendukung GC-MS selain mampu menganalisis suatu senyawa GC-MS juga mampu mendeteksi suatu zat kimia yang mengalami kontaminan, pembusukkan atau pemalsuan makanan, minyak, mentega, yang dapat berbahaya bagi industri kimia dan dapat merusak suatu percobaan dalam laboratorium, sehingga GC-MS menjadi suatu metode yang akurat apabila digunakan dalam suatu penelitian khususnya dalam menganalisis senyawa kimia. (Al-rubaye *et al.*, 2017)

### **2.5 Analisis In Silico**

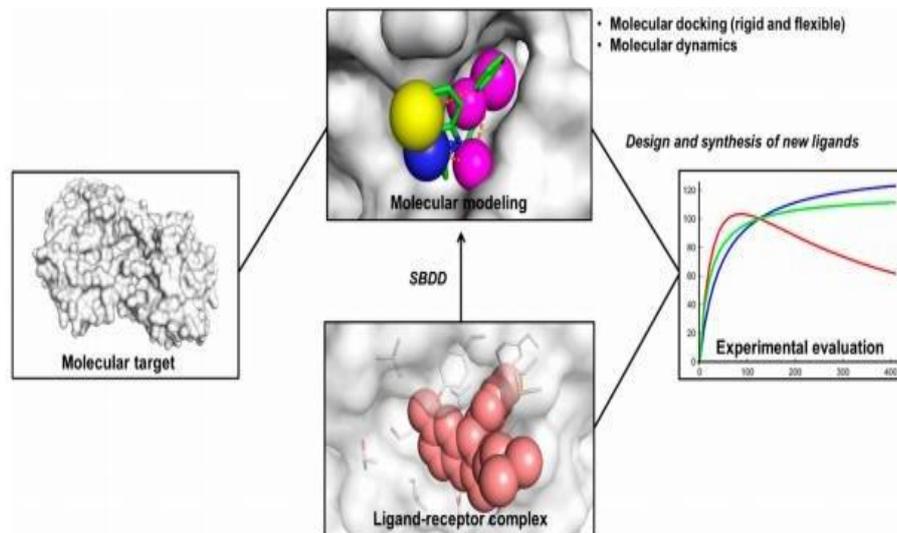
Kajian penelitian dengan menggunakan metode in silico merupakan metode penelitian dalam bidang biologi dan kimia yang berbasis komputasi. Metode ini digunakan untuk menganalisis suatu senyawa kimia yang memiliki sifat kimiawi. Tahapan analisis in silico dimulai dengan memprediksi, memberi hipotesis, memberi penemuan baru atau kemajuan baru dalam pengobatan dan terapi. Penggunaan metode insilico dilakukan untuk memprediksi efek farmokologis suatu senyawa kimia terhadap target gen yang diteliti (Agarwal *et al.*, 2020)

Metode in silico memiliki kelebihan diantaranya mengurangi penggunaan bahan, alat dan hewan percobaan yang berlebihan serta dapat menghemat dalam pembiayaan percobaan (Dona *et al.*, 2019). Demikian dengan kerugian dari metode in silico karena fleksibilitas protein, konformasi molekul dan pengikatan semua dapat menghalangi prediksi yang akurat. Sebagai contoh, bahkan dengan tersedianya struktur kristal untuk beberapa enzim metabolisme obat mamalia, masih terdapat kesulitan yang cukup besar dalam prediksi proses metabolisme (Vanhaelen *et al.*, 2017)

### **2.6 Molekuler Docking**

Molekuler docking atau penambatan molekul adalah metode komputasi yang bertujuan memprediksi interaksi obat dengan makromolekul. Interaksi ini mengakibatkan pencarian obat untuk mencocokkan posisinya diseluruh permukaan makromolekul (Das *et al.*, 2021). Molekuler docking secara otomatis akan menentukan energi pengikatan senyawa ke situs aktif tirosinase dan tirosin hidroksilase dan sehingga menghasilkan korelasi antara energi dan ligan. Docking awalnya divalidasi dengan simulasi docking dari molekul ligan yang

awalnya termasuk dalam protein disini akan terjadi interaksi antara ligan dengan protein apabila terdapat kecocokan anatar dua molekul tersebut (Rosada *et al.*, 2019)



Gambar 14. Molekuler Docking

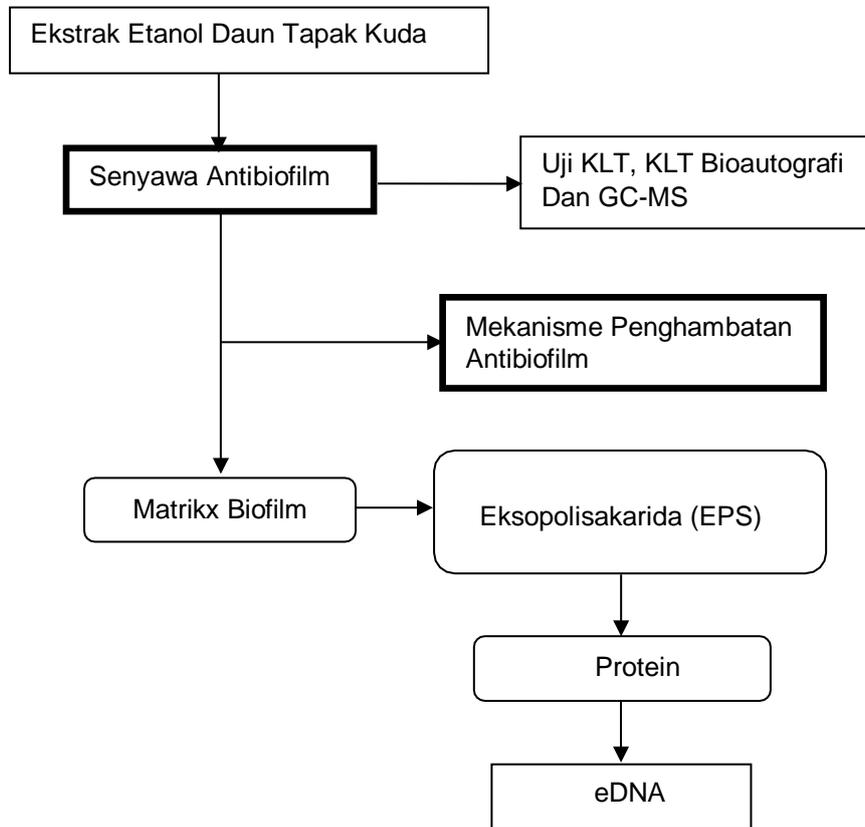
Gambar 14. Desain Obat Berbasis Struktur (SBDD) adalah proses siklik yang terdiri dari pemindahan molekul ligan potensial menuju protein target dengan melakukan pengikatan ligan pada molekular target yang telah di tentukan, pengikatan kemudian dievaluasi secara eksperimental mengingat bahwa senyawa bioaktif yang ditemukan merupakan struktur kompleks ligan-reseptor (Ferreira, 2015)

Molekuler docking dapat dilakukan dengan persyaratan pertama yaitu memiliki protein yang menarik. Struktur yang telah ditentukan dengan menggunakan teknik biofisik seperti kristalografi sinar-x atau yang lebih jarang, spektroskopi NMR. Struktur protein dan database ligan ini berfungsi sebagai input ke program docking. Keberhasilan program docking tergantung pada dua komponen seperti algoritma pencarian dan fungsi penilaian. Mencari Ruang Konformasi Ruang pencarian terdiri dari semua kemungkinan orientasi dan konformasi protein yang dipasangkan dengan ligan (Mani, 2017)

Pendekatan molekuler docking dapat diketahui bahwa adanya energi ikatan dan ikatan hidrogen yang terbentuk. Energi ikatan digunakan untuk menunjukkan kekuatan ikatan antara senyawa dengan protein. rendahnya nilai binding affinity yang ditunjukkan maka energi ikatan yang terbentuk semakin kuat dan stabil. Jenis ikatan hidrogen yang terbentuk digunakan untuk menganalisis mekanisme interaksi yang terbentuk. Ikatan-ikatan yang terbentuk menghasilkan

energi bebas Gibbs ( $\Delta G$  *binding*) yang merupakan parameter kestabilan konformasi antara ligan dan reseptor (Das *et al.*, 2021).

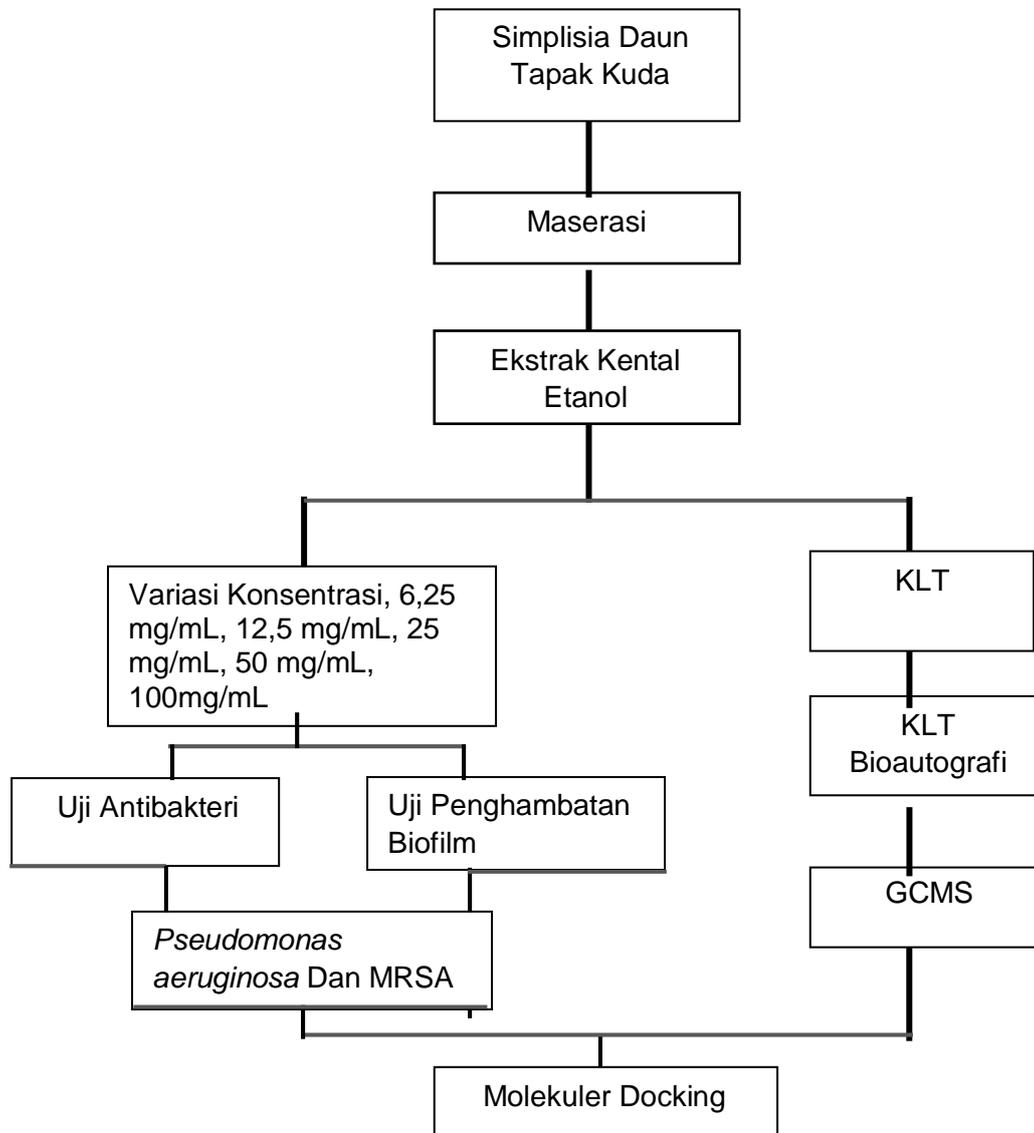
## 2.7 Kerangka Pikir



Keterangan :  = yang diteliti

Gambar 15. Kerangka Pikir

## 2.8 Alur Penelitian



Gambar 16. Skema Alur Penelitian