

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sushi adalah pangan siap konsumsi (*ready-to-eat/RTE food*) asal Jepang yang terdiri dari nasi yang diberi asam dan bahan pangan mentah yang umumnya berasal dari hasil perikanan (Liang *et al.*, 2016). Terdapat berbagai jenis sushi, namun dua jenis yang paling dikenal adalah *nigiri* (nasi dengan ikan mentah di atasnya) dan *maki* (nasi lapis nori yang digulung dengan ikan dan bahan lain di dalamnya). Karena tidak melalui proses pemanasan, sushi sangat rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme patogen. Selain itu, proses pembuatannya yang dilakukan secara manual dan melibatkan banyak kontak tangan serta penggunaan alat seperti penggulung yang dipakai berulang, meningkatkan potensi kontaminasi dari pekerja maupun peralatan yang kurang saniter. Penelitian yang dilakukan oleh Yennie *et al.* (2022) menunjukkan bahwa terdapat salah satu kontaminan bakteri *Bacillus cereus* pada produk sushi yang dijual di tingkat ritel di wilayah Jabodetabek. Temuan ini memperkuat kekhawatiran terhadap risiko keamanan pangan dari produk olahan laut siap saji, terutama yang tidak mengalami proses pemanasan sebelum dikonsumsi.

Produk pangan ini juga berisiko terkontaminasi oleh mikroba patogen yang dapat menyebabkan penyakit bawaan makanan (*foodborne diseases*). Kontaminasi ini terjadi akibat paparan mikroorganisme dari lingkungan, proses pengolahan yang kurang higienis, serta penyimpanan yang tidak sesuai standar keamanan pangan (Vandermeersch *et al.*, 2015). Menurut laporan WHO, sekitar 70% penyakit bawaan makanan disebabkan oleh kontaminasi patogen yang menyebar melalui tanah, air, dan makanan, serta menghasilkan metabolit dan faktor virulensi yang dapat menyebabkan infeksi pada manusia. Beberapa bakteri patogen utama yang sering mencemari produk pangan adalah *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus cereus* (Himyatul *et al.*, 2022).

Di Indonesia, kontaminan *Bacillus cereus* dalam pangan telah dilaporkan menjadi penyebab utama kejadian luar biasa (KLB) keracunan makanan. Berdasarkan data BPOM tahun 2020, terdapat 45 KLB penyakit bawaan pangan yang menyebabkan 3.276 orang terpapar, dengan 1.528 orang mengalami sakit dan 6 orang meninggal dunia. Studi yang dilakukan oleh (Arisanti *et al.*, 2018) juga menunjukkan bahwa dari 175 laporan KLB di Indonesia antara tahun 2000-2015, sebanyak 18,3% dan 19,4% di antaranya berturut-turut disebabkan oleh *Bacillus cereus*.

Bacillus cereus adalah bakteri Gram positif yang membentuk spora dan tersebar luas di lingkungan seperti tanah, perairan, tumbuhan, dan hewan, serta mampu bertahan pada kondisi stres seperti pemanasan, dehidrasi, maupun radiasi (Kumari & Sarkar, 2016; Ramarao *et al.*, 2020). Bakteri Gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi. Pada pewarnaan Gram, bakteri Gram positif akan berwarna ungu karena kompleks zat

warna kristal violet yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan alkohol, sedangkan bakteri Gram negatif berwarna merah karena kompleks tersebut larut saat pemberian larutan alkohol sehingga mengambil warna merah safranin (Nurhidayati *et al.*, 2015). *Bacillus cereus* dapat menyebabkan intoksikasi makanan, dengan gejala meliputi mual, muntah, diare, dan sakit perut (Manikome, 2022). Salah satu metode yang umum digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen adalah penggunaan bahan antimikroba sintetis dan pengawet kimia. Namun, penggunaan bahan tersebut secara berlebihan dapat menyebabkan resistensi bakteri dan menimbulkan dampak negatif terhadap kesehatan serta lingkungan. Selain itu, residu bahan kimia dalam produk pangan juga berpotensi membahayakan konsumen dan mencemari ekosistem. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengawet alami yang lebih aman, ramah lingkungan, dan berkelanjutan. Senyawa antibakteri alami banyak ditemukan di alam, salah satunya berasal dari rumput laut, yang diketahui mengandung metabolit primer dan sekunder dengan aktivitas biologis penting. Metabolit sekunder berperan dalam perlindungan organisme dari tekanan lingkungan dan dapat berfungsi sebagai agen antimikroba alami yang efektif untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme penyebab kontaminasi pangan. Metabolit primer merupakan senyawa yang berperan penting dalam pertumbuhan, perkembangan, dan proses fisiologis sel, seperti karbohidrat, protein, dan lemak, sedangkan metabolit sekunder adalah senyawa turunan yang tidak secara langsung terlibat dalam pertumbuhan, tetapi memiliki fungsi ekologis dan bioaktif tertentu, seperti aktivitas antibakteri, antifungi, maupun antivirus (Brown, 2002). Makroalga diketahui memiliki metabolit primer berupa alginat, agar-agar, dan karaginan yang telah dimanfaatkan secara luas dalam berbagai industri. Selain itu, makroalga juga menghasilkan metabolit sekunder berupa senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai agen antibakteri (Srie *et al.*, 2020). Oleh karena itu, diperlukan upaya untuk menghambat pertumbuhan bakteri ini guna menjaga kualitas dalam pangan dan memastikan keamanannya bagi konsumen. Salah satu alternatif yang dapat digunakan adalah pemanfaatan senyawa metabolit sekunder bioaktif dari bahan alami yang ramah lingkungan dan mudah terurai (Wiyanto, 2010).

Rumput laut telah menarik perhatian dalam industri pangan dan akuakultur sebagai bahan alami yang aman dan dapat diterima secara luas oleh konsumen untuk digunakan sebagai pengawet alami (Mendes, 2018). Secara umum, rumput laut dikategorikan ke dalam tiga divisi, yaitu *Chlorophyta*, *Phaeophyta*, dan *Rhodophyta* (Sarita *et al.*, 2021). Salah satu sumber alami yang berpotensi sebagai bahan antimikroba alami untuk pangan adalah *Sargassum polycystum*, salah satu jenis rumput laut coklat (*Phaeophyceae*), diketahui mengandung berbagai senyawa aktif metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan polifenol (Damongilala *et al.*, 2021). Selanjutnya dijelaskan pula bahwa *Sargassum polycystum* telah terbukti berperan sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus*. Hingga kini, belum ada studi yang secara spesifik mengidentifikasi interaksi senyawa bioaktif dalam *Sargassum polycystum* dengan target protein *Bacillus cereus*. Karena itu, perlu penelitian lebih lanjut mengenai efektivitasnya. Seiring perkembangan teknologi, pendekatan *in silico* menjadi metode yang banyak digunakan untuk menelusuri dan memprediksi potensi

senyawa alami sebagai pengawet atau agen antimikroba alami dalam pangan dengan target protein spesifik dari bakteri seperti *Bacillus cereus*.

Metode *in silico* merupakan teknik yang menggunakan simulasi komputer untuk memprediksi aktivitas dan sifat molekul sebelum dilakukan pengujian lebih lanjut di laboratorium (Herman, 2019). Pendekatan ini dinilai lebih ekonomis karena dapat menghemat biaya penelitian, mempercepat waktu analisis, serta tidak memerlukan penggunaan hewan uji (Gunawan *et al.*, 2021; Sinurat *et al.*, 2021). Analisis *in silico* untuk mengidentifikasi senyawa aktif yaitu dengan menggunakan metode *molecular docking* atau yang dikenal dengan simulasi penambatan molekul. *Molecular docking* merupakan salah satu metode CADD (*Computer Aided Drug Design*) yang dapat digunakan untuk memberikan gambaran interaksi suatu senyawa terhadap protein target dengan memprediksi bentuk atau susunan tiga dimensi dari sebuah molekul dan energi ikatannya (Hasan *et al.*, 2022). Dalam melakukan penambatan molekul dibutuhkan beberapa aplikasi penunjang, ligan, dan reseptor protein. Ligan adalah senyawa aktif yang terikat pada asam-asam amino suatu protein, sedangkan reseptor protein merupakan molekul tempat terikatnya ligan, umumnya memiliki ukuran molekul yang besar (Syahputra, 2015). Protein berperan sebagai kunci, sedangkan ligan sebagai gembok (*lock and key*). Protein yang digunakan *Bacillus cereus* untuk pada *molecular docking* adalah phosphopentomutase (PDB:3M8Z) (Wee Ye Zhi *et al.*, 2024), sedangkan ligan yang digunakan adalah senyawa yang diperoleh dari database yang telah tersedia sebelumnya, seperti hasil identifikasi GC-MS yang dilaporkan dalam penelitian terdahulu serta dari database publik seperti PubChem, yang menyediakan struktur senyawa dalam format digital.

Berdasarkan permasalahan tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi potensi senyawa aktif metabolit sekunder *Sargassum polycystum* sebagai kandidat pengawet alami terhadap *Bacillus cereus* salah satu kontaminan pada sushi menggunakan pendekatan *in silico* melalui metode *molecular docking* yang menggunakan phosphopentomutase sebagai protein target.

1.2 Tujuan dan Manfaat

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi potensi senyawa aktif metabolit sekunder dari rumput laut *Sargassum polycystum* yang dapat menghambat protein *Bacillus cereus* melalui metode *in silico*.

Manfaat dari penelitian ini yaitu sebagai sumber acuan dalam pemanfaatan metode *in silico* untuk mengidentifikasi kandidat pengawet alami yang dapat diaplikasikan dalam bidang teknologi hasil perikanan, khususnya dalam upaya meningkatkan keamanan pangan berbasis produk perikanan. Selain itu, penelitian ini mendukung eksplorasi *Sargassum polycystum* sebagai bahan herbal yang lebih ekonomis dan ramah lingkungan dibandingkan dengan pengawet kimia. Hasil penelitian ini juga dapat menjadi referensi bagi penelitian selanjutnya, termasuk pengujian lebih lanjut menggunakan metode *in vivo* dan *in vitro*.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan selama dua bulan, yaitu pada bulan April sampai Mei 2025. Kegiatan penelitian, khususnya proses *molecular docking* dan analisis data, dilakukan Direktorat Inovasi dan Kekayaan Intelektual Lantai 6, Gedung Rektorat Universitas Hasanuddin, dengan menggunakan fasilitas yang tersedia untuk meningkatkan efisiensi dan efektivitas penelitian.

2.2 Tahap Persiapan

2.2.1. Alat dan Bahan

Bahan dan alat yang digunakan saat penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Tabel 2 sebagai berikut.

Tabel 1. Bahan yang digunakan selama penelitian

Nama Bahan	Fungsi
Protein Phosphopentomutase	Bahan uji <i>in silico</i>

Tabel 2. Alat yang digunakan selama penelitian

Nama Alat	Fungsi
Komputer	Untuk uji <i>in silico</i>
Microsoft Office 2019	Aplikasi pendukung
Autodock Tools	Aplikasi <i>docking</i>
Autodock 4.0	Software <i>docking</i> yang akan menghitung dan menampilkan nilai <i>binding affinity</i> dan RMSD
UCSF Chimera (3D Viewer)	Aplikasi untuk preparasi ligan dan protein
BIOVIA Discovery Studio Visualizer	Aplikasi untuk visualisasi hasil <i>docking</i>

2.3 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan pendekatan *in silico*, yaitu penelitian yang dilakukan secara komputasi melalui simulasi interaksi antara senyawa bioaktif dan protein target tanpa melakukan uji biologis secara langsung di laboratorium. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk memprediksi potensi interaksi antara senyawa hasil identifikasi GC-MS dari rumput laut *Sargassum polycystum* terhadap protein *Bacillus cereus* menggunakan metode *molecular docking*. Pendekatan ini merupakan bagian dari *Computer-Aided Drug Design* (CADD), yang banyak digunakan dalam proses penemuan senyawa aktif metabolit sekunder secara efisien pada tahap awal pencarian kandidat senyawa antibakteri.

2.4 Sumber Data

Data yang digunakan dalam penelitian ini merupakan data sekunder berupa hasil analisis *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) dari ekstrak etanol 96% rumput laut *Sargassum polycystum* yang dilakukan oleh Latifa Baharuddin (2024). Rumput laut tersebut dikumpulkan dari Pulau Khayangan, Kota Makassar, Sulawesi Selatan. Penelitian ini tidak lagi melakukan proses ekstraksi maupun analisis GC-MS secara langsung, melainkan menggunakan hasil identifikasi senyawa bioaktif dari penelitian terdahulu yang telah tersedia dalam bentuk spektra GC-MS.

Struktur tiga dimensi (3D) dari senyawa-senyawa aktif yang teridentifikasi diperoleh melalui database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>), sedangkan protein target yang digunakan adalah phosphopentomutase (PDB ID: 3M8Z) yang diunduh dari RCSB Protein Data Bank (www.rcsb.org). Data-data ini kemudian digunakan dalam proses *molecular docking* untuk memprediksi potensi interaksi senyawa terhadap protein target *Bacillus cereus* secara komputasi *in silico*. Dengan demikian, seluruh data yang digunakan dalam penelitian ini bersumber dari hasil penelitian terdahulu dan situs ilmiah yang dapat diakses oleh publik.

2.5 Prosedur *Molecular Docking*

2.5.1 Preparasi protein (Phosphopentomutase)

Protein yang akan digunakan diunduh dari situs resmi protein data bank RCSB (www.rcsb.org) dalam format PDB. Protein yang digunakan dalam penelitian ini adalah protein phosphopentomutase (PDB ID: 3M8Z) untuk *Bacillus cereus*. Setelah protein diunduh dalam format PDB, protein yang sudah diunduh kemudian divisualisasikan menggunakan Chimera dan dihilangkan residunya. Protein yang sudah tidak memiliki residu ditambahkan atom hidrogen dan disimpan dengan format "pdb". Hal ini berfungsi untuk mempersiapkan kebutuhan *docking* yang meliputi protein target.

2.5.2 Preparasi Ligan (Senyawa Rumput Laut *Sargassum polycystum*)

Ligan yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari database yang telah tersedia sebelumnya. Data ligan diperoleh dari hasil identifikasi GC-MS yang dilaporkan dalam penelitian terdahulu, serta dari database publik seperti PubChem yang menyediakan struktur senyawa dalam format digital. Struktur 3D senyawa aktif dikumpulkan melalui situs resmi <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dengan mengunduh file berformat SDF dan mengunduh inhibitor kontrol seperti *Tetracycline* untuk *Bacillus cereus*.

Setelah mengunduh senyawa aktif dan inhibitor kontrol yang dibutuhkan, selanjutnya akan divisualisasi menggunakan UCSF Chimera (3D Viewer). Pada tahap ini, atom hidrogen ditambahkan, dan file disimpan dalam format PDB. Langkah ini bertujuan untuk mempersiapkan ligan dan kontrol positif sebelum proses *docking* dengan protein target.

2.5.3 Proses *Docking*

Proses *docking* dilakukan menggunakan aplikasi AutoDock Tools dan *software* AutoDock4. Preparasi protein *Bacillus cereus* (phosphopentomutase) serta inhibitor kontrol *Tetracycline* dilakukan dengan memasukkannya ke dalam *software* AutoDock Tools. Selanjutnya, grid box diatur dengan ukuran 120×120×120 untuk menentukan sisi aktif protein. Setelah ditemukan sisi aktif dari protein dengan konformasi yang sesuai, maka preparasi ligan dimasukkan dan disesuaikan dengan konformasi dari inhibitor kontrol. Grid box kemudian diperkecil menjadi 40×40×40 untuk fokus pada area interaksi.

Software AutoDock4 dijalankan untuk menghitung nilai *binding affinity* dan RMSD dari setiap bentuk struktur molekul atau interaksi yang terjadi. Hasil interaksi antara ligan dan protein dianalisis menggunakan *Biovia Discovery Studio*, yang menampilkan model perlekatan dalam bentuk 3D dan 2D.

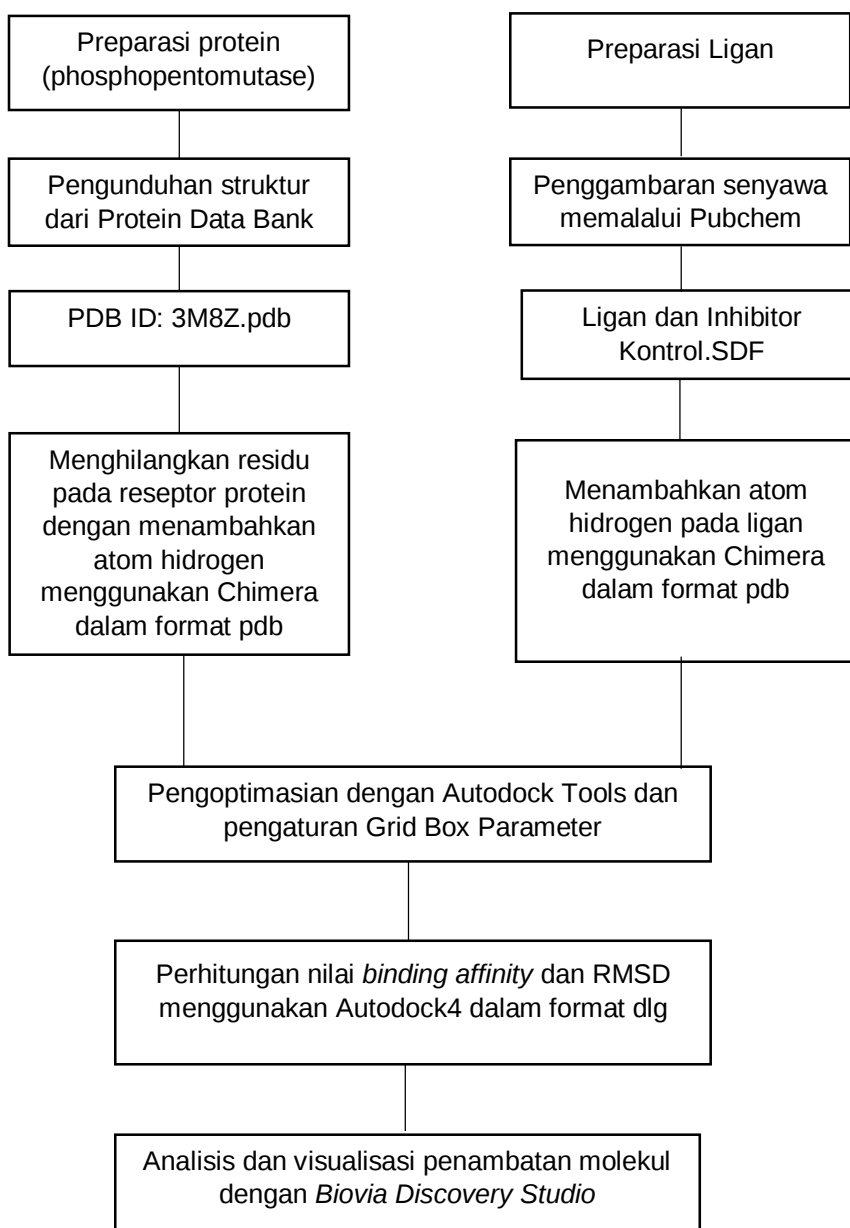
2.5.4 Visualisasi Interaksi Ligan Senyawa dengan Reseptor

Visualisasi analisis docking dilakukan menggunakan perangkat *Biovia Discovery Studio* untuk menggambar residu-residu asam amino dan melihat letak dan model perlekatan pada target protein.

Seluruh tahapan penelitian yang meliputi persiapan protein, persiapan ligan, proses *docking*, perhitungan parameter, serta analisis dan visualisasi hasil dirangkum dalam diagram alir pada Gambar 1.

2.6 Analisis Data

Molecular docking dan analisis data *docking* digunakan untuk menentukan nilai *binding affinity* dan RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dari interaksi antara ligan dan reseptor. Nilai *binding affinity* menunjukkan kekuatan ikatan antara ligan dan protein target, di mana semakin kecil nilainya, maka semakin kuat interaksinya. Selain itu, kualitas hasil *docking* dilihat dari nilai RMSD, yaitu parameter yang membandingkan posisi atom ligan sebelum dan sesudah proses *docking*. Nilai $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ menunjukkan bahwa posisi ligan dalam kompleks hasil *docking* masih sesuai dengan konformasi awalnya, sehingga penambatan molekul dianggap berhasil. Oleh karena itu, senyawa dengan *binding affinity* rendah (negatif) dan $\text{RMSD} \leq 2,0 \text{ \AA}$ dianggap berpotensi sebagai kandidat antibakteri.



Gambar 1. Diagram Alir Penelitian