

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Antibiotik telah menjadi pilar utama dalam pengobatan infeksi bakteri sejak pertama kali diperkenalkan. Namun, dalam beberapa dekade terakhir, efektivitas antibiotik semakin terancam oleh meningkatnya resistensi antimikroba. Resistensi antimikroba (antimicrobial resistance/AMR) didefinisikan sebagai kemampuan mikroorganisme untuk bertahan hidup atau terus berkembang meskipun terpapar agen antimikroba pada konsentrasi yang seharusnya efektif. WHO telah menetapkan AMR sebagai salah satu ancaman terbesar terhadap kesehatan masyarakat dan pembangunan global. Pada tahun 2019, AMR diperkirakan bertanggung jawab langsung terhadap 1,27 juta kematian di seluruh dunia, dan jumlah ini diproyeksikan meningkat hingga sekitar 10 juta kematian per tahun pada tahun 2050 apabila tidak dilakukan upaya pengendalian yang efektif (WHO, 2023). Percepatan munculnya resistensi antibiotik sangat dipengaruhi oleh aktivitas manusia, terutama penggunaan dan penyalahgunaan antimikroba secara berlebihan maupun tidak rasional dalam pencegahan dan pengobatan infeksi (WHO, 2023).

Salah satu patogen yang paling mengkhawatirkan dalam konteks AMR adalah *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA merupakan varian *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap methicillin dan antibiotik β -laktam sejenis, termasuk oksasilin, yang secara historis digunakan sebagai terapi utama infeksi bakteri Gram-positif (Hou et al., 2023). MRSA menjadi fokus penting dalam penelitian karena tidak hanya menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi, tetapi juga berasosiasi dengan luaran klinis yang lebih buruk dibandingkan infeksi *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap antibiotik. Berbagai laporan dan kajian sistematis menunjukkan bahwa infeksi MRSA berkaitan dengan peningkatan risiko komplikasi, perpanjangan lama rawat inap, serta peningkatan mortalitas relatif dibandingkan infeksi *Staphylococcus aureus* non-resisten (Abebe & Birhanu, 2023).

MRSA pertama kali diidentifikasi pada tahun 1961, dan sejak itu telah berkembang menjadi bakteri yang resisten antimikroba (AMR) utama di seluruh dunia (Ali Alghamdi et al., 2023). Penularan MRSA dapat terjadi melalui kontak langsung dengan individu terinfeksi, perpindahan dari benda yang terkontaminasi ke manusia, maupun dari pembawa asimtomatik ke individu lain (Nandhini et al., 2022). Infeksi MRSA dikenal sulit diobati dan sering menyebabkan manifestasi klinis berat, seperti keracunan makanan, endokarditis pogenik, pneumonia supuratif, otitis media, osteomielitis, serta infeksi kulit dan jaringan lunak (Hasanpour et al., 2023; Algammal et al., 2020). Studi epidemiologi terbaru juga menunjukkan bahwa prevalensi MRSA terus meningkat, terutama di rumah sakit dan fasilitas perawatan jangka panjang, di mana populasi rentan lebih sering terpapar patogen ini (Hasanpour et al., 2023).

Salah satu mekanisme utama yang berkontribusi terhadap virulensi dan ketahanan MRSA terhadap terapi antibiotik adalah kemampuannya membentuk

biofilm. Biofilm merupakan komunitas bakteri terorganisir yang melekat pada permukaan tertentu dan terlindungi oleh matriks ekstraseluler (Shibamura-fujiogi et al., 2022). Pembentukan biofilm menjadi tantangan besar dalam pengobatan karena tidak hanya melindungi bakteri dari paparan antibiotik, tetapi juga menghambat respons imun inang (Silva et al., 2021). Selain berfungsi sebagai penghalang fisik, bakteri dalam biofilm memiliki aktivitas metabolik yang lebih rendah, sehingga menjadi lebih toleran terhadap antibiotik yang bekerja pada sel aktif membelah. Berbagai tinjauan ilmiah yang tersedia melalui basis data National Institutes of Health (NIH/NCBI) menunjukkan bahwa pembentukan biofilm berperan penting dalam infeksi mikroba, khususnya infeksi kronis dan persisten (Zafer et al., 2024). Akibatnya, infeksi berbasis biofilm jauh lebih sulit ditangani dibandingkan infeksi oleh sel planktonik (Silva et al., 2021).

Oksasilin merupakan antibiotik β -laktam golongan penisilin semisintetik yang termasuk dalam kelompok *penicillinase-resistant penicillins*. Antibiotik ini bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri melalui pengikatan pada *penicillin-binding proteins* (PBPs), yang berperan penting dalam pembentukan peptidoglikan dinding sel bakteri (Lakhundi & Zhang, 2018; Turner et al., 2019). Secara historis, oksasilin digunakan dalam pengobatan infeksi *Staphylococcus aureus* yang sensitif terhadap methicillin dan hingga saat ini tetap digunakan secara luas sebagai indikator fenotipik resistensi methicillin pada *S. aureus* dalam praktik mikrobiologi klinik, sebagaimana direkomendasikan oleh pedoman laboratorium internasional (CDC, 2025; CLSI, 2023). Pada MRSA, efektivitas oksasilin menjadi sangat terbatas akibat ekspresi protein alternatif PBP2a yang dikodekan oleh gen *mecA*. Protein PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap antibiotik β -laktam, sehingga memungkinkan proses sintesis dinding sel tetap berlangsung meskipun bakteri terpapar oksasilin (Foster, 2017). Mekanisme ini merupakan dasar molekuler utama resistensi MRSA terhadap antibiotik β -laktam. Dalam konteks penelitian eksperimental, karakteristik tersebut menjadikan oksasilin sebagai antibiotik model yang representatif untuk mengevaluasi strategi pemulihan sensitivitas β -laktam melalui pendekatan kombinasi, termasuk dalam kondisi resistensi yang diperantarai oleh pembentukan biofilm.

Meningkatnya kasus infeksi akibat bakteri resisten obat mendorong kebutuhan akan strategi antimikroba baru. Namun, pengembangan antibiotik baru berlangsung relatif lambat. Berdasarkan penelusuran di berbagai basis data ilmiah utama, dari tahun 2012 hingga Agustus 2022, hanya ada 22 obat antibiotik baru yang disetujui oleh lembaga pengawas obat utama di dunia, seperti Food and Drug Administration (FDA) di Amerika Serikat dan European Medicines Agency (EMA) di Eropa (García-Castro et al., 2023). Kondisi ini menegaskan bahwa upaya mengatasi resistensi antibiotik tidak dapat hanya bergantung pada penemuan obat baru, tetapi juga memerlukan pendekatan alternatif untuk mengoptimalkan efektivitas antibiotik yang telah tersedia (Miethke et al., 2021).

Salah satu pendekatan yang menjanjikan adalah penggunaan senyawa bioaktif dari tumbuhan sebagai adjuvan antibiotik. Tumbuhan telah lama dikenal sebagai sumber senyawa bioaktif dengan berbagai aktivitas farmakologis,

termasuk antimikroba (Pacyga et al., 2024). Senyawa bioaktif cenderung memiliki mekanisme kerja yang berbeda dari antibiotik konvensional, sehingga berpotensi mengatasi bentuk resistensi tertentu, termasuk resistensi yang berkaitan dengan pembentukan biofilm. Beberapa senyawa bioaktif dilaporkan mampu menghambat pembentukan atau stabilitas biofilm, sehingga memungkinkan antibiotik bekerja lebih efektif pada target bakteri (Wu et al., 2024). Selain itu, senyawa bioaktif dari tumbuhan umumnya memiliki profil toksisitas yang lebih rendah, sehingga relatif aman digunakan dalam kombinasi dengan antibiotik (Pancu et al., 2021).

Sebagai contoh, senyawa isoflavonoid yang diisolasi dari tumbuhan telah menunjukkan potensi besar sebagai adjuvan antibiotik. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa isoflavonoid mampu memperkuat aktivitas ciprofloxacin dan eritromisin terhadap strain MRSA, menunjukkan adanya efek sinergis antara senyawa tersebut dan antibiotik yang diuji. Analisis hubungan struktur-aktivitas (*structure–activity relationship*, SAR) terhadap 22 isoflavonoid lebih lanjut mengonfirmasi potensi senyawa ini sebagai adjuvan antibiotik dalam menghadapi mikroorganisme resisten seperti MRSA (Abreu et al., 2017).

Jika isoflavonoid, sebagai salah satu subkelas flavonoid, mampu menunjukkan efek adjuvan yang signifikan, maka *Morus alba* L. atau murbei putih, yang kaya akan berbagai senyawa flavonoid dan senyawa lainnya, berpotensi memiliki aktivitas yang lebih luas. Daun murbei putih diketahui mengandung beragam senyawa bioaktif seperti flavonoid, tanin, saponin, senyawa fenolik, dan turunan benzofuran yang telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba. Daun murbei putih secara khusus mengandung senyawa seperti kaempferol, quercetin, rutin, serta morusin (flavon prenilasi), yang dilaporkan efektif terhadap berbagai bakteri (Batiha et al., 2023). Dengan kombinasi senyawa bioaktif dari daun murbei putih, senyawa tersebut dapat menjadi sumber potensial adjuvan antibiotik yang inovatif.

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini berfokus pada evaluasi efek potensiasi ekstrak dan fraksi daun murbei putih terhadap aktivitas oksasilin dalam melawan *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang mengembangkan mekanisme resistensi melalui pembentukan biofilm. Pendekatan *in vitro* digunakan untuk menilai efektivitas kombinasi oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih dalam menghambat pertumbuhan bakteri serta pembentukan biofilm MRSA. Sementara itu, pendekatan *in silico* dilakukan untuk memprediksi afinitas dan model interaksi molekuler senyawa bioaktif daun murbei putih terhadap protein target bakteri AgrA dan SarA yang berperan dalam regulasi virulensi dan pembentukan biofilm, serta untuk memprediksi profil farmakokinetik senyawa tersebut. Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan dasar ilmiah awal pada tahap pra-klinis bagi pengembangan strategi terapi kombinasi dalam menghadapi tantangan resistensi antibiotik.

1.2 Perumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana efektivitas kombinasi oksasilin dan ekstrak serta fraksi daun murbei putih dalam menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*?
- 1.2.2 Senyawa bioaktif apa saja yang terkandung dalam daun murbei putih yang berpotensi berperan dalam penghambatan pembentukan biofilm dan sistem regulasi virulensi MRSA?
- 1.2.3 Bagaimana afinitas dan model interaksi molekuler antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif daun murbei putih terhadap protein target spesifik yang terlibat dalam mekanisme resistensi MRSA melalui jalur pembentukan biofilm?
- 1.2.4 Bagaimana prediksi ADMET senyawa bioaktif daun murbei putih berdasarkan analisis *in silico*?

1.3 Tujuan

- 1.3.1 Menilai efektivitas kombinasi oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih dalam menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*.
- 1.3.2 Mengidentifikasi senyawa bioaktif yang terkandung dalam daun murbei putih yang berpotensi berperan dalam penghambatan pembentukan biofilm dan regulasi virulensi MRSA.
- 1.3.3 Menganalisis afinitas dan model interaksi molekuler antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif daun murbei putih terhadap protein target SarA dan AgrA yang berperan dalam regulasi virulensi dan pembentukan biofilm MRSA.
- 1.3.4 Memprediksi ADMET senyawa bioaktif daun murbei putih berdasarkan analisis *in silico*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat Teoritis

- a. Penelitian ini memberikan kontribusi terhadap pengembangan ilmu mikrobiologi dan farmakologi, khususnya dalam pemahaman mengenai potensi interaksi antara antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif daun murbei putih dalam penghambatan pertumbuhan dan pembentukan biofilm *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)
- b. Temuan penelitian ini memperkaya pemahaman mengenai mekanisme resistensi MRSA yang berkaitan dengan pembentukan biofilm dan regulasi virulensi, serta peran senyawa bioaktif tumbuhan dalam memodulasi mekanisme tersebut.
- c. Penelitian ini mendukung pengembangan konsep potensiasi atau efek sinergis antara antibiotik dan senyawa bioaktif tumbuhan, sehingga dapat menjadi rujukan teoretis bagi penelitian lanjutan di bidang pencarian adjuvan antibiotik.

1.4.2 Manfaat Praktis

- a. Hasil penelitian ini dapat menjadi dasar ilmiah awal dalam pengembangan strategi alternatif untuk meningkatkan efektivitas antibiotik terhadap MRSA, khususnya melalui pendekatan terapi kombinasi berbasis senyawa bioaktif tumbuhan.
- b. Penelitian ini memberikan informasi pendukung bagi peneliti di bidang kesehatan dan farmasi mengenai potensi pemanfaatan ekstrak dan fraksi daun murbei putih sebagai kandidat adjuvan antibiotik.
- c. Data yang diperoleh dari penelitian ini dapat dimanfaatkan sebagai referensi awal dalam perancangan penelitian lanjutan terkait pengembangan terapi kombinasi antibiotik dan senyawa alami dalam menghadapi resistensi bakteri.

1.4.3 Manfaat Klinis

- a. Secara klinis, penelitian ini dapat berfungsi sebagai rujukan ilmiah awal pada tahap pra-klinis dalam eksplorasi strategi terapi kombinasi untuk infeksi MRSA yang melibatkan pembentukan biofilm.
- b. Temuan penelitian ini secara konseptual mendukung kemungkinan optimalisasi penggunaan antibiotik melalui pendekatan kombinasi, yang berpotensi berkontribusi pada upaya pengendalian resistensi antibiotik.
- c. Penelitian ini membuka peluang bagi studi pra-klinis dan klinis lanjutan untuk mengevaluasi keamanan dan efektivitas terapi kombinasi berbasis antibiotik dan senyawa bioaktif tumbuhan pada infeksi bakteri resistan.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian *in vitro* dilaksanakan di HUM-RC (Hasanuddin University Medical Research Center) Universitas Hasanuddin. Proses ekstraksi dan fraksinasi daun murbei putih serta analisis *in silico* dilakukan di Laboratorium Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Analisis senyawa menggunakan metode LC-HRMS dilaksanakan di Corpora Science. Penelitian ini dilaksanakan pada periode Agustus 2025 hingga Januari 2026.

2.2 Bahan dan Alat

2.2.1 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi daun murbei putih, etanol 96%, kertas saring, oksasilin, aquades, dimetilsulfoksida (DMSO), NaCl (0,9%) Mueller-Hinton Broth (MHB), Mannitol Salt Agar (MSA), Tryptic Soy Broth (TSB), kristal violet 1,2%, kapas steril, aluminium foil, alkohol 70%, metanol, dan ionization gas. Selain itu, struktur molekul senyawa bioaktif dan oksasilin juga diperoleh dari database PubChem, serta struktur tiga dimensi protein target MRSA dari Protein Data Bank (PDB).

2.2.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rotavapor, timbangan analitik, gunting, penggiling/blender, erlenmeyer, penangas air, oven, pengaduk, autoklaf, tabung reaksi, cawan petri, kapas, aluminium foil, loop steril, spektrofotometer, mikrotiter plate 96-well, microplate reader Epoch 2, pinset, ose, sterilisator bunsen, laminar air flow, hot plate, water bath, refrigerator, timer atau stopwatch, glove box atau safety cabinet, pH meter, inkubator, mikropipet, spatula, vortex mixer, handscoon, dan alkohol 70%. Selain itu, juga digunakan Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), kolom C18, spektrometer massa dengan Electrospray Ionization (ESI), serta perangkat keras dan lunak seperti PC dengan spesifikasi: AMD Ryzen 7 5800X 8-Core Processor @ 3.80 GHz, RAM 32,00, 64-bit *Operating system*, AutoDock Vina, Marvin Sketch, Chimera, PyMOL, Biovia Discovery Studio, YASARA, ADMETlab 2.0, SwissADME, pkCSM, SmartCYP, dan Prottox II.

2.3 Metode Penelitian

Penelitian ini diawali dengan pengujian *in vitro* sebagai penyaringan biologis awal karena bahan uji masih berupa ekstrak dan fraksi kompleks yang bertujuan untuk mengevaluasi efektivitas kombinasi antibiotik oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih dalam menghambat pertumbuhan serta pembentukan biofilm Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Ekstrak daun murbei putih selanjutnya dianalisis menggunakan Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif yang

terkandung di dalamnya. Selanjutnya, dilakukan pendekatan komputasional (*in silico*) untuk menjelaskan kemungkinan mekanisme molekuler yang mendasari hasil *in vitro* yang diperoleh.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Persiapan

Ekstraksi daun murbei putih.

Daun murbei putih diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sebagai ekstrak awal. Serbuk daun kering direndam dalam etanol dengan perbandingan bahan dan pelarut 1:10 selama 24 jam disertai pengadukan berkala. Setelah maserasi, campuran disaring dan filtrat diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ hingga diperoleh ekstrak etanol pekat. Ekstrak etanol selanjutnya difraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair–cair dengan pelarut n-heksana dan etil asetat untuk memperoleh fraksi berdasarkan tingkat kepolaran senyawa (Dewi & Wijaya, 2020; Yunita et al., 2023).

Sterilisasi alat.

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini disterilkan untuk menghindari kontaminasi mikroba. Semua alat gelas yang tahan panas, seperti erlenmeyer, tabung reaksi, dan pipet, disterilkan dalam oven dengan suhu 180°C selama 2 jam (Trusler et al., 2024). Ose dan pinset yang digunakan dalam pengambilan sampel disterilkan melalui pemijaran langsung pada api bunsen hingga berwarna merah menyala (Azzima et al., 2022). Untuk alat-alat yang tidak tahan terhadap suhu tinggi, seperti media kultur dan beberapa alat plastik, dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm (Wulandari et al., 2022).

Persiapan dan sterilisasi media.

Preparasi media MHB, MSA, dan TSB dilakukan dengan melarutkan 4,2 gram bubuk MHB (Oxoid), 22,4 gram bubuk MSA (Oxoid), dan 6 gram bubuk TSB (Oxoid) dalam 200 ml aquades. Larutan tersebut kemudian diaduk hingga semua bubuk larut. Setelah itu, semua media disterilisasi di dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 2 atm. Media MHB dan TSB kemudian didinginkan hingga suhu ruang dan siap digunakan, sedangkan media MSA didinginkan hingga suhu sekitar 50°C dan dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilkan.

Persiapan larutan uji.

Ekstrak dan fraksi daun murbei putih dan oksasilin dipersiapkan sebagai larutan stok dengan konsentrasi $6400\ \mu\text{g/mL}$. Prosedur dimulai dengan melarutkan 6,4 mg ekstrak dan fraksi daun murbei putih serta 6,4 mg oksasilin masing-masing ke dalam 1 mL DMSO murni (100%). Larutan ini diaduk hingga senyawa larut sepenuhnya. Larutan stok ini kemudian digunakan

untuk pengenceran lebih lanjut sesuai dengan kebutuhan eksperimen (Sitorus, 2018).

Persiapan bakteri uji.

Persiapan bakteri uji dilakukan dengan menggunakan strain Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) yang diperoleh dari koleksi laboratorium. Kultur MRSA dilakukan dengan menginokulasi sampel bakteri ke dalam media Mannitol Salt Agar (MSA) menggunakan ose steril. Kemudian, cawan petri yang berisi media MSA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Setelah inkubasi, koloni bakteri diambil menggunakan loop steril dan disuspensikan dalam larutan saline steril (NaCl 0,9%) hingga mencapai kekeruhan setara dengan standar 0,5 McFarland, yang setara dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (Sitorus, 2018).

2.4.2 Pengujian efektivitas (*in vitro*)

Uji Minimal Inhibitory Concentration (MIC) dan Checkerboard Assay.

Pengujian ini dilakukan untuk menentukan Minimal Inhibitory Concentration (MIC) oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih secara individual, serta mengevaluasi efek kombinasi keduanya terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) menggunakan metode checkerboard assay, mengacu pada prosedur Abreu et al. (2017) dan Sultan, A.R. (2022) dengan beberapa penyesuaian.

Suspensi MRSA 0,5 McFarland yang telah diencerkan 1:100 dalam Mueller-Hinton Broth (MHB) digunakan untuk menyiapkan pengenceran serial ekstrak dan fraksi daun murbei putih pada 96-well U-bottom microplate menggunakan metode dilusi dua kali lipat. Konsentrasi yang dihasilkan untuk setiap senyawa uji adalah 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, dan 0 µg/mL, kemudian microplate diinkubasi pada 37°C selama 15–20 menit. Prosedur serupa diterapkan pada oksasilin, tetapi antibiotik ini hanya diencerkan secara serial dalam MHB tanpa bakteri pada microplate terpisah.

Kedua larutan uji kemudian dikombinasikan: 100 µL oksasilin ditambahkan ke setiap baris sumur secara horizontal dengan konsentrasi menurun, sedangkan 100 µL larutan ekstrak yang telah dicampur dengan suspensi bakteri ditambahkan ke setiap kolom sumur secara vertikal. Dengan demikian, setiap sumur berisi kombinasi konsentrasi oksasilin dan ekstrak yang bervariasi. Volume akhir setiap sumur adalah 200 µL, dengan konsentrasi bakteri akhir sebesar $7,5 \times 10^5$ CFU/mL. Microplate kemudian diinkubasi pada 37°C selama 18–20 jam. Setelah inkubasi, pertumbuhan bakteri dievaluasi melalui pengukuran kepadatan optik (OD) pada panjang gelombang 600 nm, dan data dianalisis menggunakan perangkat lunak Combeneft untuk menentukan apakah kombinasi oksasilin dan ekstrak daun murbei putih menunjukkan efek sinergis, aditif, atau antagonis.

Uji penghambatan biofilm.

Metode ini mengacu pada prosedur yang dikembangkan oleh Sultan, A.R. (2022) dengan beberapa modifikasi untuk menyesuaikan dengan kebutuhan penelitian. Proses dimulai dengan menyiapkan suspensi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 0,5 McFarland, yang kemudian diencerkan dengan media Tryptic Soy Broth (TSB) perbandingan 1:1000. Campuran ini digunakan untuk melakukan pengenceran serial ekstrak daun murbei putih dalam 96-well flat-bottom microplate menggunakan metode dilusi dua kali lipat, sehingga diperoleh konsentrasi akhir sebesar 64, 32, 16, 8, 4, 2, dan 1 µg/mL. Suspensi tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15-20 menit. Prosedur serupa diterapkan pada oksasilin, tetapi antibiotik ini hanya diencerkan secara serial dalam microplate terpisah, menggunakan media TSB tanpa bakteri.

Setelah tahap persiapan, kedua larutan uji dikombinasikan dalam 96-well flat-bottom microplate yang steril. Sebanyak 100 µL larutan oksasilin ditambahkan ke setiap baris sumur, dengan konsentrasi yang menurun secara horizontal, sementara 100 µL larutan ekstrak daun murbei putih yang telah dicampur dengan bakteri ditambahkan ke setiap kolom sumur, dengan konsentrasi yang menurun secara vertikal. Kombinasi ini menghasilkan variasi konsentrasi oksasilin dan ekstrak daun murbei putih dalam setiap sumur. Untuk kontrol, kontrol positif terdiri dari bakteri dalam media kultur tanpa larutan uji, sedangkan kontrol negatif hanya berisi media tanpa bakteri maupun larutan uji. Volume akhir dalam setiap sumur adalah 200 µL, dengan konsentrasi bakteri akhir sebesar $7,5 \times 10^4$ CFU/mL.

Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam dalam inkubator shaker (150 rpm) guna merangsang pertumbuhan dan pembentukan biofilm. Setelah inkubasi, microplate dicuci sekali menggunakan 200 µL aquadest steril untuk menghilangkan bakteri yang tidak menempel, lalu dikeringkan pada suhu ruang. Pewarnaan dilakukan dengan menambahkan 30 µL larutan kristal violet 1,2%, kemudian diinkubasi selama 5 menit pada suhu ruang. Setelah itu, microplate dicuci kembali sebanyak lima kali menggunakan aquadest steril dan dikeringkan untuk memastikan sisa pewarna yang tidak terikat benar-benar terbilas. Setelah pewarnaan, kristal violet yang telah terikat dalam setiap sumur dilarutkan menggunakan 200 µL larutan kombinasi (40% etanol + 10% asam asetat + 50% aquadest steril), kemudian dikocok dengan shaker agar tercampur secara homogen. Kepadatan optik (OD) larutan diukur menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 490 nm untuk menentukan jumlah biofilm yang terbentuk.

2.4.3 Analisis senyawa bioaktif

Analisis metabolit dilakukan menggunakan teknik LC–HRMS yang menggabungkan UHPLC dengan Orbitrap beresolusi tinggi. Sistem ini digunakan untuk memperoleh data massa yang akurat dan sensitif. Pemisahan senyawa dilakukan menggunakan kolom Phenyl Hexyl yang mampu memberikan selektivitas baik terhadap berbagai kelas metabolit.

Fase gerak yang digunakan adalah air dan asetonitril dengan penambahan asam format, sedangkan program gradien dirancang agar senyawa dengan kepolaran berbeda dapat terelusi dalam satu kali analisis. Akuisisi data dilakukan dalam mode ionisasi positif dan negatif secara komplementer menggunakan ESI, sehingga cakupan metabolit yang terdeteksi menjadi lebih luas. Selain itu, data MS² diperoleh melalui fragmentasi untuk mendukung proses identifikasi dan konfirmasi struktur senyawa (Ningrum & Hasanah, 2025).

2.4.4 Analisis molekuler (*in silico*)

Molecular docking.

Persiapan struktur ligan dan protein

Struktur bioaktif utama dari daun murbei putih, yang diketahui memiliki aktivitas antimikroba, diunduh dari database PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) dalam format 3D (SDF). Struktur oksasilin juga diperoleh dari sumber yang sama. Untuk persiapan lebih lanjut, struktur ini diperiksa dan diedit menggunakan perangkat lunak Marvin Sketch, yang memungkinkan penghapusan atom yang tidak diperlukan dan penambahan atom hidrogen untuk memperbaiki struktur ligan sebelum analisis docking. Struktur kristal protein target kemudian diunduh dari Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) dengan kode PDB yang sesuai. Setelah diunduh, struktur protein ini dipersiapkan dengan menghapus ligan yang terikat, menambahkan atom hidrogen, dan menghitung muatan untuk memastikan protein siap untuk proses docking (Butt et al., 2020).

Proses docking

Proses optimasi ligan dilakukan dengan menggunakan perangkat lunak Chimera versi 1.17.3 (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>). Untuk memastikan keakuratan struktur protein, digunakan PyMOL versi 2.5 (<https://pymol.org/2>), yang berfungsi memperbaiki struktur, menghilangkan ligan yang tidak diperlukan, serta mengeliminasi molekul air yang mungkin mengganggu interaksi. Selanjutnya, docking dilakukan menggunakan PyRx AutoDock Vina (melalui <https://pyrx.sourceforge.io/>), untuk menghitung afinitas pengikatan, RMSD, residu asam amino, dan jenis interaksi yang terjadi antara ligan yang telah dioptimalkan dan reseptor. Hasil interaksi ligan-reseptor kemudian divisualisasikan dengan perangkat lunak Biovia Discovery Studio Visualizer (<https://www.3dsbiovia.com>) untuk memudahkan analisis. Ligan dengan energi pengikatan atau skor docking terendah, serta menunjukkan interaksi ikatan hidrogen yang signifikan, dipilih sebagai kandidat terbaik (Yasir et al., 2024).

Molecular dynamics simulation.

Persiapan sistem dinamika molekuler

Stabilitas kompleks dari hasil konfirmasi terbaik hasil docking dianalisis melalui simulasi dinamika molekuler menggunakan perangkat lunak YASARA Structure (Ghahremanian et al., 2020). Medan gaya Amber14 digunakan dalam simulasi dengan kondisi lingkungan pada suhu 310 K dan pH 7.4. Sistem dilindungi oleh batas periodik, dengan pelarut TIP3P dan ion penetral (Na⁺ dan Cl⁻) untuk mencapai keseimbangan (Saha et al., 2024).

Prosedur simulasi

Simulasi dijalankan selama 100 ns dengan interval pencatatan data setiap 0.25 fs. Data lintasan dikumpulkan setiap 25 ps dan digunakan untuk menganalisis stabilitas molekul berdasarkan parameter deviasi kuadrat rata-rata (RMSD), fluktuasi kuadrat rata-rata (RMSF), dan jari-jari putaran (*radius of gyration*), guna mengevaluasi kestabilan konfirmasi kompleks (Saha et al., 2024).

2.4.5 Prediksi farmakokinetik dan toksikologi

Prediksi profil farmakokinetika.

Profil farmakokinetika yang mencakup Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi (ADME) akan dianalisis menggunakan beberapa web server, yaitu ADMETlab 2.0 (<https://admetmesh.scbdd.com/>), dan SwissADME (<https://www.swissadme.ch/>), dan pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) (Xiong et al., 2021; Azzam, 2023). Prediksi situs oksidasi oleh enzim CYP450 akan dianalisis dengan SmartCYP (https://smartcyp.sund.ku.dk/mol_to_som) (Zhai et al., 2023).

Uji toksikologi.

Untuk prediksi toksisitas senyawa, server Protox II (https://toxnew.charite.de/protox_II/index.php?site=compound_input) digunakan untuk mengevaluasi tingkat toksisitas potensial pada manusia. Parameter toksik yang dievaluasi termasuk potensi hepatotoksik, toksisitas reproduktif, dan klasifikasi berdasarkan kategori toksisitas (Kusmiati et al., 2024).

2.5 Parameter Pengamatan

2.5.1 *In vitro*

Pengujian MIC dan Checkerboard Assay.

- a. Deskripsi: Menentukan konsentrasi minimal kombinasi oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih yang efektif dalam menghambat pertumbuhan MRSA serta mengevaluasi interaksi kombinasi tersebut, apakah menunjukkan efek sinergis, aditif, tidak ada interaksi, atau antagonis.
- b. Parameter yang diamati: Nilai MIC, yaitu konsentrasi minimal kombinasi oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih yang efektif dalam

menghambat pertumbuhan MRSA. Hasil OD pada checkboard assay dianalisis menggunakan Combobenefit untuk menentukan interaksi kombinasi tersebut terhadap MRSA. Interaksi diklasifikasikan sebagai sinergi (lebih efektif bersama), aditif (efek tambahan kecil), indiferent (tidak berpengaruh), atau antagonis (mengurangi efektivitas).

Penghambatan pembentukan biofilm oleh kombinasi antibiotik oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih melalui uji pembentukan biofilm.

- a. Deskripsi: Menilai kemampuan kombinasi antibiotik oksasilin dengan ekstrak dan fraksi daun murbei putih dalam menghambat pembentukan biofilm MRSA.
- b. Parameter yang diamati: Absorbansi hasil pewarnaan kristal violet pada panjang gelombang OD 490 nm yang mencerminkan tingkat pembentukan biofilm pada berbagai konsentrasi kombinasi senyawa.

2.5.2 Identifikasi senyawa antibakteri menggunakan LC-HRMS

- a. Deskripsi: menentukan senyawa antibakteri bioaktif dalam ekstrak atau fraksi menggunakan LC-HRMS.
- b. Parameter yang diamati: Waktu retensi (retention time) untuk menentukan waktu elusi senyawa, rasio massa terhadap muatan (m/z) untuk identifikasi ion molekular, serta spektrum massa dan pola fragmentasi untuk memahami struktur senyawa.

2.5.3 *In silico*

Kekuatan dan jenis ikatan kombinasi antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif dari daun murbei putih terhadap protein target MRSA.

- a. Deskripsi: Mengukur kekuatan ikatan (afinitas) kombinasi antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif dari daun murbei putih terhadap protein target MRSA.
- b. Parameter yang diamati: Nilai energi pengikatan (binding affinity), tipe-tipe ikatan yang terbentuk (seperti ikatan hidrogen dan interaksi van der Waals), serta residu protein yang berinteraksi dengan kombinasi tersebut.

Stabilitas kompleks senyawa-protein dalam simulasi dinamika molekuler.

- a. Deskripsi: Mengevaluasi stabilitas ikatan antara kombinasi antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif dari daun murbei putih dengan protein target MRSA selama simulasi dinamika molekuler.
- b. Parameter yang diamati: Nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*), RMSF (*Root Mean Square Fluctuation*), dan radius girasi yang menunjukkan kestabilan ikatan kompleks senyawa-protein dalam simulasi 100 nanodetik.

2.5.4 Prediksi profil ADMET kombinasi senyawa

- a. Deskripsi: Menilai profil ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) dari kombinasi antibiotik oksasilin dan senyawa bioaktif dari daun murbei putih.
- b. Parameter yang diamati: Prediksi kemampuan senyawa menembus area tertentu (seperti blood-brain barrier), proses metabolisme melalui enzim CYP450, potensi toksisitas (hepatotoksik, nefrotoksik), serta eliminasi senyawa dari tubuh.