

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Resistensi antibiotik telah menjadi masalah kesehatan global yang mendesak dan memerlukan pendekatan multidisiplin. Berdasarkan laporan dari *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), diperkirakan sekitar 33.000 kematian terjadi setiap tahun di Eropa akibat infeksi yang disebabkan oleh bakteri resisten. Kematian akibat resistensi antimikroba mencapai 700 ribu orang per tahun dan diprediksi di tahun 2050 bisa mencapai 10 juta orang per tahun di seluruh dunia (Dias et al., 2022). Angka ini menegaskan pentingnya pengembangan strategi baru untuk menghadapi ancaman resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik tidak hanya berdampak pada individu yang terinfeksi, tetapi juga membebani sistem kesehatan, meningkatkan biaya perawatan, dan memperpanjang waktu perawatan rumah sakit. Oleh karena itu, penelitian ini memiliki relevansi akademis yang tinggi, serta implikasi besar bagi kesehatan masyarakat.

Salah satu mikroorganisme penyebab infeksi yang menunjukkan resistensi yang signifikan adalah *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). MRSA telah berkembang menjadi patogen yang sangat resisten terhadap berbagai antibiotik, termasuk methicillin, yang biasanya digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri. Infeksi MRSA dapat menyebabkan berbagai penyakit serius, mulai dari infeksi kulit hingga sepsis yang berpotensi fatal. Asia adalah kawasan dengan prevalensi > 50% infeksi MRSA yang merupakan tertinggi di seluruh dunia. Prevalensi MRSA terhadap infeksi nosokomial Asia tertinggi terjadi di Negara Iran sebesar 84,6% dengan lokasi di ICU (Fitria et al., 2021). Statistik menunjukkan bahwa prevalensi MRSA di rumah sakit RSUP Dr Soeradji Tirtonegoro Klaten mencapai 50% dari semua infeksi *Staphylococcus aureus*, dan 60% diantaranya resisten terhadap metisilin (Nuryah et al., 2019).

Selain MRSA, *Acinetobacter baumannii* juga menjadi patogen yang sangat berbahaya, terutama di rumah sakit. *Acinetobacter baumannii* dapat menyebabkan infeksi serius seperti infeksi saluran kemih, pneumonia, hingga meningitis. Patogen ini menunjukkan peningkatan resistensi terhadap antibiotik, terutama karbapenem, yang merupakan lini terakhir dalam pengobatan infeksi bakteri Gram-negatif. ECDC melaporkan bahwa lebih dari 25% infeksi *Acinetobacter baumannii* di Eropa telah resisten terhadap karbapenem (European Centre for Disease Prevention and Control). Uji kepekaan *Acinetobacter baumannii* yang diisolasi dari spesimen klinis pasien terhadap beberapa antibiotik di Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSUP Prof. Dr. I.G.N.G Ngoerah Denpasar periode Januari–Desember 2021. Identifikasi bakteri dan uji sensitivitas antibiotik dilakukan menggunakan alat VITEK2. Data yang terkumpul dianalisis secara deskriptif menggunakan SPSS dan disajikan dalam bentuk distribusi frekuensi. Prevalensi infeksi *Acinetobacter baumannii* pada pasien rawat inap sebesar 7.1% dengan dominasi pasien dari ruang non-ICU. Isolat *Acinetobacter baumannii* terbanyak berasal dari sputum selang (30,5%) dan darah (20,2%). Dari data uji kepekaan

terhadap 19 jenis antibiotik didapatkan *Acinetobacter baumannii* paling sensitif terhadap amikacin, trimethoprim/sulfamethoxazole, dan ampicillin/sulbactam dan paling resisten terhadap ceftriaxone, cefoperazone dan cefixime (Yapson, 2023). Hal ini menunjukkan tantangan besar dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh kedua patogen tersebut.

MRSA dan *Acinetobacter baumannii* dikenal sebagai penyebab utama infeksi nosokomial dan komunitas dengan tingkat resistensi antibiotik yang tinggi. Bakteri ini dapat beradaptasi dengan cepat terhadap antibiotik, sebagian besar karena adanya mekanisme resistensi, termasuk pompa efluks. Pompa efluks adalah protein membran yang mengeluarkan zat asing, termasuk antibiotik, dari dalam sel bakteri. Proses ini menurunkan konsentrasi obat dalam sel, sehingga mengurangi efektivitas terapi antibiotik (Li et al., 2023). Penelitian tentang penghambatan pompa efluks telah menjadi fokus utama dalam upaya mengembalikan efektivitas antibiotik konvensional terhadap infeksi yang disebabkan oleh MRSA dan *Acinetobacter baumannii*. Beberapa mekanisme untuk mengatasi resistensi yang dimediasi oleh pompa efluks meliputi penekanan ekspresi gen pengode pompa, pemblokiran protein membran yang terlibat dalam efluks, serta penggunaan pompa efluks inhibitors (EPI) (Verma et al., 2021a). Dalam konteks MRSA, pompa efluks seperti NorA dan MepA telah diidentifikasi sebagai kontributor utama terhadap resistensi antibiotik. Penelitian menunjukkan bahwa bakteri ini dapat mengurangi konsentrasi antibiotik di dalam sel, sehingga memungkinkan mereka untuk bertahan meskipun terpapar obat yang seharusnya mematikan (Li et al., 2023). Sedangkan pada *Acinetobacter baumannii*, pompa efluks seperti AdeABC dan AdeJ berperan penting dalam resistensi terhadap karbapenem, salah satu kelas antibiotik yang paling kuat yang tersedia (Damier-Piolle et al., 2008).

Piperin, senyawa alkaloid utama dalam lada hitam (*Piper nigrum*), telah menarik perhatian dalam dunia penelitian farmasi karena berbagai aktivitas farmakologisnya, termasuk antimikroba, antioksidan, dan peningkatan bioavailabilitas obat (Sharma et al., 2019). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa piperin memiliki potensi sebagai agen antibakteri terhadap berbagai bakteri, termasuk *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (SRS et al., 2020). Selain itu piperin dapat menghambat pompa efluks pada *Pseudomonas aeruginosa* yang resisten terhadap karbapenem, dengan menghambat MexAB-OprM, meningkatkan akumulasi antibiotik, dan menurunkan MIC imipenem, kombinasi piperine (32–64 µg/mL) dan imipenem (1–2 µg/mL) efektif menghambat pompa efluks MexAB-OprM pada *Pseudomonas aeruginosa* (Liu et al., 2023). Mekanisme ini membuka peluang untuk menggunakan piperin dalam meningkatkan efektivitas antibiotik terhadap MRSA dan *Acinetobacter baumannii* Hegeto et al., 2018).

Penelitian lebih lanjut juga berfokus pada pengembangan derivatif piperin yang memiliki afinitas lebih tinggi terhadap target protein pompa efluks. Modifikasi struktural piperin dapat menghasilkan senyawa turunan yang lebih efektif dalam menghambat pompa efluks dan meningkatkan potensi farmakologisnya (Nascimento et al., 2000). Prediksi potensi senyawa piperin dan turunannya sebagai penghambat pompa efluks dapat dilakukan secara *in silico* melalui *molecular docking* dan *molecular dynamic* (MD). *Molecular docking* merupakan simulasi komputasi untuk mempelajari interaksi molekul dan memprediksi struktur tiga dimensi yang optimal, yang dievaluasi dengan fungsi

penilaian untuk menentukan struktur paling realistis. Dengan demikian, *docking* menjadi elemen krusial dalam analisis struktural obat, bertujuan untuk mengoptimalkan bentuk ligan dan protein serta menentukan orientasi relatif keduanya guna meminimalkan total energi bebas dalam sistem (Raval & Ganatra, 2022). Selanjutnya *molecular dynamic* digunakan untuk mengevaluasi fleksibilitas dan stabilitas kompleks molekuler yang diperoleh dari docking. Metode ini memungkinkan analisis sifat struktural, dinamis, dan termodinamika sistem molekuler seperti protein dan membran lipid dalam pelarut. Dengan *molecular dynamic*, konformasi target dapat dieksplorasi lebih dalam, meningkatkan akurasi hasil docking dan evaluasi stabilitas kompleks, terutama pada target fleksibel dengan berbagai konformasi kristalografi (Salo-Ahen et al., 2021; Pinzi & Rastelli, 2019). Langkah selanjutnya adalah prediksi farmakokinetik, dimana prediksi profil farmakokinetik menjadi sangat penting untuk mengoptimalkan terapi obat serta meminimalisir efek samping yang tidak diinginkan. Metode prediksi ini dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, termasuk model matematis, simulasi komputer, dan penggunaan data klinis yang tersedia. Salah satu metode yang paling umum digunakan adalah model farmakokinetik populasi, yang memungkinkan peneliti untuk memahami variasi respon individu terhadap obat berdasarkan karakteristik demografis dan biologis mereka (Ette et al., 2004).

Sebagai langkah lanjutan setelah proses *in silico*, metode *in vitro* digunakan untuk memvalidasi prediksi yang telah dibuat, memungkinkan evaluasi lebih mendalam terhadap efektivitas senyawa yang diidentifikasi serta meningkatkan keakuratan dalam proses pengembangan obat. Pengembangan model ini dilandasi oleh upaya menemukan metode skrining obat yang lebih ekonomis, sehingga memungkinkan proses penyaringan senyawa dilakukan lebih efisien dalam pengembangan obat.

Melalui pendekatan gabungan *in silico* dan *in vitro*, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi senyawa turunan piperin dan mengidentifikasi kandidat terbaik yang dapat digunakan dalam terapi kombinasi dengan antibiotik.

1.2 Rumusan Masalah

1. Bagaimana afinitas dan model interaksi senyawa piperin dan turunannya dengan protein target penyebab *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* dan *Acinetobacter baumannii*?
2. Bagaimana Gambaran *molecular dynamic* senyawa piperin dan turunannya dengan beberapa protein target penyebab resistensi *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* dan *Acinetobacter baumannii* ?
3. Bagaimana prediksi profil farmakokinetik dan toksisitas senyawa piperin dan turunannya?
4. Bagaimana menentukan aktivitas senyawa piperin dan turunannya sebagai penghambat pompa efluks secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Untuk menganalisis afinitas dan model interaksi senyawa piperin beserta turunannya terhadap protein target yang terlibat dalam resistensi *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Acinetobacter baumannii*.
2. Untuk menggambarkan *molecular dynamic* interaksi senyawa piperin dan turunannya dengan beberapa protein target yang berperan dalam resistensi *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Acinetobacter baumannii*.
3. Untuk memprediksi profil farmakokinetik serta potensi toksisitas senyawa piperin dan turunannya melalui metode komputasi.
4. Untuk menilai aktivitas senyawa piperin dan turunannya sebagai penghambat pompa efluks secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini dapat memberikan kontribusi penting dalam memahami mekanisme resistensi antibiotik pada *MRSA* dan *Acinetobacter baumannii* melalui pompa efluks. Dengan pendekatan *in silico*, penelitian ini menganalisis interaksi molekuler senyawa piperin dengan protein target, sementara uji *in vitro* akan menguji efektivitasnya sebagai inhibitor pompa efluks. Penelitian ini diharapkan membuka peluang untuk pengembangan obat baru berbasis piperin dengan efektifitas antibakteri yang lebih baik.

1.5 Teori Penelitian

1.5.1 Pompa Efluks

Pompa efluks memainkan peran penting dalam resistensi antibiotik pada bakteri patogen seperti *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Acinetobacter baumannii*. Sistem pompa efluks memungkinkan bakteri ini memompa keluar antibiotik dari sel, sehingga menurunkan konsentrasi intraseluler obat dan mengurangi efektivitasnya.

Pompa efluks adalah protein transpor membran yang terletak di membran sitoplasma atau membran luar (pada bakteri Gram negatif). Ada beberapa pompa efluks, antara lain:

- a. **RND (*Resistance-Nodulation-Division*)**: Termasuk sistem seperti AcrAB dan MexAB-OprM, yang merupakan pompa efluks multiantibiotik yang menggunakan gradien proton sebagai sumber energi untuk memindahkan molekul keluar.. Umumnya ditemukan pada bakteri Gram negatif, misalnya sistem AcrAB-TolC pada *Escherichia coli*.
- b. **MFS (*Major Facilitator Superfamily*)**: Memiliki transporter yang terdiri dari 12-14 heliks transmembran dan menggunakan kekuatan pergerakan proton sebagai sumber energi. Ditemukan pada bakteri Gram positif dan Gram negatif, seperti protein NorA pada *Staphylococcus aureus*.
- c. **ABC (*ATP-Binding Cassette*)**: Menggunakan ATP untuk menggerakkan pompa memindahkan substrat.

- d. SMR (*Small Multidrug Resistance*): Memiliki kapasitas untuk memompa beberapa jenis senyawa.
- e. MATE (*Multidrug And Toxin Extrusion*): Biasanya memanfaatkan gradien ion Na^+ atau H^+ .

Pada MRSA, pompa efluks seperti NorA merupakan mekanisme utama untuk resistensi terhadap berbagai kelas antibiotik, termasuk fluoroquinolon (Monteiro et al., 2020). Pada *Acinetobacter baumannii*, keberadaan pompa efluks seperti AdeABC dan AdeIJK memberikan kemampuan untuk melawan berbagai antibiotik, termasuk karbapenem dan fluoroquinolon (Abdi et al., 2020). Pompa efluks ini biasanya diatur oleh sistem genetik yang kompleks, termasuk regulator global seperti AdeRS. Selain itu, tekanan seleksi di lingkungan rumah sakit sering kali mempercepat evolusi pompa ini, sehingga memperburuk resistensi (Gaurav et al., 2023).

Strategi terapi baru yang menargetkan pompa efluks telah menjadi area penelitian yang penting. Inhibitor spesifik terhadap pompa ini sedang dikembangkan untuk menghambat mekanisme resistensi, memungkinkan antibiotik yang ada bekerja lebih efektif.

1.5.2 Metode *in silico*

a. *Molecular docking*

Metode *in silico molecular docking* adalah teknik komputasi yang digunakan untuk memprediksi interaksi antara molekul, khususnya antara ligan (molekul kecil) dan target protein. Teknik ini menjadi semakin penting dalam pengembangan obat modern, karena dapat mempercepat proses penemuan obat dengan mengurangi biaya dan waktu yang diperlukan untuk eksperimen laboratorium. *Molecular docking* memungkinkan peneliti untuk mensimulasikan dan memvisualisasikan bagaimana ligan berikatan dengan situs aktif protein, yang sangat membantu dalam merancang molekul obat yang lebih efektif (Klebe, 2006).

Dalam konteks penelitian, metode *molecular docking* biasanya melibatkan beberapa langkah, termasuk persiapan struktur protein dan ligan, pemilihan algoritma docking, serta analisis hasil docking. Proses ini dimulai dengan pengunduhan struktur protein dari basis data seperti Protein Data Bank (PDB), yang menyediakan informasi tiga dimensi tentang struktur protein yang telah ditentukan. Setelah itu, ligan yang akan diuji juga harus dipersiapkan dengan cara yang sama, termasuk pengoptimalan geometri dan penentuan muatan listrik (Morris et al., 2009).

Salah satu aspek kunci dari metode docking adalah pemilihan algoritma yang tepat. Ada berbagai algoritma yang dapat digunakan, seperti *algoritma grid-based*, *algoritma Monte Carlo*, dan *algoritma genetic*. Setiap algoritma memiliki kelebihan dan kekurangan masing-masing, tergantung pada kompleksitas sistem yang sedang diteliti. Misalnya, *algoritma grid-based* sering digunakan untuk sistem yang lebih besar karena efisiensinya dalam menghitung interaksi, sementara *algoritma Monte Carlo* lebih cocok untuk simulasi yang memerlukan eksplorasi ruang konfigurasi yang lebih luas (Yang et al., 2022).

Keberhasilan metode *molecular docking* juga sangat bergantung pada kualitas model protein dan ligan yang digunakan. Kesalahan dalam pemodelan

dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat, sehingga penting untuk menggunakan teknik pemodelan yang valid. Misalnya, dalam penelitian yang dilakukan oleh Koes et al. (2013), peneliti menunjukkan bahwa penggunaan model protein yang dihasilkan dari teknik homologi dapat meningkatkan akurasi prediksi interaksi ligan. Dengan demikian, validitas dan reliabilitas hasil docking sangat tergantung pada kualitas input data yang digunakan.

Dalam prakteknya, metode *in silico* docking telah diterapkan dalam berbagai studi kasus untuk menemukan kandidat obat baru. Sebagai contoh, penelitian yang dilakukan oleh Volarath et al tahun 2007 menunjukkan bagaimana *molecular docking* digunakan untuk menemukan inhibitor potensial terhadap enzim protease HIV. Hasil docking menunjukkan beberapa senyawa yang memiliki afinitas tinggi terhadap situs aktif enzim, yang kemudian diuji lebih lanjut dalam eksperimen biologi. Ini menunjukkan bahwa metode *molecular docking* tidak hanya sekadar alat prediksi, tetapi juga dapat menjadi langkah awal yang penting dalam pengembangan obat.

b. Molecular dynamic

Molecular dynamic (MD) merupakan salah satu metode *in silico* yang digunakan untuk mempelajari perilaku dan interaksi molekul dalam sistem biologis. Metode ini memungkinkan peneliti untuk mensimulasikan gerakan atom dan molekul dalam waktu yang ditentukan, memberikan wawasan yang mendalam mengenai struktur dan dinamika biomolekul. Dalam konteks penelitian, MD sering diterapkan untuk memahami mekanisme interaksi antara protein dan ligan, serta untuk memprediksi stabilitas dan konformasi protein dalam berbagai kondisi lingkungan (Oladejo et al., 2023).

Salah satu keunggulan dari metode MD adalah kemampuannya untuk memberikan informasi temporal yang detail mengenai sistem yang diteliti. Dengan menggunakan algoritma tertentu, MD dapat memprediksi bagaimana molekul akan berperilaku seiring berjalannya waktu, yang sangat penting dalam studi interaksi biomolekuler. Misalnya, dalam penelitian tentang protein *G-Protein Coupled Receptors* (GPCRs), MD telah digunakan untuk mempelajari perubahan konformasi yang terjadi ketika ligan berikatan dengan reseptor, yang berimplikasi pada pengembangan obat (Zou et al., 2019).

Statistik menunjukkan bahwa penggunaan metode MD dalam penelitian biomedis terus meningkat. Menurut laporan dari Nature Reviews Drug Discovery, lebih dari 70% penelitian yang melibatkan simulasi *in silico* dalam dekade terakhir menggunakan metode MD untuk mempelajari interaksi biomolekuler. Peningkatan ini menunjukkan pentingnya MD dalam mendukung penelitian dan pengembangan di bidang farmasi dan bioteknologi (Ganesan et al., 2017).

c. Prediksi profil farmakokinetik

Farmakokinetik adalah ilmu yang mempelajari bagaimana obat diserap, didistribusikan, dimetabolisme, dan diekskresikan dalam tubuh. Dalam konteks ini, prediksi profil farmakokinetik menjadi sangat penting untuk mengoptimalkan terapi obat serta meminimalisir efek samping yang tidak diinginkan. Metode prediksi ini

dapat dilakukan melalui berbagai pendekatan, termasuk model matematis, simulasi komputer, dan penggunaan data klinis yang tersedia. Salah satu metode yang paling umum digunakan adalah model farmakokinetik populasi, yang memungkinkan peneliti untuk memahami variasi respon individu terhadap obat berdasarkan karakteristik demografis dan biologis mereka (Pires et al., 2015a).

PKCSM (*Pharmacokinetics, Toxicity, and Chemical Space Modeling*) merupakan alat berbasis *in silico* yang menggunakan metode machine learning untuk memprediksi parameter farmakokinetik suatu senyawa. PKCSM dapat memperkirakan parameter ADME seperti permeabilitas usus, ikatan dengan protein plasma, permeabilitas darah-otak, dan ekskresi ginjal. Dalam konteks prediksi absorpsi, PKCSM menggunakan model berbasis properti lipofilisitas ($\log P$), polar surface area (PSA), serta aturan *Lipinski* untuk menilai kelayakan suatu senyawa dalam menembus membran biologi (Pires et al., 2015b). Selain itu, PKCSM juga dapat memprediksi interaksi metabolisme dengan enzim sitokrom P450 (CYP), yang merupakan faktor penting dalam detoksifikasi obat di dalam hati.

SwissADME merupakan alat prediksi farmakokinetik yang dikembangkan oleh Swiss Institute of Bioinformatics. Metode ini menggunakan berbagai model komputasi untuk menilai parameter farmakokinetik serta sifat fisikokimia dari suatu senyawa, termasuk parameter *Lipinski's Rule of Five*, $\log P$, dan bioavailabilitas. SwissADME juga memungkinkan prediksi spesifik terhadap interaksi senyawa dengan transporter serta permeabilitasnya terhadap berbagai membran biologis, termasuk penetrasi ke dalam sistem saraf pusat. Salah satu keunggulan SwissADME adalah kemampuannya dalam memprediksi sifat farmakokinetik berbasis gastrointestinal (GI) *absorption* dan *P-glycoprotein* (P-gp) substrate, yang menentukan distribusi dan eliminasi obat dalam tubuh). Selain itu, SwissADME juga dapat digunakan untuk menilai potensi suatu senyawa dalam menembus sawar darah-otak (BBB), yang merupakan faktor penting dalam pengembangan obat neurologis (Daina et al., 2017).

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Lokasi dan Waktu

Penelitian *in silico* dilakukan di Laboratorium Kimia Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin dan penelitian *in vitro* akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang dimulai bulan Maret 2025 sampai dengan Juli 2025.

2.2 Alat Dan Bahan

Alat yang digunakan pada studi *in silico* ini terdiri dari perangkat keras berupa PC dengan spesifikasi: AMD Ryzen 7 5800X8-Core Processor @3.80 GHz, RAM 32.00, 64-bit Operating system, Autodock Vina, *chem draw*, USFC Chimera, BIOVIA Discovery Studio Visualizer dan Yasara Structure dan PKCSM Online Tools. Alat pengujian observatif meliputi autoklaf, beaker glass, cawan petri, jarum ose, labu erlenmeyer, *Biological Safety Cabinet* (BSC), mikro pipet.

Bahan yang digunakan adalah biakan murni tersimpan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* dan *Acinetobacter Baumannii* koleksi laboratorium mikrobiologi klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, etidium bromide, media MHA (*Mueller-Hinton Agar*), media MacConkey Agar, media MSA (*Mannitol Salt Agar*), media MHB (*Mueeller-hinton broth*), senyawa piperin dan turunannya, DMSO 100%, aquadest, tabung Eppendorf, tip dan microplate 96-well

2.3 Prosedur Kerja

2.3.1 Uji *in silico* senyawa turunan piperin

a. *Molecular docking*

Struktur ligan dibuat menggunakan aplikasi Marvin Sketch. Protein target yang digunakan untuk *Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah NorA (PDB ID: 7LO7) dan MepA (PDB ID: 5C6N), sedangkan untuk *Acinetobacter baumannii*, protein target yang digunakan adalah AdeB (PDB ID: 7KGG) dan MacB (PDB ID: 5WS4) (Verma et al., 2021b); (Santos et al., 2023) (Roy et al., 2022) diunduh dari protein data bank ([https://www.rcsb.org./](https://www.rcsb.org/))

UCSF-Chimera yang terhubung dengan *Autodock Vina* digunakan untuk melakukan *Molecular docking*. Tahap pertama dimulai dari preparasi struktur ligan dan protein dengan menggunakan menu *dock-prep*. Selanjutnya dilakukan proses docking dengan menentukan *grid-box* dan direktori penyimpanan file melalui menu *Autodock Vina*. Adapun visualisasi hasil docking dilakukan menggunakan aplikasi Discovery Studio (Butt et al., 2020)

b. *Molecular dynamic*

Stabilitas kompleks dari hasil konformasi terbaik pada tahap penambatan molekul dianalisis lebih lanjut menggunakan simulasi dinamika molekuler pada perangkat lunak YASARA Structure (YASARA Bioscience GmbH, Wina, Austria) (Land & Humble, 2018) Medan gaya yang digunakan adalah Amber14 dalam kondisi batas periodik. Kompleks

diatur pada suhu 310 K dan pH 7,4. Pelarut TIP3P dan counterion (Na^+ , Cl^-) ditambahkan untuk menetralkan sistem. Kemudian, sistem dijalankan selama 100 ns pada rentang waktu 0,25 fs. Data lintasan dikumpulkan setiap 25 ps dan digunakan untuk menganalisis deviasi kuadrat rata-rata (RMSD), fluktuasi kuadrat rata-rata (RMSF), dan jari-jari putaran (Mark & Nilsson, 2001).

c. Prediksi ADMET

Pada tahap ini, dilakukan prediksi profil farmakokinetika yakni Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, dan Ekskresi menggunakan webserver SwissADME (<https://www.swissadme.ch/index.php>) (Daina et al., 2017b) pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/prediction>) Sedangkan untuk pengujian toksikologi menggunakan pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/prediction>) (Pires et al., 2015a)

2.3.2 Pengujian Aktivitas Anti-pompa Efluks

a. Sterilisasi alat

Alat-alat dicuci menggunakan deterjen, kemudian dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Alat gelas disterilkan dalam oven yang telah dipanaskan pada suhu 180°C selama 2 jam. Ose dan pinset disterilkan dengan cara pemijaran langsung di atas nyala api. Alat-alat yang tidak tahan panas disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Pembuatan Media

Medium MHA (*Mueller-Hinton Agar*) sebanyak 3,4 gram dilarutkan dalam 100 ml aquadest. Medium dipanaskan sampai larut sempurna. selanjutnya medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium MHB (*Mueller-Hinton Broth*) sebanyak 4,2 gram dilarutkan dalam 200 ml aquadest selanjutnya medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium *MacConkey Agar* ditimbang sebanyak 9,9 gram dilarutkan dengan aquadest 200 ml selanjutnya medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Medium *Mannitol Salt Agar* ditimbang sebanyak 11,1 gram dilarutkan dengan aquadest 200ml selanjutnya medium disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

b. Penyiapan Bakteri Uji

Strain bakteri yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari *Acinetobacter baumannii* dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) biakan murni tersimpan koleksi laboratorium mikrobiologi klinik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanudin Makassar. Kedua strain bakteri tersebut disimpan pada suhu 4°C dan dipelihara melalui subkultur pada media agar sebelum dilakukan proses inkubasi. *Acinetobacter baumannii* dikultur pada media MacConkey agar, sementara MRSA ditumbuhkan pada *Mannitol Salt Agar* (MSA), dengan inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah periode inkubasi, suspensi bakteri disiapkan dengan

menyesuaikan kekeruhan larutan hingga mencapai standar 0,5 *McFarland*, yang setara dengan sekitar $1,5 \times 10^8$ CFU/mL

c. Pembuatan Larutan Uji

Senyawa piperin dan turunannya dipersiapkan sebagai larutan stok dengan konsentrasi 6400 µg/mL. Prosedur preparasi dilakukan dengan melarutkan 6,4 mg senyawa tersebut ke dalam 1 mL dimetilsulfoksida (DMSO) murni (100%).

d. Pengujian Checkerboard

Suspensi 0,5 *McFarland Acinetobacter baumannii* atau MRSA yang telah diencerkan 1:100 dalam *Mueller-Hinton Broth* (MHB), digunakan untuk menyiapkan pengenceran serial senyawa piperin dan turunannya dalam microplate menggunakan metode dilusi dua kali lipat. Pengenceran ini menghasilkan berbagai konsentrasi, yaitu 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, dan 0 µg/mL, microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 15 menit. Prosedur serupa diterapkan pada antibiotik meropenem (untuk *Acinetobacter baumannii*) atau ciprofloxacin (untuk MRSA), tetapi antibiotik tersebut hanya diencerkan secara serial dalam MHB tanpa bakteri dan dilakukan pada microplate terpisah.

Selanjutnya, kedua isi microplate dikombinasikan: 100 µL larutan meropenem atau ciprofloxacin ditambahkan ke setiap baris sumur dalam microplate, dengan konsentrasi yang menurun secara horizontal, sementara 100 µL larutan piperin + bakteri ditambahkan ke setiap sumur, dengan konsentrasi yang menurun secara vertikal. Selanjutnya microplate antibiotik ditambahkan ke microplate senyawa, dengan cara ini setiap sumur dalam microplate mengandung kombinasi konsentrasi meropenem/ciprofloxacin dan senyawa piperin (turunannya) yang bervariasi yaitu 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 dan 0 µg/mL.

Volume akhir dalam setiap sumur adalah 200 µL, dengan konsentrasi akhir bakteri sebesar $7,5 \times 10^5$ CFU/mL. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah inkubasi, kepadatan optik diukur pada panjang gelombang 600 nm, dan hasilnya dianalisis menggunakan perangkat lunak Combenefit untuk menentukan apakah kombinasi obat menunjukkan efek sinergis atau antagonis. (Prosedur ini dimodifikasi dari (Abreu et al., 2017; Sultan et al., 2021).

e. Pengujian Aktivitas Penghambatan Pompa Efluks

Pengujian aktivitas penghambatan pompa efluks dilakukan untuk menilai aktivitas senyawa sebagai penghambat pompa efluks. Isolat bakteri dikultur semalam pada media Mannitol Salt Agar (MSA) untuk *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Media MacConkey Agar untuk *Acinetobacter baumannii* dengan target protein. Setelah 18 jam, suspensi bakteri disesuaikan dengan standar McFarland 0,5. Media *Mueller-Hinton Agar* (MHA) yang mengandung Etidium Bromida (2 mg/mL EtBr-MH) digunakan sebagai media uji. Bakteri diapukan pada seluruh permukaan media MHA yang mengandung EtBr menggunakan kapas steril, kemudian ditetaskan masing-masing 20 µL larutan senyawa uji dengan konsentrasi 32 µg/mL. Omeprazole digunakan sebagai kontrol positif (32 µg/mL), sementara DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Media kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah inkubasi, hasil diamati di bawah sinar

UV menggunakan perangkat *gel documentation system (geldoc)* dengan panjang gelombang 365 nm. Adanya cincin fluoresensi di sekitar zona penghambatan menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pompa efflux (Ghosh et al., 2020). Intensitas fluoresensi disekitar zona fluoresensi selanjutnya diukur menggunakan imageJ.