

**BAKTERI ENDOSIMBION CACING TANAH: MENGUNGKAP POTENSI
SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA
IN-VITRO DAN IN-SILICO**

PENULIS

Prof. Dr. Dirayah Rauf Husain, DEA dan Rihuh Wardhani, S.Si

DAFTAR ISI

SAMPUL.....	1
DAFTAR ISI.....	i
DAFTAR GAMBAR.....	iv
DAFTAR TABEL.....	ix
KATA PENGANTAR.....	x
PRAKATA.....	xi
BAB I.....	1
ANTIBIOTIK.....	1
I.1 Defenisi Antibiotik	1
I.2 Sejarah Antibiotik	2
1.3 Penggolongan Antibiotik	7
1.4 Mekanisme Kerja Antibiotik	18
1.5 Fenomena Resistensi Antibiotik	21
<i>Resistensi karena Mutasi (Mutation Resistance)</i>	23
<i>Horizontal Gene Transfer (HGT)</i>	23
1.6 Managemen Resistensi Antibiotik	24
BAB II.....	27
METODE DALAM EKSPLORASI SENYAWA BARU POTENSIAL SEBAGAI ANTIBIOTIK.....	27
II.1 Metode In-Vitro	27
<i>Difusi Agar</i>	27
<i>Metode gradien antimikroba (Epsilometer test)</i>	29
<i>Metode difusi agar sumuran (Agar well diffusion method)</i>	29
<i>Metode difusi agar plug (Agar plug diffusion method)</i>	30

<i>Cross streak method</i>	31
II.2 Metode In-Silico	31
<i>Prinsip Kerja dan Penerapan Uji In-Silico</i>	31
BAB III	36
CACING TANAH	36
III.1 Deskripsi Umum Cacing Tanah	36
III.2 Sebaran Cacing Tanah	36
III.3 Peranan Cacing Tanah	37
<i>Vermicomposting</i>	37
<i>Nutrient Cycling</i>	38
<i>Pengaturan iklim</i>	40
<i>Remediasi polusi</i>	40
III.4 Klasifikasi Cacing Tanah	40
III.5 Cacing Tanah <i>Pheretima</i> sp.	42
<i>Klasifikasi</i>	42
<i>Karakteristik umum</i>	43
III.6 Cacing Tanah <i>Lumbricus</i> sp.	44
<i>Klasifikasi</i>	44
<i>Karakteristik Umum</i>	44
III.7 Eksistensi Mikroorganisme pada Cacing Tanah sebagai Endosimbion	45
BAB IV	47
STUDI KASUS: MENGUNGKAP POTENSI ANTIBIOTIK SENYAWA BAKTERI ENDOSIMBION SECARA IN-VITRO DAN IN SILICO	47
IV.1 Isolasi Bakteri Endosimbion	47
IV.2 Karakterisasi Morfologi	49

IV.3 Uji Antagonis Bakteri Endosimbion	51
IV.4 Karakterisasi Biokimia	52
<i>Uji Katalase</i>	<i>53</i>
<i>Uji MRVP (Methyl Red-Voges Proskouer)</i>	<i>53</i>
<i>Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)</i>	<i>54</i>
<i>Uji Citrate</i>	<i>54</i>
<i>Uji Indole</i>	<i>55</i>
<i>Uji Motilitas</i>	<i>55</i>
IV.5 Uji Penghambatan Bakteri Patogen.....	55
IV.6 Pengamatan morfologi sel menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) setelah pemberian senyawa bakteri Endosimbion .	59
IV.7 Analisis senyawa dengan LCMS	59
IV.8 Klarifikasi Penghambatan Bakteri Patogen secara In-Silico	63
<i>Penentuan senyawa target</i>	<i>63</i>
<i>Penentuan protein target dengan database senyawa</i>	<i>63</i>
<i>Penentuan Senyawa Protein Target/Makromolekul</i>	<i>74</i>
<i>Pemotongan Senyawa Protein</i>	<i>90</i>
<i>Analisis Senyawa Dengan Teknik Reverse Docking</i>	<i>107</i>
<i>Visualisasi Interaksi Antara Senyawa dengan Protein Target</i>	<i>112</i>
<i>Uji Fisikokimia Senyawa Kandidat Obat</i>	<i>116</i>
<i>Uji ADME/TOX Senyawa Bakteri Endosimbion</i>	<i>119</i>
REFERENSI.....	129

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Sejarah Panjang Penemuan Antibiotik	3
Gambar 2. Struktur senyawa Beta-Lactam.....	8
Gambar 3. Struktur senyawa Beta-Lactam.....	9
Gambar 4. Struktur Monobactams	10
Gambar 5. Struktur Carbapenems	11
Gambar 6. Struktur Macrolide (Erythromycin).....	12
Gambar 7. Struktur Tetrasiklin	13
Gambar 8. Struktur Senyawa Oxazolidinones	14
Gambar 9. Struktur senyawa Cephalosporins	15
Gambar 10. Struktur senyawa Quinolone	15
Gambar 11. Struktur senyawa Sulfonamida	16
Gambar 12. Struktur senyawa Aminoglycoside (Streptomisin)	17
Gambar 13. Mekanisme Kerja Antibiotik	18
Gambar 14. Metode Difusi Agar.....	27
Gambar 15. Metode gradien antimikroba (Epsilometer test).....	28
Gambar 16. Metode difusi agar sumuran (Agar well diffusion method)	29
Gambar 17. Metode difusi agar plug (Agar plug diffusion method).....	30
Gambar 18. Metode Cross Streak Method (Agar plug diffusion method)	30
Gambar 19. Jaringan liang dibuat oleh cacing tanah, spesies anekik dan spesies endogeik. Pengamatan 3D dengan X-ray tomography. (b) Rekonstruksi liang cacing tanah menggunakan perangkat medis dan tomografi sinar-X...	39
Gambar 20. Genus Pheretima (a) Prostomium (epilobus), (b) sebaran seta (Perichaetine), (c) bentuk seta (general), (d) clitelium, (e) tubercula pubertatis, (f) genital tumescence (1 pasang)	43
Gambar 21. Cacing tanah Lumbricus terrestris (CABI, 2019)	44
Gambar 22. Skema Kerja Penelitian.....	47
Gambar 23. Hasil isolasi bakteri endosimbion cacing tanah Lumbricus sp. .	48
Gambar 24. Hasil pemurnian bakteri endosimbion cacing tanah Lumbricus sp. Isolat BLT1 (kiri) dan Isolat BLT2 (kanan)	48
Gambar 25. Morfologi Koloni Isolat BLT1 (kiri) dan BLT2 (kanan)	49
Gambar 26. Hasil Pengecatan Gram Isolat BLT1 (kiri) dan BLT2 (kanan) .	50

Gambar 27. Hasil Uji Antagonis Isolat BLT1 pada Staphylococcus aureus (kiri) dan Salmonella thypi (kanan)	51
Gambar 28. Hasil Uji Antagonis Isolat BLT2 pada Staphylococcus aureus (kiri) dan Salmonella thypi (kanan)	52
Gambar 29. Hasil Uji Daya Hambat supernatan (senyawa ekstraseluler) isolat BLT 1 dan BLT2 pada Staphylococcus aureus (kiri), Salmonella thypi (kanan)	56
Gambar 30. Hasil Uji Daya Hambat senyawa intraseluler isolat BLT 1 pada Staphylococcus aureus (kiri), Salmonella thypi (kanan)	56
Gambar 31. Hasil Uji Daya Hambat isolat BLT 2 pada Staphylococcus aureus (kiri), Salmonella thypi (kanan)	57
Gambar 32. Morfologi kerusakan sel bakteri setelah penambahan senyawa bakteri	59
Gambar 33. Laman awal PubChem	64
Gambar 34. Pencarian senyawa Oleamide	64
Gambar 35. Database senyawa Oleamide pada website PubChem	65
Gambar 36. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Oleamide.....	66
Gambar 37. Tampilan Awal aplikasi Avogadro.....	67
Gambar 38. Tampilan Open aplikasi Avogadro	68
Gambar 39. Visualisasi bentuk senyawa Oleamide dengan aplikasi Avogadro	68
Gambar 40. Penyimpanan senyawa Oleamide dalam bentuk PDB	69
Gambar 41. Pencarian senyawa Dibutyl phthlate	70
Gambar 42. Database senyawa Dibutyl phthlate pada website PubChem.....	70
Gambar 43. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Dibutyl phthlate	71
Gambar 44. Tampilan Awal aplikasi Avogadro.....	72
Gambar 45. Tampilan Open aplikasi Avogadro	72
Gambar 46. Visualisasi bentuk senyawa Dibutyl phthlate dengan aplikasi Avogadro.....	73
Gambar 47. Penyimpanan senyawa Dibutyl phthlate dalam bentuk PDB.....	73
Gambar 48. Halaman Awal UniProt.....	75
Gambar 49. Pencarian DHPS pada kotak pencarian.....	76

Gambar 50. Pemilihan database senyawa DHPS.....	76
Gambar 51. Database senyawa DHPS pada bakteri.....	77
Gambar 52. Tampilan awal situs Protein Data Bank.....	78
Gambar 53. Pencarian kode senyawa DHPS.....	78
Gambar 54. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DHPS.....	79
Gambar 55. Pencarian DNA Gyrase pada kotak pencarian.....	79
Gambar 56. Pemilihan database senyawa DNA Gyrase	80
Gambar 57. Database senyawa DNA Gyrase pada bakteri	80
Gambar 58. 3D Structure Database DNA Gyrase	81
Gambar 59. Tampilan awal situs Protein Data Bank.....	81
Gambar 60. Pencarian kode senyawa DNA Gyrase	82
Gambar 61. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DNA Gyrase	82
Gambar 62. Pencarian DNA Topoisomerase pada kotak pencarian	83
Gambar 63. Pemilihan database senyawa DNA Topoisomerase	83
Gambar 64. Database senyawa DNA Topoisomerase pada bakteri.....	84
Gambar 65. 3D Structure Database DNA Topoisomerase.....	84
Gambar 66. Tampilan awal situs Protein Data Bank.....	85
Gambar 67. Pencarian kode senyawa DNA Topoisomerase	85
Gambar 68. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DNA Topoisomerase.....	86
Gambar 69. Pencarian Outer Membran pada kotak pencarian	86
Gambar 70. Pemilihan database senyawa Outer Membran	87
Gambar 71. Database senyawa Outer Membran pada bakteri.....	87
Gambar 72. 3D Structure Database Outer Membran.....	88
Gambar 73. Tampilan awal situs Protein Data Bank.....	88
Gambar 74. Pencarian kode senyawa Outer Membran.....	89
Gambar 75. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Outer Membran.....	89
Gambar 76. Tampilan awal aplikasi PyMol	90
Gambar 77. Buka File DHPS	91
Gambar 78. Struktur 3D senyawa DHPS	91
Gambar 79. Pemilihan ikatan protein.....	92
Gambar 80. Tahap Pemotongan Protein	92
Gambar 81. Duplikasi senyawa protein.....	93

Gambar 82. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan ikatan selain protein.....	93
Gambar 83. Tampilan senyawa DHPS setelah dibersihkan	94
Gambar 84. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan	94
Gambar 85. Buka File DNA Gyrase.....	95
Gambar 86. Struktur 3D senyawa DNA Gyrase	95
Gambar 87. Pemilihan ikatan protein.....	96
Gambar 88. Tahap Pemotongan Protein	96
Gambar 89. Duplikasi senyawa protein	97
Gambar 90. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan	97
Gambar 91. Tampilan senyawa DNA Gyrase setelah dibersihkan	98
Gambar 92. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan	98
Gambar 93. Buka File DNA Topoisomerase	99
Gambar 94. Struktur 3D senyawa DNA Topoisomerase	99
Gambar 95. Pemilihan ikatan protein.....	100
Gambar 96. Tahap Pemotongan Protein	100
Gambar 97. Duplikasi senyawa protein	101
Gambar 98. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan ...	101
Gambar 99. Tampilan senyawa DNA Topoisomerase setelah dibersihkan..	102
Gambar 100. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan	102
Gambar 101. Buka File Outer membran.....	103
Gambar 102. Struktur 3D senyawa Outer membran.....	103
Gambar 103. Pemilihan ikatan protein.....	104
Gambar 104. Tahap Pemotongan Protein	104
Gambar 105. Duplikasi senyawa protein.....	105
Gambar 106. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan .	105
Gambar 107. Tampilan senyawa Outer membran setelah dibersihkan	106
Gambar 108. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan	106
Gambar 109. Tampilan awal PyRx	108
Gambar 110. Tampilan Vina Wizard PyRx	108
Gambar 111. Tampilan Penambahan Protein Target	109
Gambar 112. Tampilan Penambahan Senyawa	109

Gambar 113. Pilih Forward	110
Gambar 114. Tampilan Pilih Maximize.....	110
Gambar 115. Proses Reverse Docking sedang Berjalan.....	111
Gambar 116. Proses Reverse Docking selesai.....	111
Gambar 117. Menyimpan struktur Docking	111
Gambar 118. Menyimpan Hasil Docking (Binding Affinity)	112
Gambar 119. Tampilan Pymol.....	113
Gambar 120. Tampilan Open File.....	113
Gambar 121. Tampilan Hasil Docking pada Pymol	114
Gambar 122. Tampilan Visualisasi senyawa pada Pymol.....	114
Gambar 123. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlte (merah) dengan Makromolekul DHPS (biru)	115
Gambar 124. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlte (merah) dengan Makromolekul Topoisomerase (biru).....	115
Gambar 125. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlte (merah) dengan Makromolekul Gyrase (biru).....	115
Gambar 126. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlte (merah) dengan Makromolekul Outer Membran (biru)	116
Gambar 127. Tampilan Awal SwissADME	117
Gambar 128. Pilih Run setelah Memasukkan Canonical Smile senyawa.....	117
Gambar 129. Hasil SwissADME.....	118
Gambar 130. Tampilan Awal SwissADME	119
Gambar 131. Tampilan SwissADME	120
Gambar 132. Tampilan Predict SwissADME.....	120
Gambar 133. Hasil SwissADME.....	121

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Data penemuan dan sumber senyawa antibiotik	5
Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi.....	49
Tabel 3. Hasil Pewarnaan Gram.....	50
Tabel 4. Hasil Uji Biokimia	52
Tabel 5. Hasil analisis LC-MS BLT-1	60
Tabel 6. Hasil Molecular Docking	112
Tabel 7. Hasil Uji Lipinski	118
Tabel 8. Hasil Uji ADME/TOX Oleamide dan Dibutyl phthlate.....	121
Tabel 9. Kategori Toksisitas Berdasarkan EPA Amerika Serikat	127

KATA PENGANTAR

Alhamdulillah rabbil ‘alamin. Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah Swt. karena rahmat dan hidayah-Nya yang telah dilimpahkan kepada umat manusia. Dan tak lupa kami kirimkan selawat dan salam atas junjungan Nabi Besar Muhammad Saw. yang telah diutus untuk membawa rahmat berupa ajaran Islam dan sebagai teladan bagi kita semua sehingga penulis dapat menyelesaikan buku dengan judul “Bakteri Endosimbion Cacing Tanah: Mengungkap Potensi Sebagai Antibakteri Secara In-Vitro dan In-Silico”. Penyusunan buku ini didasarkan menyediakan informasi ilmiah bagi kalangan pelajar khususnya dalam pengembangan senyawa-senyawa antibiotik.

Keberhasilan penyusunan buku ini tentunya bukan hasil usaha penulis semata, banyak pihak didalamnya yang telah menyumbangkan pikiran, tenaga maupun materil sehingga buku ini dapat tersusun dengan baik. Ucapan terima kasih penulis ucapkan kepada keluarga, sahabat, rekan-rekan, dan pihak-pihak lainnya yang telah berkontribusi dalam penyusunan buku ini. Harapan penulis, semoga buku ini membantu menambah pengetahuan, wawasan dan minat bagi para pembaca.

Makassar, September 2020

Penulis

PRAKATA

Cacing tanah adalah nama umum untuk anggota dari kelas oligochaeta, filum annelida, sesuai dengan namanya sebagian besar anggota kelompok ini hidup di tanah. Kelompok ini terutama ditemukan di tanah yang terakumulasi bahan organik di ekosistem darat, dengan beberapa spesies hidup pada kondisi perairan tertentu. Cacing tanah memainkan peran penting dalam ekosistem tanah.

Buku ini berfokus pada discovery dan eksplorasi senyawa antibiotik potensial melalui pengamatan terhadap asosiasi simbiosis cacing tanah dalam hal ini potensi bakteri endosimbion. Berbagai penelitian mengungkapkan potensi bakteri endosimbion yang hidup dalam berbagai organisme sebagai sumber senyawa antibiotik. Kemampuan bakteri endosimbion cacing tanah berbentuk batang *Verminephrobacter* (Betaproteobacteria) yang hidup pada bagian nefridia cacing tanah Lumbricidae telah diketahui mampu menghasilkan senyawa antibiotik yang potensial. Demikian pula ditemukan senyawa Polytheonamides yang diperoleh dari bakteri simbiosis marine sponge oleh Freeman, pada tahun 2017. Potensi bakteri endosimbion dari cacing tanah Megascolecidae genus *Pheretima* sp. dalam menghasilkan senyawa antibiotik juga telah diteliti oleh Husain *et al.* (2018).

Sifat obat cacing tanah dilaporkan dalam banyak literatur medis, seperti sejarah pengobatan Tiongkok. Cacing tanah secara spesifik banyak dimanfaatkan untuk mengobati kejang-kejang, penyakit demam atau epilepsi. Cacing tanah dapat digunakan sendiri atau dikombinasikan dengan bahan lain. Pil yang terbuat dari cacing tanah ditumbuk dengan bubuk cinnabar digunakan untuk kejang-kejang infantil. Untuk nyeri rematik atau hemiplegia setelah stroke, cacing tanah dapat dikombinasikan dengan bahan lain seperti akar arisaema atau kemenyan. Dalam bahasa medis Tiongkok klasik, tujuan dari formula ini adalah untuk menghangatkan saluran pencernaan, melancarkan pembuluh jaringan dan lain-lain.

Menurut Brito-vega dan Espinosa-victoria (2009), cacing tanah secara endogen (di dalam saluran pencernaannya) juga dapat menstimulasi atau menghambat pertumbuhan bakteri-bakteri penting. Ini berkaitan dengan aktivitas beberapa jenis bakteri pada saluran pencernaan cacing tanah tersebut (endosimbion). Selain itu, menurut Verma dan Verma (2012) cacing tanah hidup

berdampingan dengan berbagai organisme seperti virus dan bakteri yang melimpah ditanah, oleh karena itu cacing tanah mensekresikan senyawa tertentu agar dapat melindungi diri dari serangan bakteri atau virus. Hal ini dapat menjadi informasi awal dalam menemukan sumber antibiotik baru yang pada saat ini menurut WHO (2014) telah menjadi masalah serius diseluruh dunia karena munculnya bakteri-bakteri patogen yang telah resisten terhadap antibiotik yang tersedia. Infeksi dari berbagai jenis bakteri, parasit, virus, dan jamur telah menjadi ancaman yang serius akibat munculnya spesies-spesies yang resisten antimikroba (AMR). AMR menghasilkan pengurangan efikasi obat-obatan antibakteri (antibiotik), antiparasit, antivirus, dan antijamur, membuat perawatan pasien sulit dan mahal.

Penemuan antibiotik menandai era perawatan kesehatan yang lebih baik. Namun, resep yang berlebihan dan penyalahgunaan antibiotik mengakibatkan berkembangnya strain berbagai patogen yang resisten. Sejak itu, terus dilakukan pencarian senyawa baru dari bakteri di berbagai lokasi dengan kondisi ekstrim. Tanah adalah salah satu lokasi yang paling banyak dieksplorasi untuk bioprospeksi. Belakangan ini, lingkungan hipersalin dan asosiasi simbiosis telah diteliti untuk senyawa antimikroba baru. Buku ini mengupas secara mendalam potensi pemanfaatan bakteri cacing tanah sebagai salah satu sumber senyawa antibiotik baru, dilengkapi dengan studi kasus dan penelitian mendalam yang mengungkap potensi tersebut.

Telah banyak kajian yang membahas mengenai potensi antibakteri mikroorganisme yang hidup berdampingan dengan cacing tanah, begitu pula potensi antibakteri dari ekstrak cacing tanah. Penelitian tentang potensi bakteri endosimbion masih sangat terbatas, padahal senyawa bakteri endosimbion cacing tanah memiliki aktivitas antibakteri cukup besar. Hal ini dapat menjadi informasi awal dalam menemukan sumber antibakteri baru yang pada saat ini menurut WHO (2014) telah menjadi masalah serius diseluruh dunia karena munculnya bakteri-bakteri patogen yang telah resisten terhadap antibakteri yang tersedia. Infeksi dari berbagai jenis bakteri, parasit, virus, dan jamur telah menjadi ancaman yang serius akibat munculnya spesies-spesies yang resisten antimikroba (AMR).

Bab I dari buku ini menjelaskan dasar penyusunan karya ilmiah ini yang berangkat dari keresahan penulis terhadap fenomena resistensi antibiotik dan

dikaitkan dengan bidang ilmu penulis untuk memberikan sumbangsi ilmu pengetahuan terhadap masalah tersebut.

Bab II dari buku ini menjelaskan tentang antibiotik, defenisi antibiotik, mekanisme kerja antibiotik serta penggolongan antibiotik. Sejarah dan perkembangan antibiotik yang menjelaskan status dan sifat kerentanannya dari waktu ke waktu juga dikupas tuntas pada buku ini. Fenomena resistensi antibiotik yang menjadi masalah global saat ini juga dibahas, akhir bab ini ditutup dengan managemen resistensi antibiotik sebagai langkah penting dalam melindungi keefektifan antibiotik yang ada.

Bab III mengupas tentang Cacing tanah, dimulai dari mengutip kalimat Aristoteles yang mengatakan bahwa cacing tanah adalah usus bumi, hal ini berdasar karena peranannya pada ekosistem. Sebaran dan klasifikasi cacing tanah juga ikut dibahas pada Bab ini, terakhir, penulis membahas secara detail tentang dua spesies cacing tanah yang banyak dieksplor saat sekarang ini, yaitu *Lumbricus terrestris* dan *Pheretima* sp.

Guna mendukung eksplorasi senyawa potensial, bab IV buku ini menjelaskan mengenai metode-metode umum dalam pengujian antibiotik baik secara in-vitro maupun in-silico. Metode in-silico juga menjadi nilai tambah pada buku ini karena metode ini tergolong baru dan memiliki banyak keuntungan dalam penerapannya.

Terakhir, pada Bab V penulis menyajikan studi kasus eksplorasi senyawa potensial yang dimulai dari proses isolasi hingga melihat potensi antibakterinya secara in-vitro dengan uji antagonis, uji daya hambat dan pengamatan morfologi sel dengan Scanning Electron Microscope (SEM). Potensi antibiotik senyawa bakteri endosimbion juga ditinjau melalui pendekatan in-silico yaitu reverse docking dan diakhiri dengan uji lipinski untuk mengetahui sifat fisikokimia senyawa uji.

Keberhasilan penyusunan buku ini tidak terlepas dari kerja sama antar penulis serta pihak-pihak lain yang sangat memotivasi hingga akhirnya buku ini dapat diterbitkan. Ucapan terima kasih penulis tujukan kepada rekan-rekan dalam lingkup Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, universitas Hasanuddin, Makassar. Terima kasih kepada keluarga, sahabat, rekan-

rekan dan pihak-pihak lainnya yang telah berkontribusi dalam penyusunan buku ini.

BAB I

ANTIBIOTIK

I.1 Defenisi Antibiotik

Istilah antibiotik berasal dari kata ‘antibiosis’ yang secara harfiah berarti ‘melawan kehidupan’. Di masa lalu, antibiotik dianggap sebagai senyawa organik yang diproduksi oleh suatu mikroorganisme yang beracun bagi mikroorganisme lainnya. Hasil dari gagasan ini, antibiotik pada awalnya, secara luas didefinisikan sebagai zat atau senyawa yang diproduksi oleh mikroorganisme atau makhluk biologis yang pada konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan, atau mematikan bagi mikroorganisme lainnya. Definisi ini telah perlahan mulai bergeser, karena sudah banyak beredar antibiotik yang juga diproduksi sebagian atau seluruhnya melalui cara sintetik. Beberapa jenis antibiotik mampu sepenuhnya membunuh bakteri lain, beberapa hanya mampu menghambat pertumbuhannya. Senyawa yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisidal sedangkan yang menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteristatik. Defenisi antibiotik umumnya mengacu pada antibakteri, senyawa antibiotik dibedakan menjadi antibakteri dan antijamur untuk mencerminkan kelompok mikroorganisme yang mereka lawan.

Antibiotik adalah zat/senyawa kimia yang memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan dan bahkan untuk mematikan bakteri dan mikroorganisme lainnya. Beberapa antibiotik dapat digunakan untuk mengobati kanker serta penyakit infeksi bakteri, fungi, protozoa dan lain-lain. Mayoritas kelas antibiotik yang digunakan saat ini ditemukan dari tahun 1930-an hingga 1970-an. Selama lebih dari 60 tahun, obat antibiotik telah dianggap sebagai obat mujarab untuk menyembuhkan infeksi, baik penggunaannya yang sesuai anjuran ataupun tidak. Dalam pidatonya pada penerimaan hadiah Nobel pada tahun 1945, Alexander Fleming, yang menemukan penisilin sebenarnya telah memperingatkan bahwa bakteri dapat menjadi kebal terhadap obat-obatan yang luar biasa ini. Memang, pengembangan setiap obat antibiotik baru telah diikuti oleh deteksi resistensi terhadapnya, namun strain yang resisten dapat menyebar jika ada ketidakpatuhan terhadap tindakan pencegahan dan pengendalian infeksi.

Resistensi bakteri patogen terhadap agen antibiotik merupakan mekanisme alamiah untuk bertahan hidup. Pada saat tubuh terinfeksi bakteri patogen maka pengobatan yang dilakukan adalah mengonsumsi antibiotik, bakteri yang sensitif terhadap agen antibiotik akan mati atau terhambat pertumbuhannya, sedangkan untuk bakteri yang telah resisten, penggunaan antibiotik tidak akan berpengaruh. Seiring berjalannya waktu, resistensi terhadap antibiotik akan terus meningkat dan patogenesis akibat infeksi akan terus berlangsung, sehingga penggunaan antibiotik dengan jenis yang sama tidak dapat digunakan lagi dan pencarian jenis antibiotik yang baru harus terus dilakukan.

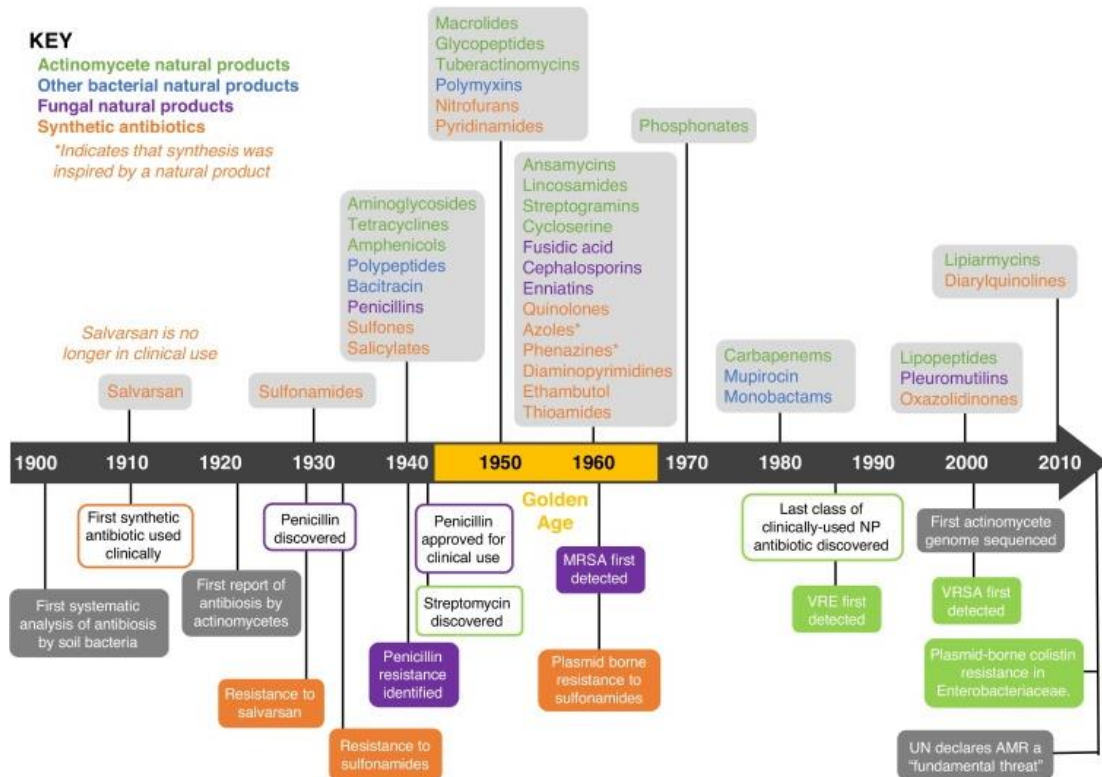
Mikroorganisme memainkan peran penting dalam produksi antibiotik dan obat-obatan lain untuk pengobatan penyakit serius, dari semua produk alami bioaktif yang dilaporkan, sekitar 10% diperoleh dari mikroba. Diantara 38.500 senyawa antibiotik bioaktif yang diketahui, sekitar 16.000 menunjukkan aktivitas antibakteri (melawan bakteri gram-positif, gram-negatif dan bakteri lain misalnya *Mycobacterium*), 6800 menunjukkan antijamur (jamur mikroskopis dan ragi) dan sekitar 700 memiliki aktivitas antiprotozoa.

I.2 Sejarah Antibiotik

Antibiotik telah digunakan dalam waktu yang lama sebelum munculnya pengobatan modern. Abad Pertengahan, tabib di Tiongkok dan Yunani menggunakan tekstur apak untuk mengobati berbagai penyakit. Pada abad ke-19, Sir John Scott Burden-Sanderson memperhatikan tidak adanya bakteri dari kultur pertumbuhan cairan yang dilapisi jamur. Pada tahun 1871, Joseph Lister menemukan efek penghambatan *Penicillium glaucum* pada pertumbuhan bakteri, memungkinkan untuk menyembuhkan luka perawat dengan ekstrak *P. glaucum*. Pada saat yang sama, Louis Pasteur memperhatikan bahwa beberapa bakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang lain. Dia menemukan bersama koleganya Jules François Joubert pada tahun 1877, ketika mempelajari pertumbuhan *Bacillus anthracis* dalam sampel urin, pertumbuhannya dihambat ketika ditumbuhkan bersama dengan bakteri aerob 'umum'.

Pada tahun 1889, Jean Paul Vuillemin mendefinisikan kata 'antibiotik' sebagai setiap hubungan biologis di mana "satu organisme hidup membunuh

organisme lain untuk memastikan keberadaannya sendiri”. Beberapa antagonisme antara mikro-organisme, terutama jamur, diterbitkan dalam tesis Ernest Duchesne pada tahun 1897. Ia menemukan penghambatan *Escherichia coli* oleh *P. glaucum* 30 tahun sebelum Fleming. Meskipun beberapa pengamatan antimikroba pada mikroorganisme telah dilakukan, tidak ada molekul antimikroba yang dimurnikan.



Gambar 1. Sejarah Panjang Penemuan Antibiotik

Molekul antimikroba pertama yang ditemukan adalah senyawa kimiawi. Pada tahun 1909, Paul Ehrlich menemukan *arsphenamine*, turunan arsenik yang aktif melawan *Treponema pallidum*, agen sifilis. Antibiotik ini dikomersialkan pada tahun 1911 dengan nama Salvarsan®, kemudian Mapharsen®. Pada tahun 1930, Gerhard Domagk menemukan efek antibiotik sulphanilamide, senyawanya disintesis 22 tahun sebelumnya oleh Paul Gelmo. Antibiotik ini dipasarkan dengan nama Prontosil® pada tahun 1935 dan digunakan oleh tentara selama Perang Dunia II.

Pada tahun 1928, Alexander Fleming secara tidak sengaja menemukan senyawa yang diproduksi oleh jamur *Penicillium* yang dapat menghambat koloni *Staphylococcus aureus*. Molekul dari *Penicillium notatum* ini telah dimurnikan dan

disebut penisilin. Namun, produksi penisilin ini dilakukan pada tahun 1940 oleh Howard Florey dan Ernst Chain, menggunakan *Penicillium chrysogenum*. Fleming juga menemukan lisozim, enzim antibakteri. Pada tahun 1930, René Dubos menemukan enzim dari *Bacillus* tanah yang secara khusus menguraikan polisakarida kapsul *Streptococcus pneumoniae* tipe III, yang juga mampu mengobati tikus dengan *peritonitis pneumokokus*. Sepuluh tahun kemudian, ia mengisolasi dari *Bacillus brevis* senyawa gramicidin oligopeptida yang secara luas menghambat spesies bakteri Gram-positif. Sayangnya, gramicidin menunjukkan terlalu banyak toksisitas bagi manusia, kecuali untuk pengobatan lokal. Di AS, Selman Waksman adalah orang pertama yang melakukan penelitian sistematis tentang aktivitas antimikroba bakteri tanah, terutama dari anggota *Streptomyces* atau streptomycetes. Dia mengembangkan beberapa teknik dan strategi kultur ('platform Waksman') untuk menyortir antagonisme antara spesies bakteri. Menggunakan platformnya, ia menemukan pada tahun 1940-an beberapa antibiotik dan antijamur utama, seperti aktinomisin (dari *Streptomyces* spp.), streptomisin (dari *Streptomyces griseus*), neomisin (dari *Streptomyces fradiae*), fumigacin (dari *Aspergillus fumigatus*) dan clavacin (dari *Aspergillus clavatus*). Aktinomisin, neomisin, dan streptomisin masih digunakan sampai sekarang. Selain itu, streptomisin telah merevolusi pengobatan tuberkulosis (TB) dan tetap aktif melawan TB-MDR. Industri farmasi terinspirasi oleh platform Waksman, yang mengarah pada penemuan semua antibiotik terkini antara tahun 1940-an dan 1970-an. Selama masa keemasan ini, ditemukan lebih dari 20 kelas antibiotik dari puluhan spesies bakteri dan jamur.

Kelas antibiotik terakhir yang ditemukan berasal dari tahun 1980-an. Setelah 50 tahun penemuan, tidak ada kelas baru yang ditemukan. Oleh karena itu, dibutuhkan strategi baru. Setelah pendekatan kultur melalui platform Waksman, industri beralih ke sintesis molekul baru secara *in vitro* berdasarkan pengetahuan tentang mekanisme kerja antibiotik yang diketahui. Beberapa golongan antibiotik baru telah ditemukan, nitrofurantoin pada tahun 1953, kuinolon pada tahun 1960, sulphonamides pada tahun 1961, dan oksazolidinon pada tahun 1987. Modifikasi dan perbaikan molekul yang sudah dikenal juga telah dilakukan. Hal ini tercermin dari komersialisasi linezolid pada tahun 2003 dan daptomisin pada tahun 2001

meskipun molekul ini masing-masing telah dikenal sejak 1955 dan 1986. Baru-baru ini, sefalosporin baru, bernama cefiderocol, ditemukan aktif melawan bakteri Gram negatif yang resisten terhadap karbapenem. Senyawa hemisintetik dari produk alami juga dikembangkan, seperti ketolides (berasal dari makrolida) atau metronidazol (berasal dari produk alami *Streptomyces* sp. Tetapi kerugian investasi akibat munculnya resistensi telah menyebabkan industri secara bertahap meninggalkan penelitian tentang antibiotik, lebih memilih untuk berinvestasi dalam obat untuk penyakit kronis. Dari 20 perusahaan farmasi yang berinvestasi dalam penemuan antibiotik pada 1980-an, hanya tersisa 5 pada 2015. Lebih dari 1200 peptida antimikroba (AMPs) ditemukan dari berbagai asal, dari tumbuhan hingga invetebrata dan hewan, tetapi tidak ada yang telah digunakan sebagai antibiotik. Kesimpulannya, mayoritas antibiotik ditemukan pada masa keemasan. Bakteri dan jamur adalah produsen terbesar. Genus *Streptomyces* adalah sumber dari sekitar satu-setengah dari agen antimikroba yang saat ini digunakan dalam pengobatan penyakit infeksi manusia.

Tabel 1. Data penemuan dan sumber senyawa antibiotik

Kelas	Antibiotik	Penemuan	Pengakuan FDA	Organisme
Aminoglycoside	Capreomycin	1960	1969	<i>Streptomyces capreolus</i>
	Framycetin	1953	1955	<i>Streptomyces capreolus</i>
	Gentamicin	1963	1979	<i>Micromonospora purpurea</i>
	Kanamycin	1957	1973	<i>Streptomyces kanamycericus</i>
	Naramycin	1957		
	Neomycin	1949	1954	<i>Streptomyces fradiae</i>
	Plazomicin	2009	2018	
	Sisomicin	1970		<i>Micromonospora inyoensis</i>
	Streptomycin	1943	1946	<i>Streptomyces griseus</i>
	Tobramycin	1967	1975	<i>Streptomyces tenebrarius</i>
Obat Antituberkulosis	Ethambutol	1961	1967	
	Ethionamide	1956	1965	
	Isoniazid	1952	1952	
	Pyrazinamide	1936	1952	
B-Lactam	Carbapenem	1976	1986	<i>Streptomyces cattleya</i>
	Cephalosporin	1948	1964	<i>Cephalosporium acremonium</i>

	Monobactam	1981	1987	<i>Chromobacterium violaceum</i>
	Penicilin	1928	1938	<i>Penicillium notatum</i> , <i>Penicillium chrysogenum</i>
Asam Karboksilat	Mupirocin	1971	1987	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Chloramphenicols	Chloramphenicols	1946	1948	<i>Streptomyces venezuelae</i>
Fosfomicin	Fosfomicin	1969	1989	<i>Streptomyces fradiae</i>
Glikopeptida	Dalbavancin	2002	2014	
	Oritavancin	1996	2014	
	Teicoplanin	1978	1987	<i>Acrinoplanes reichomycericus</i>
	Vancomycin	1953	1958	<i>Amycolatopsis orientalis</i>
Ketolides	Telithromycin	1997	2004	
Lincosamides	Lincomycin	1963	1964	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Lipopeptida	Daptomycin	1986	2003	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Macrolides	Erythromycin	1948	1951	<i>Streptomyces erythraeus</i>
	Josamycin	1967		<i>Streptomyces narbonensis</i> var. <i>josamyceus</i>
	Midecamycin	1975		<i>Streptomyces mycarofaciens</i>
	Spiramycin	1952	1955	<i>Streptomyces ambofaciens</i>
	Fidaxomicin	1975	2011	<i>Dactylosporangium auranciicum</i> subsp. <i>hamdenesis</i>
Nitrofurans	Nitrofurantoin	1952	1953	
Nitroimidazoles	Metronidazole	1960	1960	<i>Streptomyces</i> sp.
	Ornidazole	1975		
Oxazolidinones	Linezolid	1987	2000	
	Tedizolid	2008	2014	
Polypeptida	Polymyxin	1947	1959	<i>Paenibacillus polymyxa</i>
Quinolones	Delafloxacin	2000	2017	
	Norfloxacin	1961	1968	
	Asam Nalidixic	1960	1967	
Rifamycins	Rifampicin	1957	1958	<i>Streptomyces mediterranei</i>
Steroid	Asam Fusidic	1962	1983	<i>Fusidium coccineum</i>
Streptogramins	Streptogramin B	1953	1998	<i>Streptomyces graminofaciens</i>
	Pristinamycin	1961		<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Sulfonamides	Sulfamethoxazole	1961	1961	
	Trimethoprim/ Sulfamethoxazole	1968	1974	

Tetracyclines	Chlortetracycline	1948	1952	<i>Streptomyces aureofaciens,</i> <i>Streptomyces rimosus</i>
	Eravacyline	2010		
	Minocycline	1961	1971	
	Tigecycline	1999	2005	

1.3 Penggolongan Antibiotik

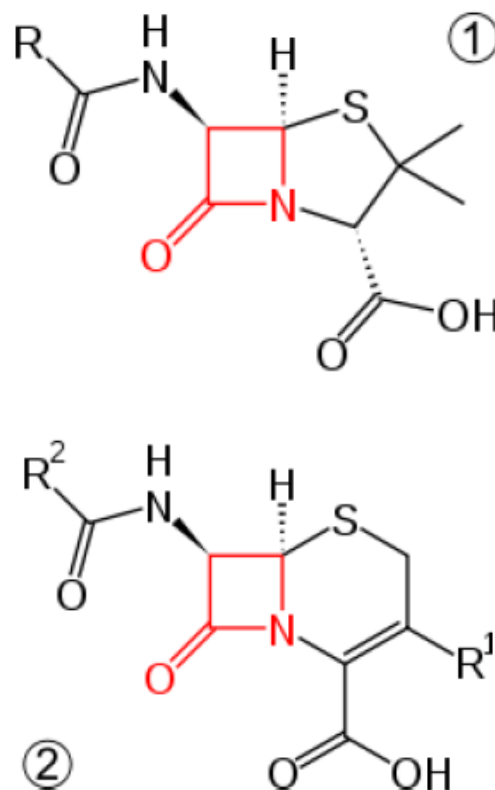
Skema klasifikasi untuk antibiotik biasanya didasarkan pada spektrum kerjanya dan daya hambatnya. Antibiotik berdasarkan spektrum kerjanya dibagi menjadi dua yaitu; (1) Antibiotik spektrum luas yaitu antibiotik yang berpengaruh terhadap gram positif dan negatif. (2) Antibiotik spektrum sempit yaitu antibiotik yang berpengaruh terhadap gram negatif atau gram positif saja. Antibiotik berdasarkan daya hambatnya dibagi menjadi dua juga yaitu antibiotik bakteriostatik, dan antibiotik bakterisidal.

Seperti yang disebutkan diatas, beberapa antibiotik mampu sepenuhnya membunuh bakteri lain, beberapa hanya mampu menghambat pertumbuhannya. Mereka yang membunuh bakteri disebut bakterisidal sedangkan yang menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteriostatik. Antibiotik memiliki mekanisme berbeda dalam menghambat/membunuh bakteri, seperti efek penghambatan sintesis dinding sel, menghancurkan membran sel, menghambat sintesis protein, penghancuran DNA bakteri dan metabolisme yang terkait dengan bakteri. Mekanisme antibiotik tergantung pada dinding sel atau bagian sel bakteri tempat antibiotik bekerja dan menargetkan sel spesifik untuk menghambat atau membunuh. Jadi, sel adalah target yang sangat spesifik untuk semua antibiotik.

Ada beberapa cara mengklasifikasikan antibiotik tetapi skema klasifikasi yang paling umum didasarkan pada struktur molekulnya, cara kerja dan spektrum aktivitasnya. Lainnya termasuk rute pemberian (injeksi, oral dan topikal). Antibiotik dalam kelas struktural yang sama umumnya akan menunjukkan pola efektivitas, toksisitas, dan efek samping alergi potensial yang serupa. Beberapa kelas umum antibiotik berdasarkan struktur kimia atau molekulnya termasuk jenis Beta-laktam (Penicilin dan cephalosporins), Makrolida, Tetrasiklin, Kuinolon, Aminoglikosida, Sulphonamides, Glikopeptida, Oxazolidinon dan lain-lain.

1. Beta Lactam

Anggota kelas antibiotik ini mengandung cincin 3-karbon dan 1-nitrogen yang sangat reaktif. Penisilin dan Cephalosporins adalah dua tipe utama Beta lactam. Penisilin membunuh bakteri dengan menghambat pembentukan dinding sel bakteri yang menyebabkan dinding rusak untuk melepaskan isi sel. Penisilin efektif dalam pengobatan sinusitis dan penyakit pernapasan kronis pada unggas. Contoh penisilin adalah amoksisilin dan ampisilin. Sementara Cephalosporins dibagi menjadi generasi pertama, kedua, dan ketiga. Setiap generasi memiliki spektrum aktivitas yang lebih luas daripada yang sebelumnya. Seperti halnya penisilin, sefalosporin bekerja dengan mengganggu pembentukan dinding sel bakteri.

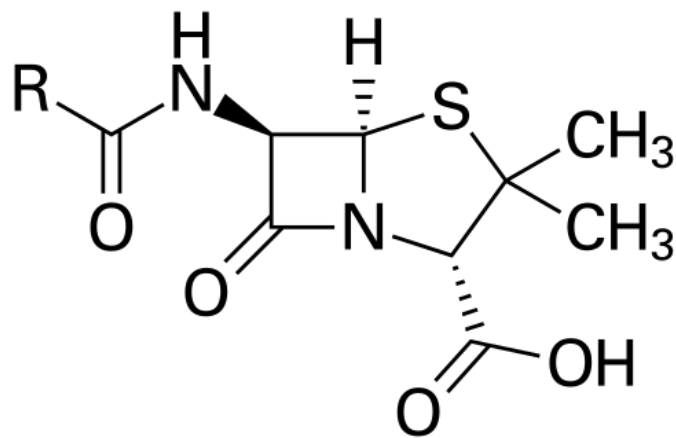


Gambar 2. Struktur senyawa Beta-Lactam

2. Penisilin

Antibiotik pertama, penisilin, yang pertama kali ditemukan dan dilaporkan pada tahun 1929 oleh Alexander Fleming. Penisilin terlibat dalam kelompok senyawa yang beragam, yang sebagian besar diakhiri dengan akhiran -silin. Mereka adalah senyawa beta-laktam yang mengandung inti cincin asam 6-animopenicillanic (lactam plus thiazolidine) dan rantai samping cincin lainnya.

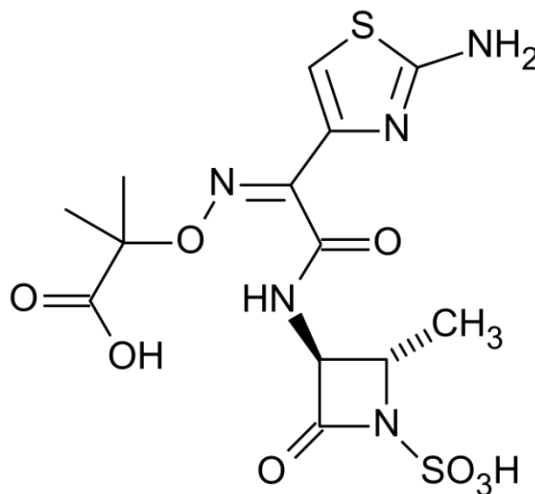
Anggota kelas Penicillin termasuk Penicillin G, Penicillin V, Oxacillin (dicloxacillin), Methicillin, Nafcillin, Ampicillin, Amoxicillin, Carbenicilin, Piperacillin, Mezlocillin dan Ticarcillin. Penisilin G adalah yang pertama diproduksi di antara kelompok antibiotik ini, dan pada kenyataannya dari semua antibiotik. Meskipun penisilin G ditemukan oleh Alexander Fleming pada tahun 1920-an, dibutuhkan upaya peneliti lain seperti Ernst Chain, Edward Abraham, Norman Heatley dan Howard Florey pada tahun 1945 untuk memahami seluk beluk tentang jamur dan efektivitas klinisnya. Selanjutnya, meskipun Penicillin G pada awalnya ditemukan dan diisolasi dari jamur *P. notatum* oleh Alexander Flemming, kerabat dekat *Penicillium chrysogenum* adalah pilihan sumber isolasi yang lebih disukai. Selain itu, produksi antibiotik melalui fermentasi mikroba lebih hemat biaya dibandingkan dengan mensintesisnya dari bahan mentah.



Gambar 3. Struktur senyawa Beta-Lactam

Tidak dapat disangkal bahwa penemuan penisilin menandai pengenalan antibiotik pada manajemen kesehatan manusia. Sayangnya, bagaimanapun, Penicillin G memiliki spektrum yang sempit hanya bakteri Gram positif (streptokokus) dan beberapa bakteri Gram negatif seperti agen penyebab *Treponema pallidum* untuk sifilis, dan meningokokus yang sensitif terhadapnya. Seperti pada setiap sistem interaksi biologis di mana sistem kehidupan berusaha melindungi dirinya dari serangan, bakteri tertentu mampu melawan aktivitas antibiotik dengan menyangkan enzim. Mengingat hal ini, beberapa antibiotik seperti ampisilin, karbenisilin, dan amoksisilin telah dikembangkan secara semi sintesis dengan rantai samping yang berbeda. Rantai samping ini memberi antibiotik

kemampuan untuk menghindari kapasitas penguraian enzim tertentu yang diproduksi oleh strain bakteri tertentu serta memfasilitasi pergerakan antibiotik melintasi membran luar dari dinding sel bakteri tersebut. Kemampuan ganda ini meningkatkan spektrum aktivitasnya melawan bakteri Gram-negatif. Secara khusus, beberapa penisilin seperti Augmentin yang diproduksi dalam kombinasi dengan senyawa non-antibiotik mampu menghambat aktivitas enzim penisilinase bakteri. Augmentin sebenarnya adalah obat yang mengandung amoksisilin (antibiotik) dan asam klavulanat yang merupakan senyawa non-antibiotik. Asam klavulanat mampu menghambat enzim beta-laktamase sehingga memperpanjang aktivitas antibiotik komponen amoksisilin dari Augmentin bahkan di antara bakteri penghasil penisilinase.

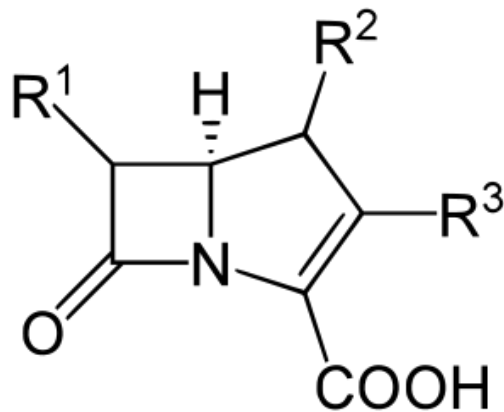


Gambar 4. Struktur Monobactams

3. Monobactams

Penemuan kelas antibiotik ini pertama kali dilaporkan oleh Skyes dan rekan kerjanya. Antibiotik ini diperoleh dari bakteri *Chromobacterium violaceum*. Mereka adalah bagian dari senyawa beta-laktam tetapi tidak seperti kebanyakan beta-laktam lainnya, cincin beta-laktam monobaktam berdiri sendiri dan tidak menyatu dengan cincin lain. Aztreonam adalah satu-satunya antibiotik monobaktam yang tersedia secara komersial, dengan spektrum aktivitas yang sempit. Aztreonam hanya aktif melawan bakteri Gram-negatif aerobik seperti *Neisseria* dan *Pseudomonas*, digunakan untuk mengobati pneumonia, sepsis

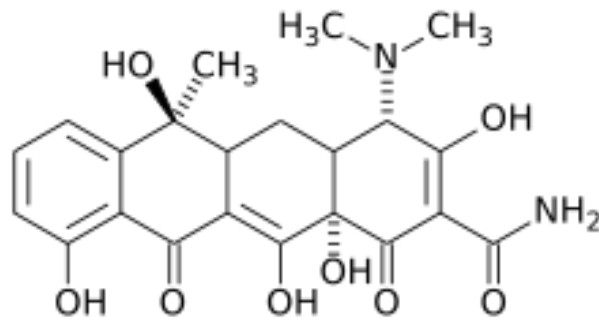
dan infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh kelompok bakteri ini. Monobaktam tidak efektif melawan bakteri gram positif atau anaerob.



Gambar 5. Struktur Carbapenems

4. Carbapenems

Kelas antibiotik ini ditemukan karena kebutuhan pada tahun 1976. Sebelumnya pada akhir tahun 1960, efektivitas penisilin sangat terancam karena munculnya beta-laktamase dalam bakteri. Beta-laktamase bakteri memberikan resistensi pada bakteri terhadap penisilin. Skenario yang tampaknya buruk ini membuat para ilmuwan memulai pencarian besar-besaran untuk penghambat beta-laktamase. Upaya mereka membuahkan hasil pada tahun 1976 ketika asam olivanic, yang diproduksi oleh bakteri Gram-positif *Streptomyces clavuligerus*, tercatat menghambat beta-laktamase. Sayangnya, asam-asam ini secara kimiawi tidak stabil dan tidak dapat dengan mudah menembus sel bakteri. Karakteristik ini memperlambat kerja lebih lanjut pada asam olivanic, tetapi yang menarik, tak lama kemudian, dua penghambat beta-laktamase yang unggul ditemukan. Ini adalah asam klavulanat yang diperoleh juga dari *S. clavuligerus*, dan thienamycin yang diisolasi dari *Streptomyces cattleya*. Thienamycin dilaporkan sebagai "karbapenem" pertama dan berfungsi sebagai standar untuk setiap karbapenem lainnya. Sejumlah karbapenem lain juga telah diidentifikasi. Karbapenem menempati tempat yang sangat penting dalam perang kita melawan infeksi bakteri. Ini karena mereka mampu melawan enzim hidrolitik beta-laktamase. Di antara ratusan beta-laktam yang diketahui, karbapenem memiliki spektrum aktivitas terluas dan potensi terbesar melawan bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Akibatnya, mereka sering disebut "antibiotik pilihan terakhir" dan diberikan ketika



Gambar 7. Struktur Tetrasiklin

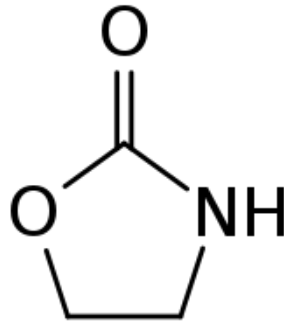
6. Tetrasiklin

Tetrasiklin ditemukan pada tahun 1945 dari bakteri tanah dari genus *Streptomyces* oleh Benjamin Duggar. Anggota pertama dari kelas ini adalah chlorotetracycline (Aureomycin). Anggota kelas ini memiliki empat (4) cincin hidrokarbon dan dikenal dengan nama berakhiran "-cycline". Anggota termasuk Tetracycline, Chlortetecycline, Oxytetracycline dan Demeclocycline. Anggota seperti Doxycycline, Lymecycline, Meclo cycline, Methacycline, Minocycline, dan Rolitettracycline dianggap sebagai generasi kedua karena mereka merupakan turunan semi-sintesis.

7. Oxazolidinones

Oxazolidinones adalah kelompok antibiotik sintetis yang tergolong baru. Linezolid yang mewakili senyawa pertama yang disintesis dari golongan ini disetujui untuk aplikasi klinis pada tahun 2000. Meskipun mekanisme kerja oxazolidinones belum sepenuhnya dipahami, oxazolidinones dilaporkan mengganggu sintesis protein. Oxazolidinones menghambat sintesis protein dengan mengikat situs P subunit ribosom 50S. Kelompok ini memiliki spektrum aktivitas yang luas melawan bakteri Gram- positif termasuk *Staphylococcus*, enterococci yang resisten vankomisin dan pneumococci resisten penisilin. Linezolid digunakan untuk pengobatan infeksi saluran pernapasan dan kulit yang disebabkan oleh bakteri patogen Gram-positif. Oxazolidinones merupakan obat pilihan dalam menangani infeksi pembedahan karena mudah menembus dan menumpuk di jaringan termasuk tulang, paru-paru, vegetasi (pertumbuhan mirip tumbuhan dalam jaringan), hematoma dan cairan serebrospinal. Meskipun jika mengikuti penggunaan normal linezolid biasanya aman, efek sampingnya berupa

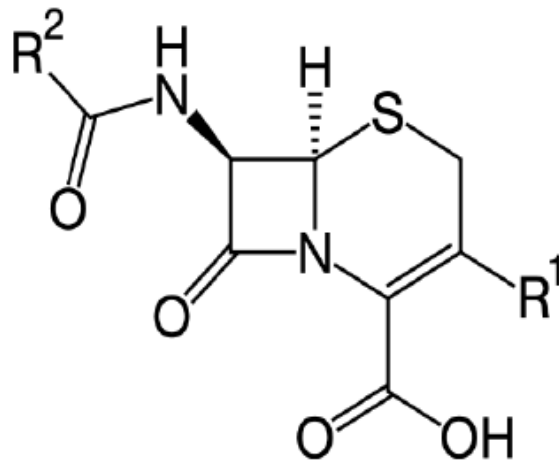
myelosuppression, mengakibatkan anemia dan trombositopenia yang sering dijumpai dalam kasus ketika pengobatan berkepanjangan.



Gambar 8. Struktur Senyawa Oxazolidinones

8. Cephalosporin (sefalosporin)

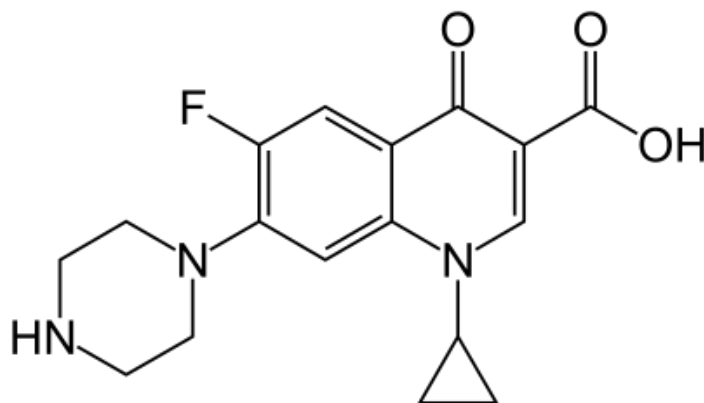
Anggota kelompok antibiotik ini mirip dengan penisilin dalam struktur dan cara kerjanya. Cephalosporin merupakan antibiotik yang paling sering diresepkan dan diberikan, lebih singkatnya, mereka menyumbang sepertiga dari semua antibiotik yang diresepkan dan diberikan oleh National Health Scheme di Inggris. Anggota pertama dari kelompok antibiotik ini pertama kali diisolasi oleh Guiseppe Brotzu pada tahun 1945 dari jamur *Cephalosporium acremonium*. Meskipun obat tersebut pertama kali diisolasi oleh Guiseppe Brotzu, Edward Abraham yang mendapat keuntungan untuk mematenkannya karena mampu mengekstraksi senyawa tersebut. Sefalosporin mengandung inti asam 7-aminocephalosporanic dan rantai samping yang mengandung cincin 3,6-dihidro-2 H-1,3-thiazane. Sefalosporin digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri dan penyakit yang timbul dari organisme penghasil Penicillinase, Methicillin-rentan Staphylococci dan Streptococci, *Proteus mirabilis*, beberapa *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Haemophilus influenza*, *Enterobacter aerogenes* dan beberapa *Neisseria*. Mereka dibagi lagi menjadi generasi (1-5) sesuai dengan organisme targetnya tetapi versi yang lebih baru semakin efektif melawan patogen Gram-negatif. Sefalosporin memiliki berbagai rantai samping yang memungkinkan mereka menempel pada protein pengikat penisilin (PBP) yang berbeda, untuk menghindari sawar darah otak, menahan kerusakan oleh penicillinase yang dihasilkan oleh strain bakteri dan terionisasi untuk memfasilitasi masuknya antibiotik ini ke dalam sel bakteri Gram-negatif.



Gambar 9. Struktur senyawa Cephalosporins

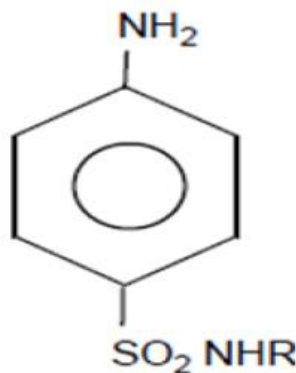
9. Quinolones

Kelas antibiotik ini pertama kali ditemukan dengan nama asam nalidixic oleh para ilmuwan yang terlibat dalam pencarian obat antimalaria. Asam nalidixic ditemukan sebagai pengotor selama pengembangan quinine di awal tahun enam puluhan. Antibiotik ini mengganggu replikasi dan transkripsi DNA pada bakteri. Dua kelompok utama senyawa telah dikembangkan dari molekul dasar, kuinolon dan naftiridon yang meliputi sinoksasin, norfloksasin, ofloksasin, siproksasin, temafloksasin, sparfloksasin, asam nalidixat, enoksasin. Struktur mereka umumnya terdiri dari dua cincin tetapi generasi kuinolon terbaru memiliki struktur cincin tambahan yang memungkinkan mereka untuk memperluas spektrum aktivitas antimikroba mereka ke beberapa bakteri, terutama bakteri anaerob yang sampai sekarang resisten terhadap kuinolon.



Gambar 10. Struktur senyawa Quinolone

Sejak ditemukan pada awal 1960-an, beberapa modifikasi telah dilakukan pada struktur induknya dan hal ini mengarah pada pengembangan dan sintesis dari banyak turunan dengan potensi antibiotik yang teruji. Nomenklatur anggota golongan antibiotik ini kompleks tetapi anggota dari kelompok ini sering dikenal dengan sufiksoksasin, seperti floxacin, ciprofloxacin dan levofloxacin. Modifikasi dalam struktur dasar kuinolon dilaporkan telah meningkatkan ketersediaan hayati dan meningkatkan spektrum aktivitas dan potensinya, meningkatkan kinerja mereka dalam pengobatan berbagai bentuk penyakit seperti infeksi saluran kemih, sistemik dan saluran pernafasan. Terlepas dari beberapa keunggulannya ini, masih ada masalah keamanan dengan beberapa anggota kelas antibiotik ini yang menyebabkan penarikan grepafloxacin, sparfloxacin, temafloxacin, dan trovafloxacin, semuanya termasuk dalam kelas kuinolon, dari pasar. Meskipun banyak kemajuan sedang dibuat dalam hal studi in vitro dan farmakodinamik, pengetahuan tentang dinamika toksisitas di antara beberapa kelas antibiotik ini masih belum meyakinkan.



Gambar 11. Struktur senyawa Sulfonamida

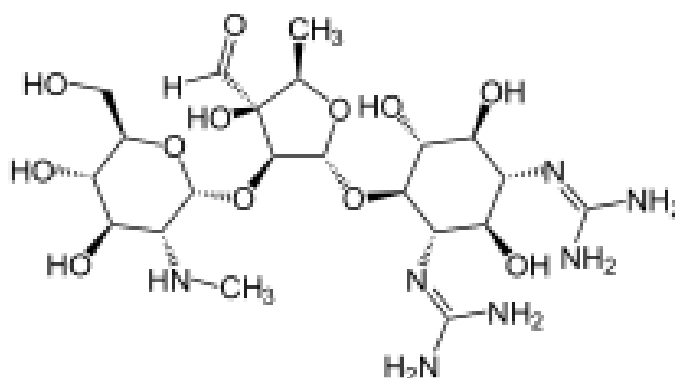
10. Sulphonamides

Sulfonamida dilaporkan merupakan kelompok antibiotik pertama yang digunakan dalam pengobatan terapeutik, dan mereka masih memainkan peran yang sangat penting dalam praktik kedokteran dan kedokteran hewan. Sulfonamida menghambat bakteri Gram-positif dan Gram-negatif seperti *Nocardia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* dan *Enterobacter*, *Chlamydia trachomatis* dan beberapa Protozoa, dan banyak digunakan dalam pengobatan berbagai infeksi

termasuk tonsilitis, septikemia, meningitis meningokokus, disentri basiler dan beberapa infeksi saluran kemih. Studi telah menunjukkan bahwa Sulphonamides juga mampu menghambat agen sel kanker. Sulfonamida adalah agen antimikroba sintetis yang mengandung gugus sulfonamida. Sulfonamida umumnya dianggap bakteriostatik daripada bakterisidal. Namun, ada pendapat bahwa sulfonamida dapat menjadi bakterisidal jika konsentrasinya cukup tinggi atau jika adanya konsentrasi sulfonamida apapun disertai dengan kondisi lingkungan lain yang tidak menguntungkan bagi bakteri. Kondisi yang tidak menguntungkan seperti itu akan mencakup kondisi yang buruk, suhu yang buruk, antibodi, produk proteolitik beracun, dan lain-lain. Meskipun sulfonamid dianggap baik dan efektif dalam mengobati berbagai penyakit dan infeksi, obat-obatan tersebut direkomendasikan dan diberikan dengan hati-hati karena toksisitas dan efek sampingnya, beberapa di antaranya termasuk gangguan saluran kemih, anemia hemolitik, porfiria, dan reaksi hipersensitivitas.

11. Glycopeptida

Antibiotik glikopeptida yang umumnya disingkat GPAs awalnya diperoleh sebagai produk alami, namun 20 tahun terakhir terus berkembang turunan semi sintetis dengan peningkatan aktivitas dan sifat farmakokinetik. Secara alami, glikopeptida terbuat dari peptida siklik dari 7 asam amino, yang mengikat 2 gula, oleh karena itu dinamakan glikopeptida. Pengikatan antibiotik ke targetnya terjadi melalui pembentukan 5 ikatan hidrogen dengan tulang punggung peptida. Kadang-kadang, klorin dan atau gula tambahan melekat pada tulang punggung antibiotik ini (seperti kasus oritavancin) selama sintesis. Antibiotik dengan tambahan seperti itu diketahui mengikat lebih efisien ke target.

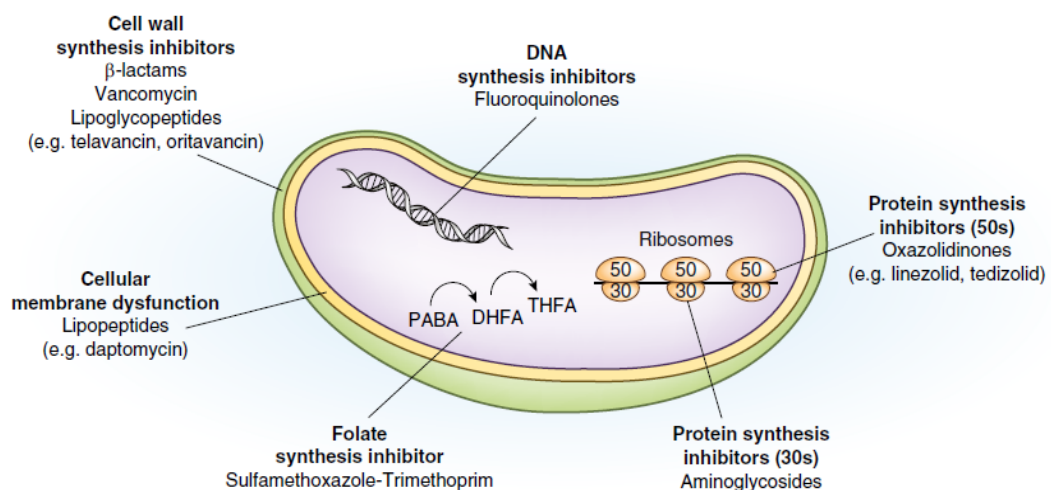


Gambar 12. Struktur senyawa Aminoglycoside (Streptomisin)

12. Aminoglycosides

Obat pertama yang ditemukan di antara anggota golongan antibiotik ini adalah streptomisin, pertama kali diisolasi pada tahun 1943. Streptomisin telah banyak digunakan untuk melawan *Mycobacterium tuberculosis*, agen penyebab tuberkulosis pada manusia. Aminoglikosida adalah senyawa yang biasanya terdiri dari gula 3-amino yang dihubungkan oleh ikatan glikosidik. Mereka diperoleh dari Actinomycetes tanah. Aminoglikosida memiliki spektrum aktivitas antibiotik yang luas. Mereka mampu menghambat sintesis protein pada bakteri dengan mengikat salah satu subunit ribosom, dan efektif melawan Gram-negatif aerobik basil dan bakteri Gram-positif tertentu. Aminoglikosida tertua yang diketahui, seperti yang disebutkan sebelumnya adalah Streptomisin yang telah digunakan beberapa kali dalam mengobati penyakit tuberkulosis. Meskipun efektif melawan berbagai macam infeksi, streptomisin ternyata sangat beracun. Fitur obat yang tidak menguntungkan ini mengharuskan untuk mencari anggota baru aminoglikosida yang masih efektif melawan bakteri tetapi kurang beracun bagi manusia. Pencarian itu membuahkan hasil dengan penemuan antibiotik seperti Gentamicin, Neomycin, Tobramycin dan Amikacin. Gentamisin kurang toksik dan banyak digunakan untuk infeksi yang disebabkan oleh Gram-negatif basil (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella* dan *Salmonella*). Tobramycin, khususnya, digunakan untuk mengobati infeksi *Pseudomonas* pada pasien fibrosis kistik.

1.4 Mekanisme Kerja Antibiotik



Gambar 13. Mekanisme Kerja Antibiotik

Adapun beberapa mekanisme kerja antibiotik:

1. Merusak Dinding Sel

Sel-sel bakteri dikelilingi oleh dinding sel yang terbuat dari peptidoglikan, yang terdiri dari polimer gula panjang. Peptidoglikan mengalami cross-linking dari untaian glycan oleh ikatan transglukosidase, dan rantai peptida meluas dari gula dalam polimer dan membentuk ikatan silang, satu peptida ke yang lain. Bagian D-alanyl-alanine dari rantai peptida dihubungkan secara silang oleh residu glisin dengan adanya protein pengikat penisilin (PBP). Hubungan silang ini memperkuat dinding sel. β -laktam dan glikopeptida menghambat sintesis dinding sel. Antibiotik tertentu seperti β -laktam bereaksi dengan PBP yang memiliki afinitas tinggi terhadap β -laktam dengan mengikat PBP sebagai substrat. Obat-obatan ini analog struktural asil-D-alanyl-D-alanin yang berikatan dengan situs PBP yang aktif sebagai substrat PBP selama reaksi transpeptidasi. Reaksi transpeptidasi dihambat oleh antibiotik-antibiotik ini yang menonaktifkan domain transpeptidase PBP, sehingga menyebabkan biosintesis peptidoglikan terhambat.

2. Merusak Membran Sel

Kelas-kelas antibiotik yang merusak membran sel bakteri bersifat spesifik pada setiap kelompok mikroba berdasarkan perbedaan jenis lipid dalam membran sel mereka. Sebagai contoh, Daptomycin mendepolarisasi membran calcium-dependent, hal ini mengarah pada penghentian sintesis makromolekul dan gangguan membran seluler pada bakteri. Polimiksin menyebabkan disintegrasi membran sel bakteri dengan secara efektif mengikat bagian lipid lipopolisakarida dalam sel bakteri.

3. Menghambat Sintesis Protein

Pertama, informasi dalam DNA bakteri digunakan untuk mensintesis molekul RNA yang disebut sebagai messenger RNA (m-RNA), proses yang dikenal sebagai transkripsi. Kemudian, struktur makromolekul yang disebut ribosom mensintesis protein yang ada dalam m-RNA, suatu proses yang disebut translasi. Biosintesis protein dikatalisis oleh ribosom dan faktor sitoplasma. Ribosom 70S bakteri terdiri dari dua subunit ribonukleoprotein, subunit 30S dan 50S.

Antimikroba menghambat biosintesis protein dengan menargetkan subunit 30S atau 50S dari ribosom bakteri.

Antibiotik seperti eritromisin, klindamisin, lincomycin, kloramfenikol, dan linezolid telah terbukti menjadi salah satu penghambat ribosom 50S. Secara umum, antibiotik yang menghambat ribosom 50S melakukannya dengan cara memblokir baik fase inisiasi translasi protein atau fase perpanjangan sintesis protein di mana asam amino yang masuk dihubungkan dengan rantai peptida yang baru tumbuh. Contoh antibiotik yang memblokir inisiasi translasi protein adalah anggota dari Oxazolidinones sedangkan makrolida seperti lincosamide dan streptogramin memblokir sintesis protein dengan menghambat fase perpanjangan translasi mRNA. Oleh karena itu, kelompok antibiotik terakhir ini dilaporkan tidak efektif ketika perpanjangan telah berkembang melampaui batas kritis.

Penghambat ribosom 30S pada prinsipnya bekerja dengan memblokir akses aminoasil-tRNA ke ribosom. Contoh antibiotik yang berfungsi dengan cara ini termasuk tetrasiklin, streptomisin, dan spektinomisin. Perlu dicatat bahwa beberapa penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa tetrasiklin juga menghambat beberapa protein pada ribosom 50S. Di antara inhibitor ribosom, subkelas aminoglikosida yang diturunkan secara alami adalah satu-satunya yang bersifat bakterisidal. Makrolida, streptogramin, spektinomisin, tetrasiklin, dan kloramfenikol biasanya bersifat bakteriostatik. Namun, beberapa dari antibiotik penghambat ribosom yang biasanya bersifat bakteriostatik dapat menjadi bakterisidal dalam kondisi tertentu. Misalnya, kloramfenikol yang biasanya dikenal sebagai bakteriostatik telah terbukti efektif membunuh *S. pneumoniae* dan *Neisseria meningitidis*, serta *H. influenzae*.

4. Menghambat Transkripsi

Informasi genetik ditranskripsikan dari DNA ke RNA oleh RNA polimerase yang mengkatalisasi suatu reaksi, mengikat ribonukleotida dengan ikatan fosfodiester. RNA polimerase dibangun oleh subunit 2α , 1β , $1\beta'$, 1ω , dan 1σ . Transkripsi yang dimulai oleh subunit σ yang mengikat promotor memanjang hingga diakhiri oleh terminasi protein P (Rho) yang merupakan RNA-DNA

helicase yang melepaskan transkrip dari DNA templat dengan memutus ikatan hidrogen yang dihasilkan antara DNA templat bersama dengan transkrip DNA. Rifampin, yang merupakan turunan dari keluarga antibiotik rifamycine, menghambat inisiasi transkripsi dengan mengikat subunit β RNA polimerase. Rifampin digunakan dalam pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, dan bakteri yang sulit diobati, obat ini tidak beracun bagi manusia karena itu tidak menghambat RNA polimerase eukariotik. Gen bermutasi yang mengkode RNA polimerase yang mengandung struktur subunit β yang berbeda menyebabkan mikroorganisme melawan rifampisin. Streptolydigin juga menghalangi inisiasi transkripsi dengan mengikat dengan subunit β RNA polimerase. Bicyclomycin, targetnya adalah terminasi protein P, mencegah terminasi transkripsi. Bleomycin menghasilkan torehan pada DNA. Bleomycin tidak cocok digunakan untuk manusia, karena tidak spesifik untuk bakteri dan memiliki efek toksik yang tinggi terhadap manusia dan hewan, hanya digunakan untuk eksperimen transkripsi. Azaserin memblokir transkripsi dengan menghambat sintesis ribonukleosida trifosfat.

5. Menghambat Sintesis Asam Folat

Masing-masing obat ini menghambat langkah-langkah berbeda dalam metabolisme asam folat. Kombinasi obat sulfa dan trimetoprim yang bekerja pada langkah berbeda pada jalur biosintetik yang sama menunjukkan sinergi dan penurunan tingkat mutasi untuk resistensi. Sulfonamida menghambat dihidropteroat sintase (DHPS) secara kompetitif dengan afinitas yang lebih tinggi untuk enzim daripada substrat alami, asam p-aminobenzoat. Agen seperti trimethoprim bekerja pada tahap akhir sintesis asam folat dan menghambat enzim dihydrofolate reductase.

1.5 Fenomena Resistensi Antibiotik

Selama beberapa dekade, resistensi antimikroba (AMR) telah menjadi ancaman yang semakin besar terhadap pengobatan dari berbagai infeksi yang terus meningkat yang disebabkan oleh bakteri, parasit, virus, dan jamur. AMR menyebabkan berkurangnya efektivitas obat antibiotik, antiparasit, antivirus dan antijamur, membuat pengobatan pasien sulit, mahal, bahkan sulit dilakukan.

Dampak pada pasien yang sangat rentan paling jelas, mengakibatkan penyakit yang berkepanjangan dan peningkatan mortalitas.

Terdapat beberapa mekanisme resistensi antibiotik:

1. Adanya perubahan yang terjadi pada reseptor yang terhubung ke obat dan wilayah area target koneksi antibiotik berbeda. Mereka dapat berupa berbagai enzim dan ribosom. Resistensi yang terkait dengan perubahan target ribosom paling sering diamati pada antibiotik makrolida. Mutasi pada protein pengikat penisilin (beta-laktamase enzim) dan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* dan strain *Enterococcus faecium* dapat mengembangkan resistensi terhadap penisilin. Perubahan struktur target, beta-laktam, kuinolon, glikopeptida, makrolida, tetrasiklin dan resistensi rifampisin merupakan mekanisme penting dalam perkembangan.
2. Inaktivasi enzim antibiotik: Sebagian besar bakteri Gram-positif dan Gram-negatif mensintesis enzim yang mendegradasi antibiotik. Mekanisme inaktivasi enzimatis ini merupakan salah satu mekanisme resistensi yang paling penting. Mekanisme seperti ini diamati pada antibiotik beta-laktamase dan aminoglikosida.
3. Pengurangan permeabilitas membran dalam dan luar: Resistensi ini karena perubahan permeabilitas membran internal dan eksternal, penurunan serapan obat ke dalam sel atau dengan cepat dikeluarkan dari aktivitas sistem pompa. Penurunan permeabilitas membran luar dapat memainkan peran penting dalam resistensi terhadap kuinolon dan aminoglikosida.
4. Bilas keluar obat (Sistem Pompa Aktif): Resistensi yang berkembang melalui sistem pompa aktif yang paling umum terjadi pada kelompok antibiotik tetrasiklin. Tetrasiklin dibuang dengan sistem pompa aktif yang bergantung pada energi dan tidak dapat terakumulasi di dalam sel. Resistensi semacam itu ada dalam kendali plasmid dan materi kromosomal. Sistem pemompaan aktif efektif dalam menahan kuinolon, makrolida beranggota 14, streptogramin, kloramfenikol dan beta-laktam.
5. Menggunakan jalur metabolik alternatif.

Bakteri memiliki plastisitas genetik yang luar biasa yang memungkinkan mereka merespons berbagai ancaman lingkungan, termasuk keberadaan molekul

antibiotik yang dapat membahayakan keberadaan mereka. Bakteri hidup pada lingkungan yang sama dengan berbagai organisme penghasil antimikroba sehingga mereka telah mengembangkan mekanisme dalam menghadapi efek molekul antibiotik berbahaya dan, akibatnya, resistensi intrinsiknya memungkinkan mereka berkembang pada lingkungannya. Dari perspektif evolusi, bakteri menggunakan dua strategi genetik utama untuk beradaptasi dengan “serangan” antibiotik: (i) mutasi pada gen yang sering dikaitkan dengan mekanisme kerja senyawa dan (ii) akuisisi kode DNA asing untuk determinan resistensi melalui *Horizontal Gene Transfer* (HGT).

Resistensi karena Mutasi (Mutation Resistance)

Dalam skenario ini, materi genetik dari sel bakteri yang berasal dari populasi yang rentan mengembangkan mutasi pada gen yang mempengaruhi aktivitas obat antibiotik, mengakibatkan sel dapat *survive* ditengah keberadaan antibiotik. Begitu mutan resisten muncul, antibiotik menghilangkan populasi yang rentan, dan bakteri resisten mendominasi. Dalam banyak kasus, mutasi yang mengarah ke resistensi merugikan homeostasis sel (kebugaran sel menurun) dan hanya dipertahankan jika diperlukan dengan kehadiran antibiotik. Secara umum, mutasi yang mengakibatkan resistensi antimikroba memanipulasi kerja antibiotik melalui salah satu mekanisme berikut: (i) modifikasi target antimikroba (menurunkan afinitas terhadap obat), (ii) penurunan penyerapan obat, (iii) aktivasi mekanisme pengeluaran untuk mengekstraksi molekul berbahaya, atau (iv) perubahan pada proses metabolisme melalui modulasi jaringan regulasi. Dengan demikian, resistensi yang timbul karena mutasi yang diperoleh beragam dan kompleksitasnya bervariasi.

Horizontal Gene Transfer (HGT)

Akuisisi materi DNA asing melalui HGT adalah salah satu bagian terpenting evolusi bakteri, dan seringkali bertanggung jawab atas pengembangan resistensi antimikroba. Sebagian besar agen antimikroba yang digunakan dalam praktik klinis adalah produk alami yang ditemukan di lingkungan (kebanyakan tanah). Bakteri yang membersihkan lingkungannya (dari bakteri patogen) dengan

molekul-molekul ini memiliki faktor penentu genetik intrinsik resistensi, dan ada bukti kuat yang menunjukkan bahwa *resistensi lingkungan* adalah sumber yang produktif perolehan gen resistensi antibiotik pada bakteri yang relevan secara klinis. Lebih jauh, pertukaran genetik ini telah terlibat dalam penyebaran resistensi terhadap banyak antibiotik yang sering digunakan. Secara klasik, bakteri memperoleh materi genetik eksternal melalui tiga strategi utama: (i) transformasi (dalam gabungan DNA telanjang), (ii) transduksi (fagemediasi), dan (iii) konjugasi (“seks” bakteri). Transformasi mungkin adalah tipe HGT yang paling sederhana, tetapi hanya segelintir spesies bakteri yang dapat secara alami memasukkan DNA telanjang untuk mengembangkan ketahanan. Munculnya resistensi di lingkungan rumah sakit sering kali melibatkan konjugasi, metode transfer gen yang sangat efisien yang melibatkan kontak sel ke sel dan kemungkinan besar terjadi pada saluran pencernaan manusia karena efek pengobatan dengan antibiotik. Konjugasi menggunakan *mobile genetic elements* (MGEs) sebagai sarana untuk berbagi informasi genetik, meskipun transfer langsung dari kromosom ke kromosom juga telah diketahui. MGE yang paling penting adalah plasmid dan transposon, keduanya memainkan peran penting dalam pengembangan dan penyebaran resistensi antimikroba di antara organisme. Salah satu mekanisme yang paling efisien untuk mengakumulasi gen resistensi antimikroba diwakili oleh *integrons*, yang merupakan rekombinasi lokasi spesifik. Integron menyediakan mekanisme yang efisien dan cukup sederhana untuk penambahan gen baru ke dalam kromosom bakteri.

1.6 Managemen Resistensi Antibiotik

Antibiotik telah memberi kita standar kesehatan yang cenderung kita anggap remeh. Standar ini terancam oleh pengembangan resistensi, yang tentunya sangat lambat, tetapi dalam jangka panjang akan sangat mengganggu kemungkinan pengobatan infeksi bakteri. Empat prinsip dasar untuk mengendalikan resistensi antibiotik, yaitu (i) mencoba untuk membatasi penggunaan antibiotik dengan menggunakannya secara lebih spesifik melalui diagnosis bakteri yang ketat dan penentuan resistensi. Intensi di sini adalah untuk menurunkan tekanan pemilihan, untuk setidaknya memperlambat perkembangan resistensi. (ii) Prinsip kedua adalah

menyelidiki asal mula resistensi dan penyebarannya untuk menemukan cara untuk menetralkan efeknya. (iii) Prinsip ketiga termasuk membuat inventarisasi agen antibiotik yang telah banyak beredar di industri farmasi, mungkin karena tingkat toksisitas yang diamati. Pada akhirnya kita mungkin harus memilih antara kemungkinan mengobati infeksi serius dan risiko efek samping dari penggunaan antibiotik. (iv) Prinsip dasar keempat dan terpenting untuk menguasai resistensi antibiotik adalah mencoba menemukan agen antibiotik yang benar-benar baru. Industri farmasi telah menunjukkan ketertarikan yang berkurang pada bidang ini selama beberapa tahun, namun, setidaknya mengenai kelanjutan tradisi lama penyaringan produk alami. Ini bisa dimengerti. Jika agennya efisien, infeksi sembuh dengan cepat dan pengobatan dapat dihentikan. Penjualannya relatif kecil. Juga, seperti yang telah dijelaskan, resistensi muncul segera setelah agen baru diperkenalkan. Oleh karena itu, antibiotik tidak begitu menarik dari sudut pandang penjualan.

Dalam diskusi tentang menangkal atau setidaknya memperlambat perkembangan resistensi dengan membatasi penggunaan antibiotik, menjadi relevan untuk menanyakan apakah sifat resistensi bakteri dapat dibalik. Artinya, apakah kerentanan antibiotik akan kembali jika tekanan seleksi berhenti? Jika ini masalahnya, ini mengundang solusi yang akan mencakup penggunaan antibiotik siklik. Artinya, ketika resistensi yang tinggi dan tersebar luas menyerang satu antibiotik, distribusinya dihentikan dan ditukar dengan yang lain sampai kerentanan mungkin kembali melalui perkembangan evolusioner. Masuk akal untuk menduga bahwa resistensi melibatkan biaya biologis terhadap bakteri, karena itu termasuk sebuah deviasi molekuler dari fisiologi normal sel bakteri yang telah beradaptasi dengan lingkungannya untuk waktu yang lama selama evolusi.

Sejalan dengan pemikiran ini, ada eksperimen klinis yang menarik di Swedia selatan, di mana dokter rawat jalan di satu daerah kabupaten memutuskan untuk tidak meresepkan trimetoprim untuk infeksi bakteri, yang agen antibiotik yang setara tersedia. Tujuannya adalah untuk mengetahui apakah peningkatan resistensi trimetho-prim yang telah diamati di daerah tersebut akan stabil atau mungkin berkurang. Hasilnya negatif, bagaimanapun, mungkin karena plasmid membawa resistensi trimetoprim juga membawa gen resistensi lain, dan resistensi

trimetoprim kemudian dipilih bersama dengan mereka. Evolusi resistensi sangat efisien dalam konteks klinis.

(<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781118075609.fmatter>)

BAB II
METODE DALAM EKSPLORASI SENYAWA BARU POTENSIAL
SEBAGAI ANTIBIOTIK

II.1 Metode In-Vitro

Difusi Agar

Berbagai metode In Vitro dapat digunakan untuk mengevaluasi atau skrining aktivitas antimikroba dari ekstrak kasar atau ekstrak murni senyawa. Salah satu metode yang sering digunakan adalah metode difusi agar. Pengujian difusi agar disk dikembangkan pada tahun 1940 sebagai metode yang digunakan oleh banyak laboratorium mikrobiologi klinis untuk uji kerentanan antimikroba. Terdapat beberapa metode difusi diantaranya metode *disc diffusion* atau metode Kirby-Baure, metode *E-Test*, *Ditch plate technique*, *Cup-plate technique* dan *Gradient-plate technique*. Diantara metode tersebut yang paling dikenal dan sering digunakan dalam pengujian antibiotik adalah metode difusi agar Kirby-Bauer.



Gambar 14. Metode Difusi Agar
(Balouiri *et al.*, 2016)

Difusi cakram atau uji Kirby-Bauer adalah salah satu teknik mikrobiologi klasik dan masih sangat umum digunakan. Metode ini memiliki keunggulan diantaranya, kemudahan dalam mengenali biakan, efisiensi waktu, biaya relatif lebih murah, fleksibilitas yang lebih besar dan kemudahan menafsirkan hasil yang ditemukan. Adapun kelemahan dari metode ini yaitu tidak dapat membedakan efek bakterisida dan bakteristatik

Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi metode difusi agar yaitu; Jenis media yang digunakan, kondisi dan waktu inkubasi, kepadatan inokulum yang akurat, penempatan *paper disc* yang harus diletakkan dengan kuat pada permukaan agar serta ketebalan agar dalam cawan petri. Ketebalan agar dalam cawan petri dapat memengaruhi ukuran dari zona hambat yang terbentuk (Balouiri dan Ibnusoiuda, 2016). Pada metode ini, *paper disc* direndam dengan antibiotik yang telah ditentukan konsentrasinya, *paper disc* diletakkan di permukaan agar. Setelah inkubasi (24 jam pada 35°C). Adanya zona hambat yang terbentuk menjadi indikator adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antibiotik. Zona hambat yang terbentuk diukur hingga milimeter terdekat. *Paper disc* yang digunakan harus dibuat dengan spesifikasi yang akurat misalnya, dari Badan Pengawas Obat dan Makanan AS (FDA), WHO, dan DIN. Standar DIN memiliki kisaran paling ketat dengan konsentrasi antibiotik dalam 90-125% dari yang disebutkan,



Gambar 15. Metode gradien antimikroba (Epsilometer test)
(Schumacher et al., 2018)

Metode gradien antimikroba (Epsilometer test)

Metode gradien antimikroba menggabungkan prinsip metode pelarutan dengan metode difusi untuk menentukan nilai MIC (Minimal Inhibitory Concentration) menggunakan . Hal ini didasarkan pada kemungkinan terciptanya gradien konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam media agar. The Etests (BioMérieux) adalah versi komersial dari teknik ini. Dalam prosedurnya, strip diresapi dengan peningkatan konsentrasi gradien agen antimikroba dari satu ujung ke ujung lainnya kemudian diletakkan pada permukaan agar yang sebelumnya telah diinokulasi dengan mikroorganisme uji. Metode ini digunakan untuk penentuan MIC dari antibiotik, antijamur dan antimikobakteri. Nilai MIC dapat dilihat pada daerah inokulasi strip dan elips yang terbentuk. Secara umum, metode ini sederhana untuk dilakukan. Namun pendekatan ini menjadi mahal jika banyak obat yang diuji.

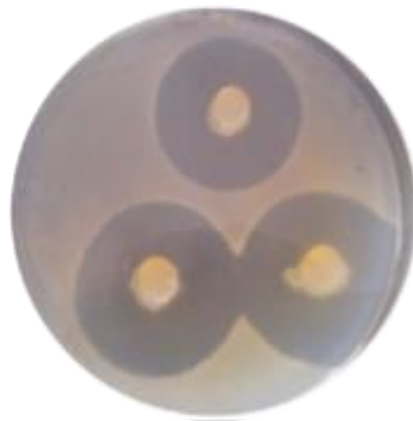


**Gambar 16. Metode difusi agar sumuran (Agar well diffusion method)
(Balouiri *et al.*, 2016)**

Metode difusi agar sumuran (Agar well diffusion method)

Metode difusi agar sumuran banyak digunakan untuk mengevaluasi aktivitas antimikroba tanaman atau ekstrak mikroba. Serupa dengan prosedur yang digunakan dalam metode difusi cakram, permukaan pelat agar diinokulasi dengan menyebarkan volume inokulum mikroba ke seluruh permukaan agar-agar. Kemudian, lubang dengan diameter 6 sampai 8 mm dilubangi dibuat secara aseptik dengan alat steril, dan volume (20–100 mL) agen antimikroba atau larutan ekstrak pada konsentrasi yang diinginkan dimasukkan ke dalam sumur. Kemudian, pelat

agar diinkubasi, agen antimikroba berdifusi dalam media agar dan menghambat pertumbuhan mikroba uji.



Gambar 17. Metode difusi agar plug (Agar plug diffusion method)
(Balouiri *et al.*, 2016)

Metode difusi agar plug (Agar plug diffusion method)

Metode difusi agar plug sering digunakan untuk menentukan antagonisme antara mikroorganisme, dan prosedurnya mirip dengan yang digunakan dalam metode difusi disk. Ini melibatkan pembuatan kultur agar dari strain yang diinginkan pada media pertumbuhan yang sesuai. Selama pertumbuhannya, sel mikroba mengeluarkan molekul yang berdifusi di media. Setelah inkubasi, agar-plot atau silinder dipotong secara aseptik dan diletakkan pada permukaan agar lain yang sebelumnya telah diinokulasikan dengan mikroorganisme uji. Zat menyebar dari sumbat ke media agar. Kemudian aktivitas antimikroba dari molekul yang disekresikan oleh mikroba dideteksi dengan munculnya zona hambat disekitar sumbat agar.



Gambar 18. Metode Cross Streak Method (Agar plug diffusion method)
(Palla *et al.*, 2018)

Cross streak method

Metode cross streak digunakan untuk mengetahui sifat antagonisme mikroorganisme. Strain mikroba potensial diinokulasikan dengan metode goresan di tengah cawan agar. Setelah masa inkubasi strain mikroba, media diinokulasikan kembali dengan mikroorganisme uji dengan garis tunggal tegak lurus terhadap garis tengah. Setelah inkubasi lebih lanjut, interaksi antimikroba dianalisis dengan mengamati ukuran zona hambat.

II.2 Metode In-Silico

Prinsip Kerja dan Penerapan Uji In-Silico

Saat ini, uji in-silico banyak diterapkan dalam eksplorasi senyawa oba, diantaranya melalui *homology modelling*, *molecular docking*, *Quantitative structure activity relationship (QSAR)*, *3D pharmacophore mapping* dan lain-lain. Dalam proses pengembangan obat, sangat penting untuk mengevaluasi potensi risiko toksikologis dari kandidat obat sedini mungkin untuk mengurangi biaya dan waktu yang digunakan. Secara tradisional, risiko toksikologis suatu senyawa diselidiki dengan menggunakan metode in vivo dan in vitro. Sejak akhir 1970-an banyak metode silico yang berbeda untuk prediksi toksisitas telah dikembangkan. Istilah in silico berasal dari komponen komputer silicium, metode dalam silico, oleh karena itu, merujuk pada metode atau prediksi menggunakan pendekatan komputasi. Metode in silico memiliki keuntungan karena dapat membuat prediksi cepat untuk serangkaian besar senyawa, prediksi dibuat berdasarkan pada struktur suatu senyawa bahkan sebelum disintesis. Oleh karena itu, metode ini dapat digunakan pada tahap awal dalam proses pengembangan obat, untuk senyawa yang direncanakan akan disintesis, untuk senyawa yang tidak ada atau hanya sedikit yang tersedia.

In silico memiliki beberapa cakupan diantaranya: (1) *Studi docking* merupakan pembelajaran komputasi pada ligan yang akan berikatan dengan protein target, (2) Formasi Kimia, dimana aktivitas dan struktur berkorelasi dengan menggunakan sarana statistika. Beberapa kegunaan uji *In silico* yaitu digunakan

untuk penemuan senyawa baru, memprediksi, meningkatkan efisiensi dalam aktivasi senyawa induk dan juga dapat memberi hipotesis.

Salah satu metode *in silico* yang banyak digunakan adalah *molecular docking*, ini adalah metode komputasi yang digunakan untuk memprediksi interaksi dua molekul menghasilkan model yang mengikat. Molekul atau senyawa tersebut terdiri atas senyawa potensial (ligan) dan senyawa target (makromolekul). Senyawa potensial dapat berupa senyawa hasil analisis kandungan tumbuhan, sedangkan senyawa target dapat berupa protein, DNA, dan RNA. Dalam banyak aplikasi penemuan obat, docking dilakukan antara molekul kecil dan makromolekul, misalnya docking protein-ligan. Saat ini, docking juga diterapkan untuk memprediksi mode pengikatan antara dua makromolekul, misalnya docking protein-protein. Penambatan molekul (*Molecular docking*) dapat dianggap sebagai masalah gembok dan kunci (*lock and key*), protein dapat dianggap sebagai gembok dan ligan dapat dianggap sebagai kunci. Penambatan molekul dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu. Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan daerah ikatan (*binding site*) pada protein. Beberapa kemungkinan konformasi dalam ikatan antara ligan dan protein target mungkin terjadi, yang disebut dengan mode ikatan.

Energi ikatan hasil *docking* merupakan parameter utama untuk mengetahui kestabilan antara ligan dan protein. Interaksi antara ligan dan reseptor akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah. Energi yang paling rendah menunjukkan bahwa molekul berada pada kondisi yang stabil, sehingga semakin rendah nilai *binding affinity* maka interaksi ligan-reseptor semakin stabil.

Klasifikasi molecular docking berdasarkan jenis ligannya (Inbio-Indonesia).

Berdasarkan jenis ligannya, molecular docking dibedakan menjadi beberapa golongan, yaitu:

- Protein-protein docking (protein reseptor dengan protein-ligan).

Protein-protein docking adalah salah satu cabang dari metode molecular docking yang melibatkan dua protein berbeda yang mana ukuran kedua protein ini relatif tidak jauh berbeda (sama). Biasanya, permukaan bagian protein reseptor

yang berfungsi sebagai lokasi docking (docking site) cenderung lebih datar (planar) jika dibandingkan dengan permukaan bagian protein reseptor yang berfungsi sebagai lokasi docking yang melibatkan protein dengan ligan yang berukuran kecil (small molecule). Kondisi (docking terjadi di permukaan protein reseptor yang cenderung datar) relatif umum ditemukan pada kompleks docking yang melibatkan protein dengan protein lainnya. Namun, pada beberapa kasus yang relatif sangat jarang juga pernah ditemukan sebuah kompleks docking yang melibatkan dua protein berbeda, dan lokasi docking pada kompleks ini berada di dalam salah satu rongga di permukaan protein reseptor.

- Protein-ligan docking:
 1. Protein-small molecule docking (protein reseptor dengan molekul kecil).
 2. Protein-DNA/RNA docking (protein reseptor dengan asam nukleat).

Protein-ligan docking adalah salah satu cabang dari metode molecular docking yang melibatkan sebuah molekul berukuran besar (protein reseptor) dengan sebuah molekul berukuran kecil (ligan). Metode protein-ligan docking sangat sering digunakan dalam penelitian yang bertujuan untuk menemukan senyawa kandidat obat baru maupun memodifikasi senyawa obat yang sudah ada dengan tujuan agar efikasinya semakin meningkat atau untuk meminimalisir efek samping yang bisa ditimbulkan oleh senyawa obat tersebut. Pada metode ini dikenal istilah umum yaitu lock and key yang mana artinya selama proses docking berlangsung, ligan diposisikan di dalam sebuah rongga yang terdapat di permukaan protein reseptor.

Klasifikasi molecular docking berdasarkan fleksibilitas molekul

Berdasarkan jenis ligannya, metode molecular docking dibedakan menjadi tiga golongan, yaitu:

- Rigid Docking

Rigid docking adalah salah satu cabang dari metode molecular docking yang memposisikan molekul yang akan dipasangkan (di-docking-kan) sebagai objek yang bersifat rigid. Definisi rigid diartikan sebagai suatu kondisi dimana kedua molekul yang digunakan dikondisikan untuk tetap (tidak mengalami perubahan konformasi) selama proses docking sedang berlangsung.

- Semi-Flexible Docking

Semi-flexible docking adalah salah satu cabang dari metode molecular docking yang memperlakukan dua molekul yang akan dipasangkan secara berbeda (asimetris). Salah satu molekul (biasanya molekul yang berukuran lebih kecil; ligan) diperlakukan sebagai molekul yang fleksibel sedangkan molekul yang berukuran lebih besar (protein reseptor) diperlakukan sebagai molekul yang rigid.

- Flexible Docking

Flexible docking adalah salah satu cabang dari metode *molecular docking* yang memperlakukan dua molekul yang akan dipasangkan sebagai molekul yang fleksibel meskipun pada aplikasinya, fleksibilitas salah satu atau kedua molekul yang akan di-*docking* relatif dibatasi (telah disederhanakan). Selain itu, metode *flexible docking* juga dapat dilakukan melalui metode simulasi dinamika molekuler.

Pengembangan Obat dengan “Molecular Docking”

Metode docking ini berkembang pesat untuk mendesain obat yang spesifik, cepat dan murah. Obat biasanya terbuat dari senyawa kecil yang mampu mengikat spesifik pada permukaan atau di bagian dalam suatu protein. Ikatan tersebut dapat mempengaruhi fungsi dari protein, baik menghambat atau memicu aktivitasnya. Sampai sekarang setidaknya sudah ada 60 program docking dan yang paling sering digunakan adalah Discovery Studio dan autodock Vina. Autodock Vina memiliki akurasi sangat baik dan banyak digunakan untuk menghitung binding affinity antara small molecule dengan protein. Adapun Discovery Studio merupakan software yang mudah digunakan, memiliki multi fungsi, namun harga lisensinya relatif mahal.

Pengetahuan tentang struktur dan ligan binding site dari protein reseptor merupakan bagian terpenting sebelum melakukan docking. Tanpa mengetahui sisi pengikatan ligan, maka docking menjadi kurang terarah dan sulit untuk memperoleh hasil yang maksimal. Docking dilakukan dengan software yang lisensi terbuka dan melalui langkah-langkah sebagai berikut:

- ✓ persiapan protein dan ligan;
- ✓ proses docking;
- ✓ melakukan scoring;

✓ filtering dan refinement.

Persiapan docking dapat dilakukan dengan menggunakan software PyMol, proses docking dengan autodock vina yang terintegrasi dalam software PyRx, sedangkan analisis interaksi docking dapat dianalisis dengan Discovery Studio dan LiGPlot.

Secara umum, metode *in silico* menawarkan banyak keuntungan seperti tidak digunakannya hewan uji sehingga biaya rendah dan pengurangan waktu eksekusi. Metode ini merujuk pada percobaan hewan sebelumnya, atau data *in vitro* dalam beberapa kasus (kebanyakan untuk model mutagenisitas, karena ketersediaan data *in vitro* umumnya masih agak terbatas), artinya dalam metode ini data *in vitro* dan *in vivo* bersifat fundamental. Namun, ketidakpastian data *in vivo* membatasi keakuratan metode ini. Walaupun model *in silico* didasarkan pada data eksperimental, jika datanya tidak pasti, maka hasilnya juga akan buruk, karena itu, penting untuk memeriksa kualitas data sebelum melakukan pengujian. Di sisi lain, karena dalam metode *in silico* bersifat statistik, metode ini dapat mengatasi kesalahan dalam data toksisitas. Jadi dalam beberapa kasus, metode ini dapat menemukan nilai yang tidak biasa dalam serangkaian senyawa yang serupa. Beberapa model *in silico* lebih kuat untuk data yang belum pasti daripada yang lain (misalnya jaringan saraf tiruan).

BAB III

CACING TANAH

III.1 Deskripsi Umum Cacing Tanah

Charles Darwin menggambarkan cacing tanah sebagai 'tentara manusia yang tidak diketahui keberadaannya', dan Aristoteles menyebut mereka sebagai 'usus bumi', karena mereka dapat mencerna berbagai macam bahan organik (Darwin 1881). Sebelum buku Darwin diterbitkan, cacing tanah umumnya dianggap sebagai hama tanaman penghuni tanah. Pandangannya tentang aspek manfaat dari cacing tanah didukung dan dikembangkan kemudian oleh ilmuwan kontemporer lainnya seperti Muller (1878), Urquhart (1887), dan banyak lainnya. Cacing tanah merupakan mata rantai penting dalam rantai makanan banyak hewan avertebrata dan vertebrata. Manusia purba menggunakan cacing tanah baik sebagai makanan maupun sebagai umpan dalam berburu dan memancing. Penelitian mengenai potensi cacing tanah dalam mengolah limbah organik dimulai di Jerman dan dilanjutkan di Amerika Serikat. Appelhof (1982) meringkas penelitian ekstensif ke dalam pemecahan limbah padat hayati oleh cacing tanah dan keseluruhan potensi komersial vermikultur hingga saat itu.

III.2 Sebaran Cacing Tanah

Cacing tanah biasa ditemukan di berbagai belahan dunia termasuk di hutan alam, padang rumput serta agroekosistem. Namun, banyak organisme dari kelas oligochaeta hidup diperairan, dan terdapat kontroversi yang cukup besar mengenai sistematika cacing tanah. Meskipun cacing tanah terdapat di seluruh dunia, mereka jarang ditemukan di daerah dengan salju dan es yang konstan, pegunungan pegunungan dan daerah yang hampir seluruhnya kekurangan tanah dan vegetasi. Beberapa spesies tersebar luas, yang disebut peregrine, sedangkan yang lain, yang tidak berhasil menyebar ke daerah lain, disebut endemik. Ketika spesies peregrine ini diperkenalkan ke daerah baru, mereka menjadi dominan di atas spesies endemik. Hewan-hewan ini hidup di habitat yang beragam, menunjukkan aktivitas yang efektif, dengan membawa perubahan fisik dan kimiawi di tanah yang mengarah pada peningkatan keseragaman tanah.

Cacing tanah yang paling umum di Eropa, Amerika Utara, Asia Barat, dan banyak bagian dunia lainnya termasuk kedalam keluarga Lumbricidae, sedangkan di Afrika Barat, banyak cacing tanah yang umum termasuk dalam keluarga Eudrilidae. Di Afrika Selatan terdapat Microchaetidae, di Australia dan bagian lain Asia Timur, Megascolecidae, dan famili Glossoscolecidae mendominasi di Amerika Tengah dan Selatan. Keragaman spesies cacing tanah sangat bervariasi antara lokasi dan habitat, dan sering kali terdapat asosiasi spesies di berbagai tipe tanah dan habitat. Komunitas cacing tanah di tanah di negara beriklim sedang didominasi oleh lumbricidae dan cenderung kurang beragam dibandingkan di tanah dengan keluarga cacing tanah lainnya di garis lintang dengan kondisi yang lebih hangat.

III.3 Peranan Cacing Tanah

Vermicomposting

Penelitian tentang penggunaan cacing tanah untuk mengurai limbah hewan dan nabati serta untuk menghasilkan protein cacing tanah yang dapat digunakan dalam budidaya ikan untuk pakan ternak dimulai pada tahun 1980-an. Berbagai peneliti telah meneliti potensi pemanfaatan limbah olahan cacing tanah, yang biasa disebut vermikompos, dalam industri hortikultura dan pertanian. Baik digunakan sebagai bahan tambahan tanah atau sebagai komponen media hortikultura, kompos vermik biasanya meningkatkan pertumbuhan dan perkembangan bibit, dan meningkatkan produktivitas berbagai jenis tanaman.

Pengomposan merupakan salah satu cara mengubah limbah padat yang mudah terurai menjadi tanah organik yang bermanfaat untuk mendukung sistem produksi pertanian yang ramah lingkungan. Banyak organisme dan mikroorganisme bertindak sebagai pengurai kimiawi dalam proses pembentukan produk akhir organik yang stabil (kompos) selama pengomposan. Diantaranya, pengurai/detrivor seperti cacing tanah memainkan peran penting dalam merangsang proses pengomposan, meningkatkan nilai nutrisi sekaligus mempercepat proses pembentukan produk akhir organik yang stabil. Proses keterlibatan cacing tanah dalam menyiapkan kompos yang diperkaya disebut vermikomposting. Ini adalah

salah satu metode paling sederhana untuk mendaur ulang limbah pertanian dan menghasilkan kompos yang berkualitas.

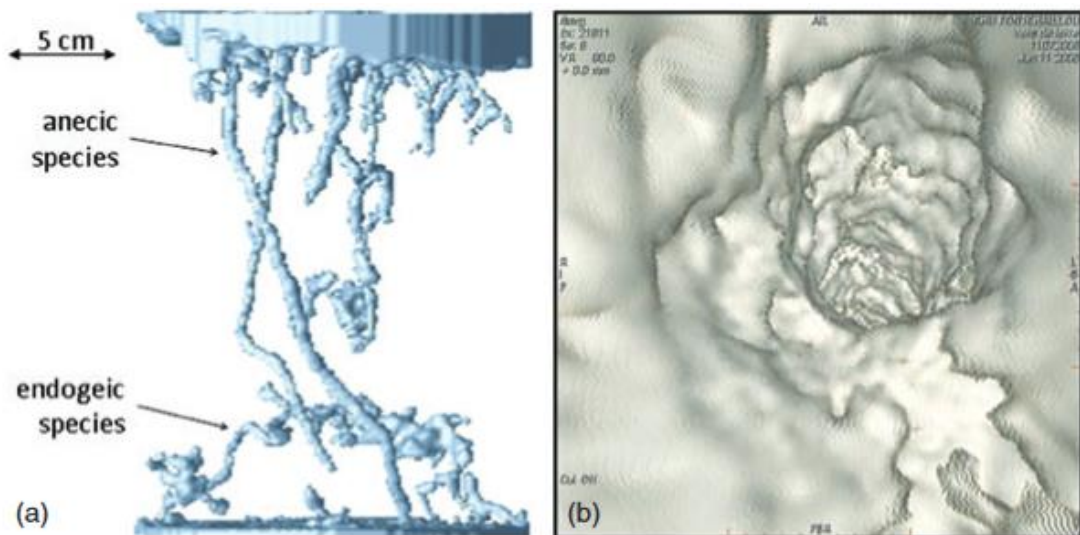
Cacing tanah bertindak secara fisik sebagai aerator, penghancur dan pengaduk, secara kimiawi menjadi pengurai dan secara biologis sebagai stimulator dalam proses pembusukan. Cacing tanah mengkonsumsi biomassa (bahan organik yang membusuk) dan mengeluarkannya dalam bentuk tercerna yang disebut sebagai kotoran cacing atau kotoran cacing. Kotoran cacing tanah ini berbentuk gips, yang seringkali disebut *emas hitam*. Gips cacing kaya akan nutrisi penting untuk tanaman, zat pemacu pertumbuhan tanaman, flora mikro tanah yang bermanfaat dan memiliki sifat penghambat mikroba patogen. Akibatnya, produk akhir organik yang dihasilkan dari penggunaan cacing tanah yaitu vermikompos juga mewarisi sebagian besar khasiat yang bermanfaat (untuk kesehatan tanah dan produktivitas tanaman). Vermikompos dapat meningkatkan kualitas tanah dengan cara memperbaiki sifat fisikokimia dan biologi. Liang tanah dari cacing tanah mengubah sistem hidro-termal dan aerasi tanah dengan membuat tanah lebih berpori sehingga memungkinkan pergerakan udara bebas, infiltrasi air ke lapisan tanah yang lebih dalam untuk yang penting untuk pengaturan kelembaban yang lebih baik dan proses pengambilan air akar. Vermikompos menjadi populer sebagai salah satu komponen utama dari sistem pertanian organik karena nilai gizinya yang tinggi di samping perbaikan tanah organik yang penting.

Nutrient Cycling

Cacing tanah adalah organisme heterotrofik yang terlibat dalam degradasi bahan organik dan molekul besar lainnya, terutama yang diproduksi oleh tumbuhan tetapi juga oleh organisme heterotrofik lainnya. Cacing tanah mempercepat degradasi bahan organik dengan meningkatkan luas permukaan yang tersedia dari bahan organik melalui penghancuran. Setelah dicerna, beberapa senyawa organik dilepaskan ke lingkungan sebagai senyawa organik kecil atau nutrisi mineral. Nutrisi mineral terutama nitrogen (N), digunakan kembali oleh tanaman. Mineralisasi nitrogen meningkat dengan adanya cacing tanah, baik secara langsung melalui pelepasan N oleh produk metaboliknya (urin dan lendir, yang mengandung

NH_4^+ , urea, allantoin dan asam urat) dan jaringan mati, atau secara tidak langsung melalui perubahan sifat fisik tanah dan fragmentasi.

Cacing tanah mempercepat mineralisasi N dari bahan organik, tetapi pengaruhnya tergantung pada spesies dan interaksinya dengan biota tanah lainnya, karakteristik tanah dan lokasi bahan organik. Misalnya dalam suatu percobaan, cacing tanah *Lumbricus rubellus* Hoffmeister (epigeic) dan *L. terrestris* (anecic) meningkatkan mineralisasi sisa tanaman, tetapi cacing tanah *Aporrectodea caliginosa* (endogeic) tidak. Cacing tanah juga memodifikasi siklus N dengan cara lain. Di tanah Mediterania, *Nicodrilus nocturnus* Evans (anecic) mempercepat nitrifikasi, denitrifikasi dan aktivitas biologis lainnya, sedangkan bakteri pengoksidasi NH_4^+ telah dikaitkan dengan dinding liang cacing tanah. Selain itu, cacing tanah menciptakan kondisi tanah yang mendukung nitrifier autotrofik saat aerasi meningkat. Cacing tanah meningkatkan mineral N dalam tanah, dan juga fosfor (P), potassium, kalsium dan magnesium.



Gambar 19. Jaringan liang dibuat oleh cacing tanah, spesies anekik dan spesies endogeik. Pengamatan 3D dengan X-ray tomography. (b) Rekonstruksi liang cacing tanah menggunakan perangkat medis dan tomografi sinar-X

Pengaturan iklim

Cacing tanah meningkatkan intrusi bahan organik ke dalam tanah dan pembentukan makroagregat melalui aktivitas penggalian, konsumsi dan pengeluarannya. Hal ini menunjukkan peran penyerapan karbon karena penyimpanan karbon dalam agregat stabil merupakan proses penting dimana tanah mengakumulasi karbon dan mencegah pelepasannya yang cepat dalam bentuk gas rumah kaca. Namun, proses tersebut sangatlah kompleks. Hasil penelitian menunjukkan bahwa cacing tanah meningkatkan stabilisasi bahan organik tanah hanya jika residu organik ditambahkan pada tanah. Perubahan dalam sistem pengelolaan mungkin merupakan cara yang lebih baik untuk memanipulasi penyerapan karbon dalam konteks pertanian daripada menginokulasi cacing tanah saat tanah tidak terlalu terdegradasi.

Remediasi polusi

Penggunaan cacing tanah untuk pemulihan atau remediasi tanah yang terkontaminasi dapat didasarkan pada beberapa strategi yang berbeda tergantung pada sifat kontaminasi. Cacing tanah di intrusi ke tanah untuk merangsang populasi mikroba, yang pada gilirannya akan mempercepat degradasi kontaminan organik. Metabolisme tanah yang tertelan juga dapat menyebabkan mineralisasi kontaminan organik secara langsung. Untuk kontaminan organik dan anorganik, aktivitas cacing tanah dapat mengurangi jumlah serapan pada partikel tanah melalui pencernaan bahan organik, modifikasi kimia tanah, atau keduanya, dan dengan demikian mengurangi skala waktu yang diperlukan untuk fitoremediasi.

III.4 Klasifikasi Cacing Tanah

Annelida adalah takson protostoma yang terdiri atas lebih dari 17.000 spesies yang tersebar di seluruh dunia, yang dapat ditemukan di habitat laut, limnis, dan terestrial. Peran biologis mereka tidak hanya ditunjukkan pada jumlah spesies yang relatif tinggi tetapi juga pada kelimpahan mereka yang pada umumnya tinggi. Meskipun beberapa spesies dapat ditemukan bersifat plankton sepanjang hidup mereka, annelida biasanya merupakan bagian penting dari endo dan epibenthos di mana mereka menempati hampir setiap relung ekologi yang ada di lingkungan laut.

Annelida dapat ditemukan dari laut dalam ke zona supralittoral dari pantai berpasir. Namun, sebagian besar spesies limnetic dan terrestrial hanya dimiliki oleh satu clade, yang disebut Clitellata, yang anggotanya menunjukkan adaptasi spesifik terhadap kehidupan darat. Jelas karena radiasi adaptif berikutnya, kisaran ekologi luas yang ditempati oleh annelida ini menghasilkan keanekaragaman morfologi yang tinggi.

Cacing tanah merupakan hewan Invertebrata dari filum Annelida, kelas Chaetopoda dan ordo Oligochaeta. Famili dari ordo ini yang sering ditemukan adalah:

- a. Famili Moniligastridae, contoh genus: *Moniligaster*.
- b. Famili Megascolidae, contoh genus: *Pheretima*, *Peryonix*, *Megascolex*.
- c. Famili Acanthodrilidae, contoh genus: *Diplocardia*.
- d. Famili Eudrilidae, contoh genus: *Eudrilus*.
- e. Famili Glossoscolecidae, contoh genus: *Pontoscolex corenthurus*.
- f. Famili Sparganophilidae, contoh genus: *Sparganophilus*.
- g. Famili Tubificidae, contoh genus: *Tubifex*.
- h. Famili Lumbricidae, contoh genusnya yaitu: *Lumbricus*, *Eisenella*, *Binatos*, *Dendrobaena*, *Octalasion*, *Eisenia*, *Allobophora*.

Ada 3 kelompok cacing tanah yang dibedakan berdasarkan tipe ekologi yaitu spesies epigeik, spesies anesik, spesies endogeik.

1. Spesies Epigeik

Cacing tanah yang hidupnya (tinggal dan memperoleh makanan) di permukaan tanah atau di lapisan organik. Cacing tipe epigeik berperan dalam penghancuran seresah dan transformasi bahan organik tetapi tidak aktif dalam penyebaran seresah. Ciri lain dari jenis ini adalah cacing tanah tidak membuat lubang di dalam tanah dan meninggalkan *casting*.

2. Spesies Anesik

Cacing tanah pemakan seresah yang diperolehnya dipermukaan tanah dan dibawa masuk ke segala lapisan dalam profil tanah, melalui aktifitas ini akan membentuk liang atau celah yang memungkinkan sejumlah tanah lapisan dan bahan organik masuk dan tersebar ke lapisan bawah. Cacing tanah tipe ini akan

mempengaruhi sifat fisik tanah antara lain struktur dan konduktifitas hidrolik (Lavelle, 1994).

3. Spesies Endogenik

Cacing tanah yang hidup dan makan didalam tanah, makanannya yaitu bahan organik termasuk akar-akar yang telah mati di dalam tanah, dan sering pula mencernakan sejumlah besar mineral tanah. Kelompok cacing ini berperan penting dalam mencampur seresah yang ada di atas tanah dengan tanah lapisan bawah, dan meninggalkan liang dalam tanah. Kelompok cacing ini membuang kotorannya di dalam tanah. Kotoran cacing ini lebih kaya akan karbon dan hara lainnya daripada tanah disekitarnya.

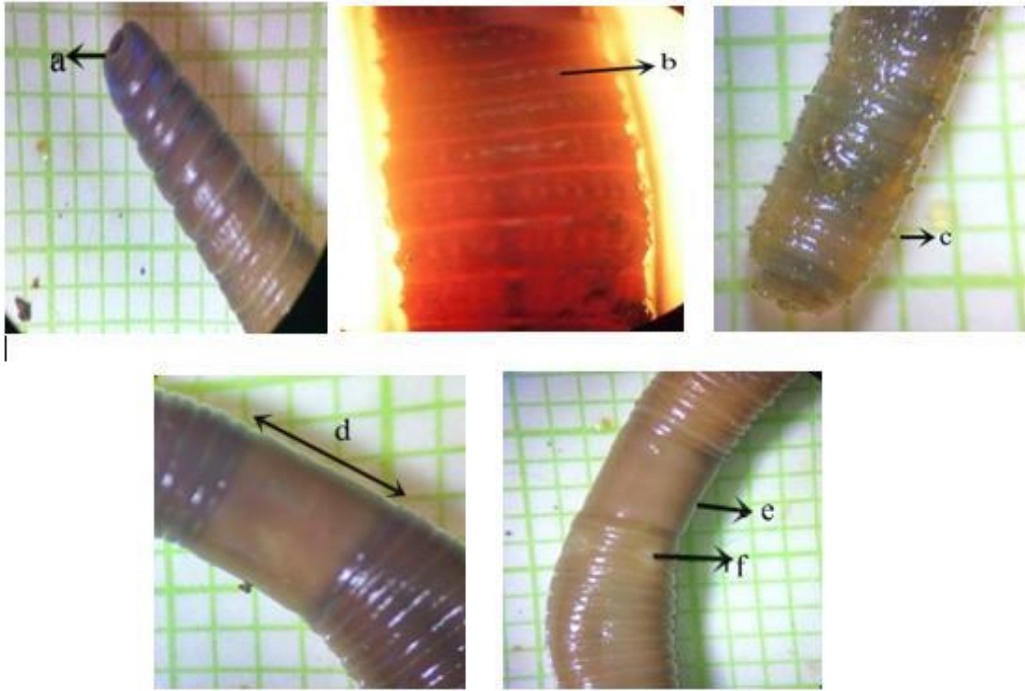
III.5 Cacing Tanah *Pheretima* sp.

Klasifikasi

Berikut ini merupakan klasifikasi dari cacing tanah *Pheretima* sp.:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Annelida
Classis	: Oligochaeta
Ordo	: Oligochaetales
Familia	: Megascolecidae
Genus	: <i>Pheretima</i>
Species	: <i>Pheretima</i> sp.

Karakteristik umum



Gambar 20. Genus *Pheretima* (a) Prostomium (epilobus), (b) sebaran seta (Perichaetine), (c) bentuk seta (general), (d) clitelium, (e) tubercula pubertatis, (f) genital tumescence (1 pasang)

Pheretima merupakan cacing tanah endemik di Asia Tenggara, India Timur, dan Jepang (Gambar 15). Ishizuka (1999) yang mengkarakterisasi *Pheretima* di Jepang mengungkapkan bahwa hewan ini memiliki tubuh silindris dengan banyak setae di setiap segmen. *Clitellum annular* terletak di segmen XIV-XVI. Pori-pori pada jantan berpasangan atau tunggal, membuka pada permukaan segmen XVIII. Pori pada betina terletak di segmen XIV. Pori-pori sperma biasanya berupa *bithecal* pada 4 / 5-8 / 9. Secara internal, *spermatheca* berpasangan pada segmen V-IX (dengan atau tanpa divertikulum), kantong kopulasi jarang ada, memiliki kelenjar *prostat racemose*. *Gizzard* ditemukan pada segmen 7/8 dan 9/10 dan *caeca usus* pada segmen XXVII (jarang pada segmen XXVI). Pori-pori ventral dari segmen 12/13, kadang-kadang dari segmen 11/12 atau 13/14.

III.6 Cacing Tanah *Lumbricus* sp.



**Gambar 21. Cacing tanah *Lumbricus terrestris*
(CABI, 2019)**

Klasifikasi

Berikut ini merupakan klasifikasi dari cacing tanah *Lumbricus terrestris*:

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Annelida
Classis	: Oligochaeta
Ordo	: Oligochaetales
Familia	: <i>Lumbricidae</i>
Genus	: <i>Lumbricus</i>
Species	: <i>Lumbricus terrestris</i>

Karakteristik Umum

Panjang 110-200 mm, diameter 7-10 mm, jumlah segmen 120-170, sebagian besar berjumlah 135-150 segmen. Tubuh silinder kecuali pada bagian posterior berbentuk lebar dan rata. Ujung kepala berwarna coklat tua sampai coklat kemerahan pada punggung, pigmentasi punggung memudar ke arah posterior. Prostomium tanylobous (bantalan dua alur kecil di sisi punggung segmen pertama, masing-masing alur mencapai batas intersegmental pertama), pori-pori punggung terletak pada segmen 7/8 atau 8/9; pori-pori spermathecal lateral pada segmen 9/10/11.

Cacing tanah dari genus *Lumbricus* terdiri atas *L. Terrestris* dan *L. rubellus*. *L. terrestris* diperkirakan berasal dari Eropa Barat tetapi sekarang tersebar secara global. *L. terrestris* Linnaeus (1758) adalah cacing tanah pertama yang diberi nama dalam sistem Linnaean, tetapi terdapat perdebatan yang cukup sengit tentang identitas cacing tersebut, validitas nama dan aspek nomenklatur lainnya karena deskripsinya sangat singkat dan tidak ada spesimen jenis yang disimpan oleh Linnaeus. spesies yang identik secara morfologis *Enterion herculeum* Savigny (1826) diusulkan oleh beberapa ahli sebagai anggota pertama dari genus *Lumbricus*, dan nama *L. herculeus* disukai oleh beberapa ahli taksonomi dimasa lalu. Beberapa nama lain, sekarang diyakini sebagai sinonim *L. terrestris*, juga diusulkan.

Setelah lebih dari 2000 tahun mobilitas manusia, menentukan habitat asli untuk cacing tanah invasif umum di Eropa tampaknya merupakan tugas yang mustahil. Penggunaan teknik molekuler dapat membantu untuk mengidentifikasi asal tepatnya tetapi membutuhkan sampel populasi yang ekstensif di Eropa Barat dan Tengah. Secara potensial, genus *Lumbricus* dapat berkisar dari Pyrenees melintasi Prancis melalui Austria, Hongaria dan Rumania, hingga Jerman selatan. *L. herculeus* yang sedikit lebih kecil tetapi hampir identik ditemukan dari Prancis dengan populasi invasif di sana dan di Swedia.

III.7 Eksistensi Mikroorganisme pada Cacing Tanah sebagai Endosimbion

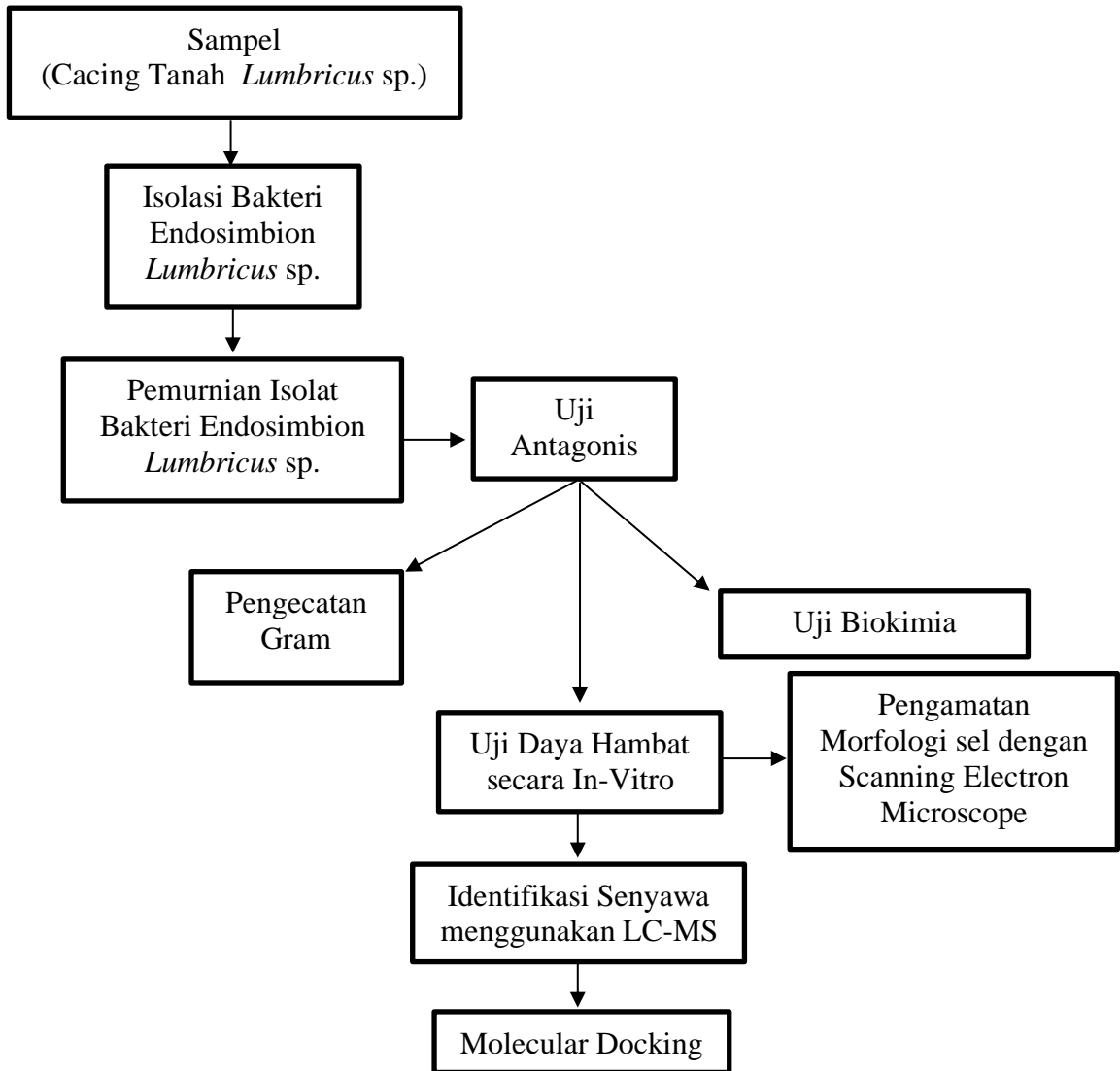
Spesies umum dari kelompok ekologi cacing tanah membantu perkembangan komunitas bakteri pada usus cacing. Bakteri-bakteri spesifik dalam dinding usus termasuk dalam kelompok Proteobacteria, Firmicutes dan Actinobacterium. Hasil penelitian menunjukkan bahwa jenis dan habitat sumber daya makanan dapat menyebabkan pergeseran komunitas bakteri di dinding usus.

Komunitas mikroba dari saluran pencernaan cacing tanah mengandung bakteri dari berbagai taksa. Pada studi lain, bakteri yang diisolasi dari cacing tanah termasuk dalam famili Aeromonadaceae, Comamonadaceae, Enterobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Sphingobacteriaceae (Bacteroidetes), dan Actinobacteria. Beberapa strain menunjukkan kemiripan yang rendah dengan taksa yang dikenal (93-97%) dan mungkin termasuk spesies dan genera baru. Sejumlah anggota taksa baru dapat diungkapkan dengan analisis yang

lebih terperinci dengan menumbuhkan bakteri (yang melibatkan aplikasi berbagai media dan kondisi budidaya, termasuk yang anaerob).

Host seperti cacing tanah sangatlah penting dalam menyediakan host dengan fungsi biologis baru. Simbion menampilkan keunikan di antara para mitra yang telah dipelajari, misalnya simbiosis antara cumi-cumi dan simbioluminesen mereka, *Vibrio fischeri*, sangat bernilai tinggi ketika berbicara mengenai peranan ekologis dan reproduksinya. Dalam sistem simbiotik lain, misalnya, bakteri endosimbiotik obligat pada serangga, pasangannya saling tergantung satu sama lain dan tidak dapat dipisahkan. Pada cacing tanah, simbion memiliki efek menguntungkan pada reproduksi inang dan kemungkinan hidup pada produk limbah inang mereka.

BAB IV
STUDI KASUS: MENGUNGKAP POTENSI ANTIBIOTIK SENYAWA
BAKTERI ENDOSIMBION SECARA IN-VITRO DAN IN SILICO



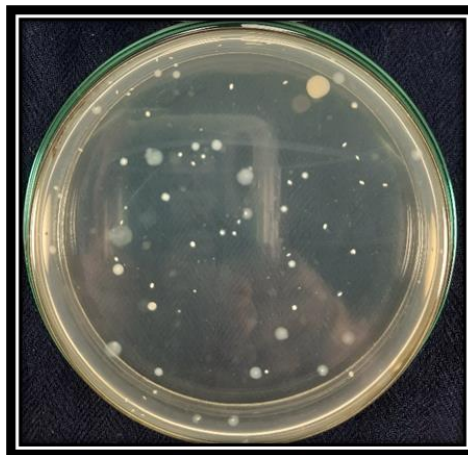
Gambar 22. Skema Kerja Penelitian

IV.1 Isolasi Bakteri Endosimbion

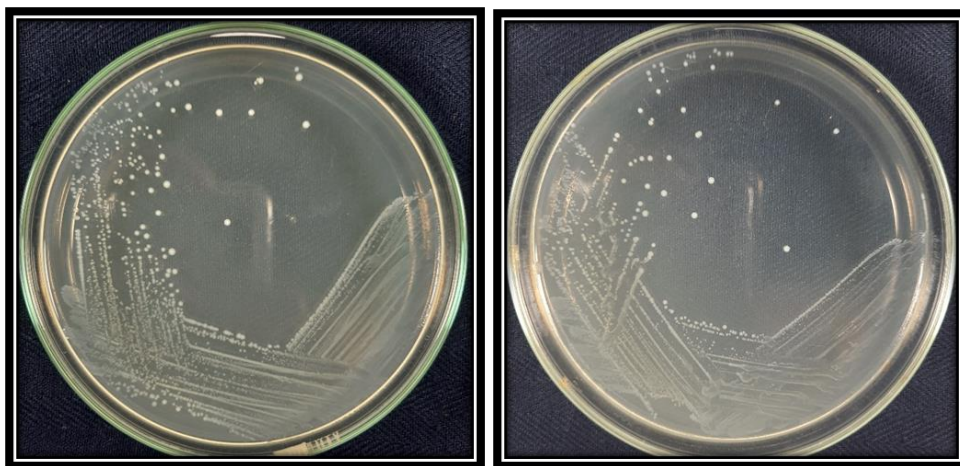
Cacing tanah *Lumbricus* sp. diperoleh dari tepi danau kampus Universitas Hasanuddin Tamalanrea Makassar (5°08.254'S, 119°29.'E). Cacing tanah tersebut diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi dan habitatnya. Hasil isolasi dengan menggunakan media TSA diperoleh berbagai bentuk koloni bakteri yang kemudian dimurnikan hingga diperoleh koloni tunggal. Dari beberapa koloni

tersebut dipilih dua isolat untuk diuji karakteristiknya seperti yang disebutkan diatas. Kedua isolat yang memiliki karakter yang berbeda tersebut diberi kode masing-masing isolat BLT1 dan BLT2.

Medium yang direkomendasikan untuk menumbuhkan bakteri endosimbion cacing tanah adalah medium TSA yang merupakan medium *enrichment* untuk menumbuhkan bakteri endosimbion *Lumbricus* sp. Dikutip dari Liofilchem (2017) TSA merupakan media yang digunakan untuk mendeteksi, mengisolasi, dan mengkultivasi mikroorganisme fastidious dan non-fastidious yang berasal dari spesimen klinis dan lingkungan. TSB mendukung pertumbuhan berbagai jenis mikroorganisme termasuk mikroorganisme aerob, anaerob, dan fakultatif. Keempat isolat tersebut kemudian diuji antagonis sebagai uji pendahuluan.



Gambar 23. Hasil isolasi bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp.

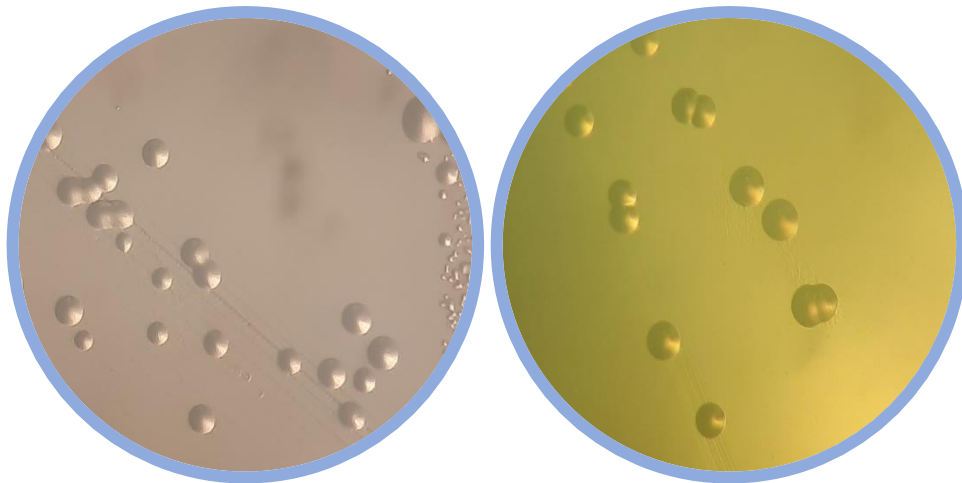


Gambar 24. Hasil pemurnian bakteri endosimbion cacing tanah *Lumbricus* sp. Isolat BLT1 (kiri) dan Isolat BLT2 (kanan)

IV.2 Karakterisasi Morfologi

Pengamatan morfologi bakteri terdiri atas pengamatan koloni bakteri dan pengamatan sel bakteri melalui pengecatan gram. Koloni bakteri yang terbentuk pada dasarnya berasal dari sel tunggal, namun ketika suatu bakteri tumbuh pada media agar, terdapat beberapa karakteristik koloni yang terbentuk, diantaranya warna, elevasi, margin dan bentuk koloninya. Pengamatan morfologi koloni menggunakan mikroskop stereo, hasil pengamatan menunjukkan bahwa kedua isolat memiliki bentuk circular, elevasi convex, margin entire dan warna putih susu.

Hasil pengamatan dibawah mikroskop menunjukkan bahwa isolat BLT1 dan BLT2 memiliki sifat gram positif yang berbentuk batang (basil). Pada pengamatan dibawah mikroskop, sel gram positif akan berwarna ungu dan sel gram negatif akan berwarna merah muda. Pengecatan gram bertujuan untuk mengetahui karakteristik dinding sel bakteri yang tergolong ke dalam kelompok bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Dalam isolasi bakteri, metode ini merupakan screening awal untuk melanjutkan identifikasi bakteri bahkan hingga metode molekuler.



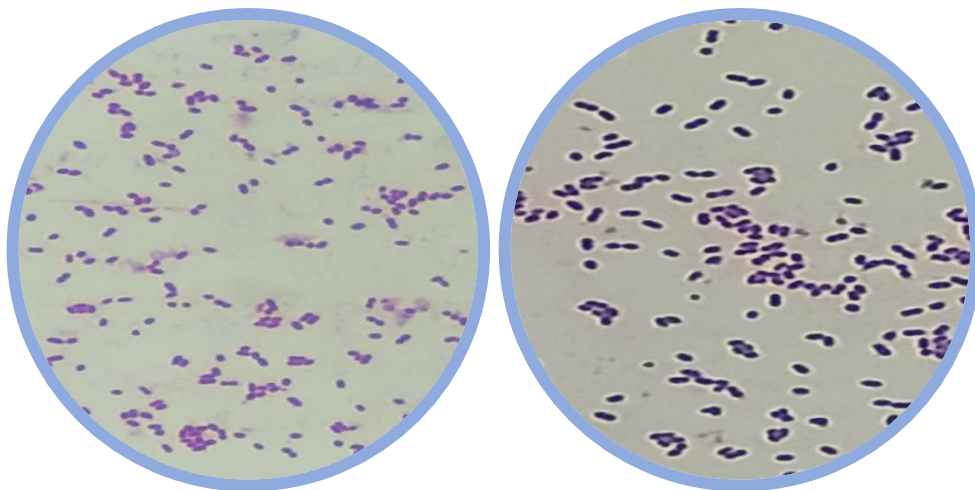
Gambar 25. Morfologi Koloni Isolat BLT1 (kiri) dan BLT2 (kanan)

Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi

Isolate	Elevasi	Forms	Margin	Colour
BLT1	Convex	Circular	Entire	Milky
BLT2	Convex	Circular	Entire	Milky

Pengecatan gram merupakan salah satu metode dalam mikrobiologi untuk membedakan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Metode pewarnaan Gram dinamai oleh Hans Christian Gram, ahli bakteriologi Denmark yang awalnya merancang itu pada tahun 1844, dan merupakan salah satu teknik pewarnaan yang paling penting dalam mikrobiologi. Metode ini hampir selalu merupakan tes pertama yang dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri. Zat utama dari metode ini adalah Kristal Violet, yang kadang-kadang dapat diganti dengan Methylene Blue yang sama efektifnya. Mikroorganisme yang mempertahankan kompleks kristal violet-iodine tampak berwarna ungu kecoklatan di bawah pemeriksaan mikroskopis. Mikroorganisme yang mempertahankan warna tersebut dikategorikan sebagai gram positif, sedangkan yang berwarna merah diklasifikasikan sebagai gram negatif.

Gram A (kristal violet) dan gram B (iodine) ditetaskan pada ulasan bakteri secara bergantian selama 1 menit, selanjutnya gram C (alkohol) dan gram D (safranin) juga ditetaskan secara bergantian selama 0,5 menit. Pada bakteri gram negatif, kandungan lipidnya akan meluruh disebabkan karena perlakuan alkohol, hal tersebut menyebabkan larutan kristal violet juga akan meluruh atau hilang. Berbeda halnya dengan bakteri gram positif, kandungan lipidnya yang tipis dan peptidoglikan yang tebal menyebabkan bakteri tersebut dapat mempertahankan larutan kristal violet sehingga akan terlihat berwarna ungu pada pengamatan dibawah mikroskop.



Gambar 26. Hasil Pengecatan Gram Isolat BLT1 (kiri) dan BLT2 (kanan)

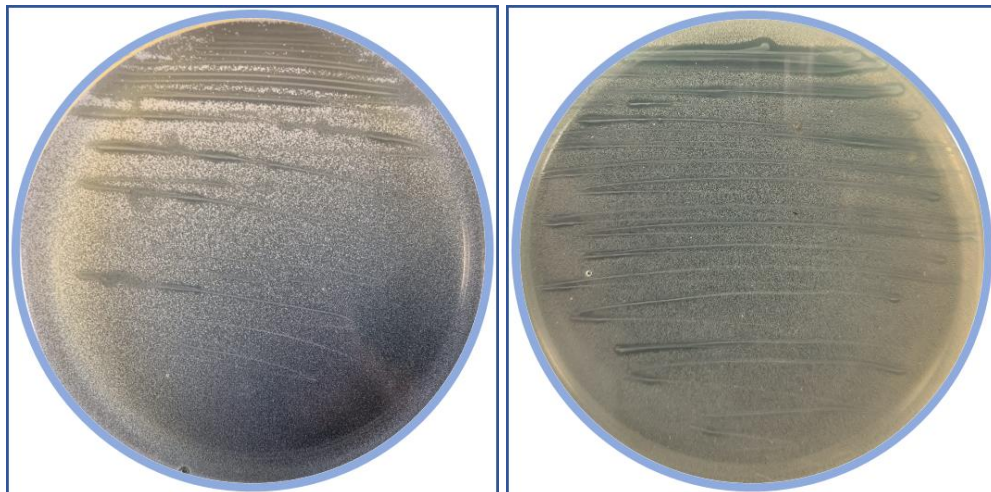
Tabel 3. Hasil Pewarnaan Gram

No	Kode Isolat	Bentuk Sel	Gram
1	BLT1	Basil Pendek	Positif
2	BLT2	Basil	Positif

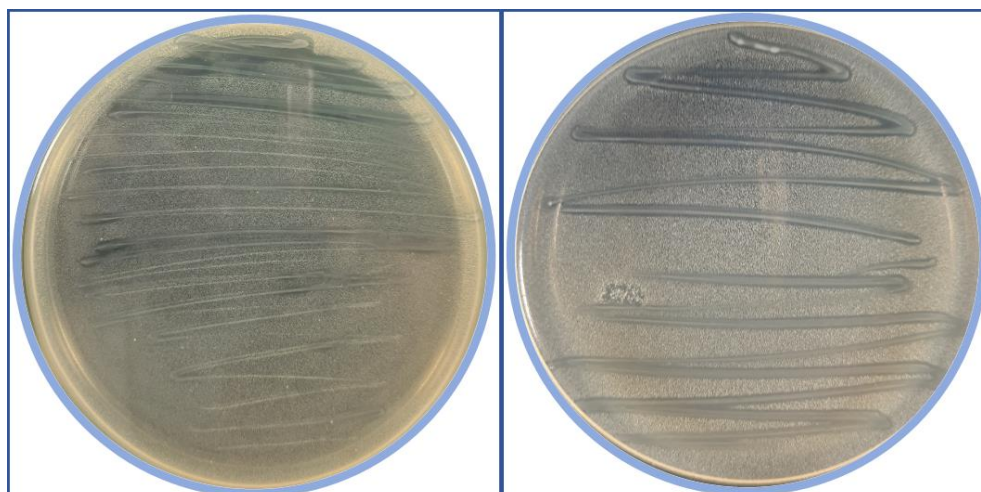
IV.3 Uji Antagonis Bakteri Endosimbion

Uji antagonis merupakan uji yang dilakukan dengan cara menumbuhkan bakteri uji dan bakteri patogen pada media yang sama untuk mengetahui aktivitas antimikroba suatu mikroorganisme. Uji antagonis dilakukan dengan mensuspensikan bakteri uji yaitu *Salmonella thypi* dan *Staphylococcus aureus* pada media Nutrient Agar dan kemudian diinokulasikan bakteri endosimbion menggunakan metode sinambung.

Berdasarkan hasil uji antagonis terhadap 2 isolat bakteri yang diperoleh dari hasil isolasi bakteri endosimbion *Lumbricus* sp. kedua isolat menunjukkan aktivitas antimikroba pada kedua spesies bakteri patogen. Zona bening yang terbentuk disekitar pertumbuhan koloni tersebut merupakan parameter yang digunakan dalam melihat potensi bakteri tersebut dalam memproduksi senyawa antimikroba. Produksi senyawa antimikroba tersebut dikarenakan bakteri endosimbion bersaing dengan bakteri patogen dalam memperebutkan sumber nutrisi dari media Nutrient Agar.



Gambar 27. Hasil Uji Antagonis Isolat BLT1 pada *Staphylococcus aureus* (kiri) dan *Salmonella thypi* (kanan)



Gambar 28. Hasil Uji Antagonis Isolat BLT2 pada *Staphylococcus aureus* (kiri) dan *Salmonella thypi* (kanan)

IV.4 Karakterisasi Biokimia

Bakteri hidup secara alami di alam dengan habitat dan kandungan bahan-bahan organik dan anorganik yang beragam. Kondisi ini menyebabkan sifat metabolisme bakteri juga berbeda. Karakterisasi biokimia seringkali digunakan untuk mengetahui sifat-sifat biokimia bakteri. Melalui reaksi-reaksi dengan reagen kimia, sifat metabolisme bakteri dapat diamati secara langsung. Hasil uji biokimia isolat BLT1 dan BLT2 dapat dilihat pada tabel dibawah ini

Tabel 4. Hasil Uji Biokimia

Characteristics	BLT1	BLT2
Catalase	-	+
Indole	-	-
Methy Red	+	+
Voges Proskouer	-	-
Motility	-	-
Citrate	-	-
Gas	-	-
Carbon Utilization		
- Glucose	+	+
- Sucrose	+	+
- Lactose	+	+

Uji Katalase

Ulasan bakteri ditetesi dengan H_2O_2 , hasil uji katalase isolat BLT1 negatif katalase sedangkan isolat BLT2 positif katalase yang menunjukkan terbentuknya gelembung yang menandakan bakteri tersebut positif katalase. Dalam respirasi aerobik bakteri, dihasilkan senyawa yang kadang kala memiliki efek toksik yang akan mengganggu proses metabolisme bakteri. Uji katalase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menghasilkan enzim oksidoreduktase yaitu enzim katalase yang akan memecah produk sampingan tersebut. Enzim katalase bekerja dengan cara memecah hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi dihidrogen oksida (H_2O) dan oksigen (O_2). Kedua senyawa tersebut relatif tidak berbahaya bagi sel bakteri.

Uji MRVP (Methyl Red-Voges Proskouer)

Proses metabolisme bakteri menghasilkan berbagai senyawa asam campuran, diantaranya asam laktat, asam format, asam asetat, dan asam suksinat. Produksi asam oleh bakteri akan memberikan suasana asam pada media, sehingga ketika ditetesi dengan indikator methyl red yang sensitif terhadap suasana asam (pH 5 atau kurang), medium akan berubah warna menjadi merah. Pengamatan pada isolat BLT 1 dan BLT 2 menunjukkan perubahan warna media menjadi merah yang menandakan bahwa kedua isolat bakteri tersebut menghasilkan asam campuran pada proses metabolismenya. Proses metabolisme bakteri awalnya mengubah glukosa menjadi asam piruvat, asam piruvat selanjutnya diubah melalui jalur asam campuran untuk menghasilkan asam stabil. Jenis asam yang dihasilkan berbeda dari spesies ke spesies dan tergantung pada jalur enzimatik spesifik bakteri. Hasil positif pada uji MR umumnya menandakan bahwa bakteri menghasilkan enzim format dehidrogenase yang memecah produk asam menjadi karbon dioksida (gas) dan molekul air.

Uji Voges Proskouer dapat menjadi metode screening untuk mengetahui banyaknya produksi asam dan asetil metil karbinol (asetoin) dari proses perombakan gula. Produksi asetoin menyebabkan karbohidrat dapat difermentasi oleh bakteri secara terus-menerus dalam jumlah besar. Uji ini menggunakan KOH 40% dan alpha-naphthol sebagai reagen yang akan mendeteksi keberadaan acetoin

pada media. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat BLT 1 dan BLT 2 negatif karena tidak terjadi perubahan warna media menjadi merah. Hal ini menandakan bahwa kedua isolat tersebut menghasilkan produk acetoin yang merupakan produk akhir metabolisme yang netral.

Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Uji TSIA bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menfermentasi karbohidrat dan menghasilkan hidrogen sulfida. Media Triple Sugar Iron (TSI) terdiri atas 1% laktosa, 1% sukrosa, glukosa 0,1%, serta natrium tiosulfat dan besi sulfat atau besi amonium. Warna kuning pada media menandakan proses fermentasi karbohidrat oleh bakteri, sedangkan warna merah menyala menandakan bahwa bakteri hanya menggunakan pepton sebagai sumber karbon. Jika warna slant kuning dan butt merah, artinya bakteri tersebut hanya dapat menfermentasi glukosa. Apabila warna slant dan butt kuning, artinya bakteri tersebut mampu menfermensi glukosa dan laktosa atau glukosa dan sukrosa. Warna slant dan butt merah menandakan bahwa bakteri tersebut dapat memetabolisme pepton. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa isolat BLT 1 dan BLT 2 menfermentasi semua jenis gula pada media yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi kuning secara keseluruhan. Terlihat media terangkat yang disebabkan karena produksi gas H₂ oleh bakteri.

Uji Citrate

Uji citrate bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat pada proses metabolismenya. Pada proses fermentasi citrate, dihasilkan ammonia yang menyebabkan pH media menjadi basa (7,6). Hasil uji isolat BLT1 dan BLT2 menunjukkan reaksi negatif yang ditandai dengan tidak adanya perubahan warna media, artinya bakteri tersebut tidak dapat menggunakan citrate dalam proses fermentasinya. Kelompok bakteri yang menggunakan amonium dihidrogen fosfat sebagai sumber nitrogen tunggal dan natrium sitrat sebagai sumber karbon tunggal akan tumbuh pada media Citrate Agar (Simmons). Organisme seperti itu menggunakan nitrogen dari garam amonium dalam medium, memecahnya menjadi amonia. Hal ini menyebabkan media menjadi alkali (basa),

perubahan pH media dideteksi oleh bromtimol blue sehingga media berubah dari hijau menjadi biru. Peningkatan pH ini disebabkan oleh senyawa amonia yang merupakan hasil pemecahan dari garam amonium.

Uji Indole

Terbentuknya cincin indol pada media setelah ditetesi dengan reagen kovacs merupakan parameter dalam uji indol. Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu organisme dalam menggunakan asam amino triptofan dalam proses metabolismenya. Reagen Kovacs digunakan untuk mendeteksi adanya cincin indol yang terbentuk sebagai hasil pemecahan asam amino triptofan. Hasil pengamatan menunjukkan tidak terbentuknya cincin indol sehingga menandakan bahwa isolat BLT1 dan BLT2 tidak dapat memanfaatkan asam amino triptofan dalam proses metabolismenya.

Uji Motilitas

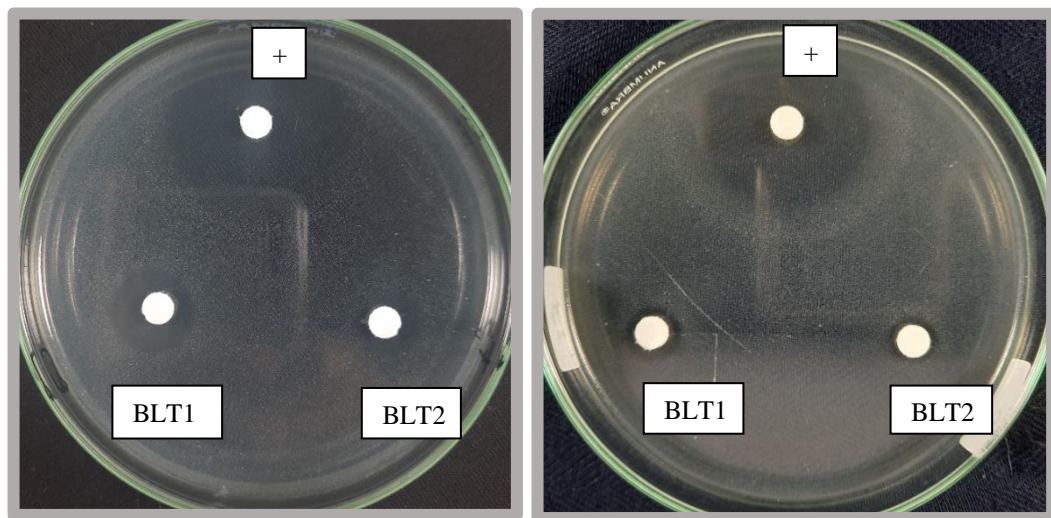
Uji motilitas digunakan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut bersifat motil atau non motil. Pengamatan pada isolat BLT1 dan BLT2 pada media SIM menunjukkan bahwa isolat tersebut bersifat nonmotil karena tidak terbentuknya serabut disekitar inokulum. Uji motilitas positif ditandai dengan terbentuknya serabut disekitar inokulum. Flagella merupakan salah satu alat gerak pada bakteri, umumnya, flagella ditemukan pada bakteri yang berbentuk basil, sehingga motilitas merupakan salah satu metode identifikasi penting untuk mengetahui pengelompokan suatu bakteri.

IV.5 Uji Penghambatan Bakteri Patogen

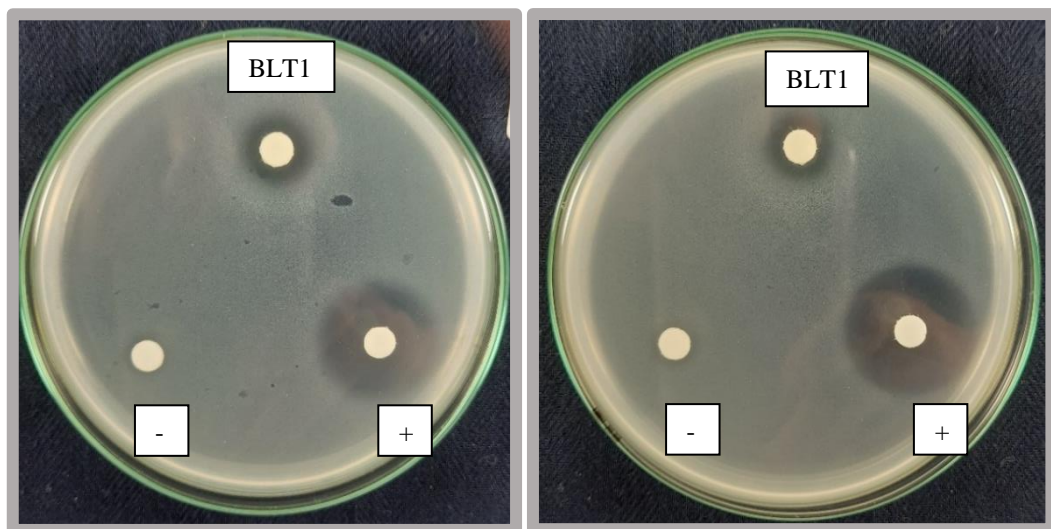
Uji aktivitas antibiotik secara in-vitro bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri endosimbion dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Pengujian aktivitas antibiotik menggunakan metode difusi agar. Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antimikroba (misalnya antibiotik) ke dalam media padat di mana mikroba uji (misalnya bakteri patogen) telah diinokulasikan. Luasnya zona bening merupakan petunjuk kemampuan antibiotik

terhadap mikroba. Aktifitas antibiotik ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar sumuran.

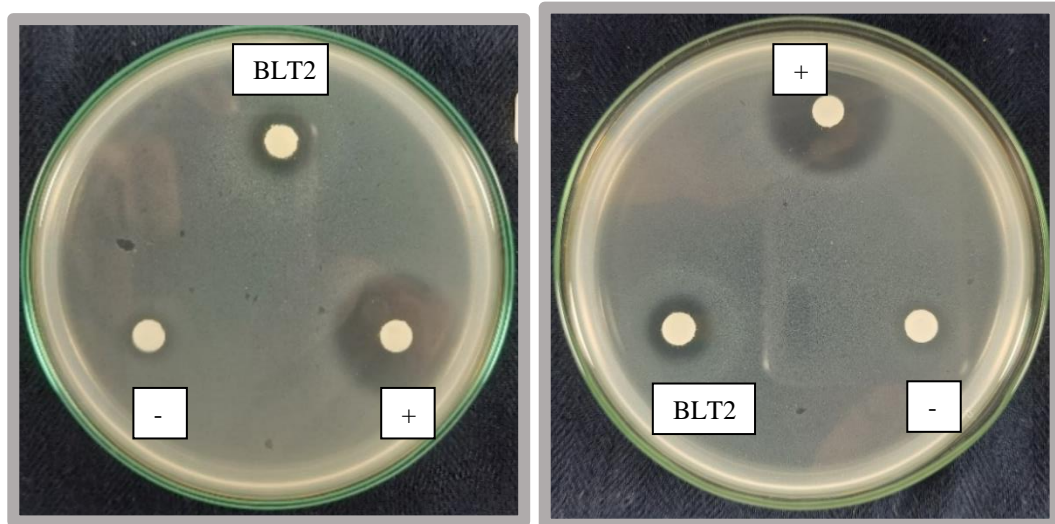
Kontrol yang digunakan adalah antibiotik sintetik yaitu ciprofloxacin. Ciprofloxacin merupakan golongan antibiotik spektrum luas yang bekerja baik pada bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif. Ciprofloxacin telah terbukti aktif dalam menghambat isolat dari berbagai bakteri Gram-positif dan Gram-negatif, baik in vitro dan in vivo. Ini adalah salah satu antibiotik yang digunakan untuk infeksi saluran pernapasan, saluran kemih, usus dan perut yang disebabkan oleh berbagai patogen.



Gambar 29. Hasil Uji Daya Hambat supernatan isolat BLT 1 dan BLT2 pada *Staphylococcus aureus* (kiri), *Salmonella thypi* (kanan)



Gambar 30. Hasil Uji Daya Hambat senyawa intraseluler isolat BLT 1 pada *Staphylococcus aureus* (kiri), *Salmonella thypi* (kanan)



Gambar 31. Hasil Uji Daya Hambat isolat BLT 2 pada *Staphylococcus aureus* (kiri), *Salmonella thypi* (kanan)

Bakteri patogen yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibiotik pada penelitian ini adalah *Salmonella thypi* dan *Staphylococcus aureus*. Kedua bakteri ini memiliki perbedaan komponen dinding sel, *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif sedangkan *Salmonella thypi* merupakan bakteri gram negatif. *Salmonella thypi* merupakan bakteri patogen penyebab utama demam tifoid. Tifoid adalah infeksi umum di daerah dengan taraf ekonomi masyarakat yang dan infrastruktur kesehatan yang terbatas.

Salmonella thypi merupakan penyebab demam tifoid dan juga merupakan agen utama demam enterik. Air dan makanan merupakan media penyebaran bakteri tersebut. Dikutip dari Dougan dan Baker (2014) 200.000 kematian per tahun disebabkan oleh *Salmonella thypi* dengan > 20 juta kasus baru per tahun, bahkan menurut perkiraan terbaru, antara 11 hingga 21 juta kasus dan 128.000 hingga 161.000 kematian terkait tipus terjadi setiap tahun di seluruh dunia. Mengingat parahnya prevalensi penyakit demam tifoid, diperlukan upaya penemuan-penemuan antibiotik baru yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen tersebut.

Staphylococcus aureus terkenal karena merupakan penyebab infeksi utama pada manusia. Semua strain *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk memproduksi senyawa yang diperkirakan menyerang imunitas bawaan dan adaptif, termasuk yang menghambat fungsi sel leukosit fagositik, komplemen serum, dan

peptida antimikroba. Selain itu, *Staphylococcus aureus* menghasilkan banyak molekul adhesi, racun sitolitik, dan superantigen yang terlibat dalam kolonisasi dan atau berkontribusi terhadap gangguan metabolisme. Di samping itu *Staphylococcus aureus* terkenal karena kemampuannya untuk memperoleh resistensi terhadap antibiotik, oleh karena itu diperlukan penemuan antibiotik baru sehingga penyakit-penyakit yang disebabkan bakteri ini dapat dikendalikan.

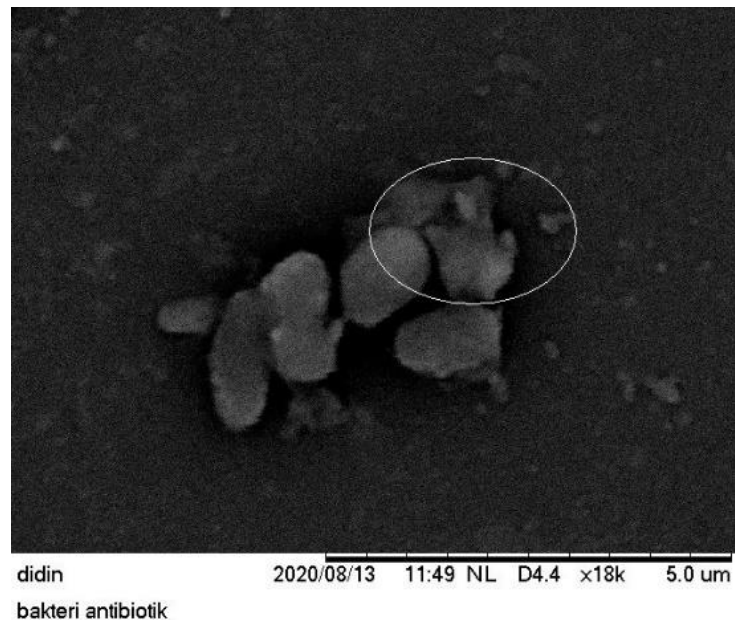
Uji daya hambat menggunakan supernatan bebas sel dan natan/pelet bakteri yang telah disonikasi untuk mengetahui apakah senyawa antibiotik bakteri endosimbion merupakan senyawa ekstraseluler atau intraseluler. Umur fermentasi 1x24 jam menunjukkan potensi daya hambat bakteri endosimbion. Dari hasil pengamatan besar zona hambat supernatan pada isolat BLT 1 adalah 12,5 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 10,5 mm pada *Salmonella thypi*, sedangkan isolat BLT 2 adalah 9,5 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 8,75 mm pada *Salmonella thypi*. Luas zona hambat kontrol ciprofloxacin pada *Staphylococcus aureus* adalah 34,5 mm dan pada *Salmonella thypi* adalah 33,5 mm. Sedangkan hasil pengamatan besar zona hambat natan (senyawa intraseluler) pada isolat BLT 1 adalah 11 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 10,75 mm pada *Salmonella thypi*, sedangkan isolat BLT 2 adalah 10,75 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 10,5 mm pada *Salmonella thypi*. Luas zona hambat kontrol ciprofloxacin pada *Staphylococcus aureus* adalah 22,5 mm dan pada *Salmonella thypi* adalah 23,75 mm. Senyawa bakteri endosimbion tergolong cukup kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen karena memiliki zona hambat yang lebih dari 10 mm.

Uji daya hambat pada penelitian ini juga memperlihatkan perbedaan aktivitas antibiotik kedua isolat terhadap bakteri patogen gram positif dan gram negatif. Terlihat aktivitas antibiotik lebih efektif pada gram positif dibandingkan gram negatif. Dikutip dari Soares *et al.* (2010), perbedaan ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel kedua bakteri ini. Bakteri gram positif memiliki polimer peptidoglikan yang sangat dekat dengan permukaan sel, memungkinkan antibiotik untuk dengan mudah menembus sel. Berbeda dengan bakteri gram negatif, karena mengandung membran luar yang terdiri dari lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang senyawa hidrofobik secara umum, dan senyawa hidrofilik yang memiliki berat molekul tertentu. Membran luar berfungsi sebagai

penghalang yang tidak bisa ditembus untuk beberapa antibiotik. Namun, beberapa antibiotik hidrofilik kecil berdifusi melalui saluran air di membran luar yang dibentuk oleh protein yang disebut porins.

IV.6 Pengamatan morfologi sel menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) setelah pemberian senyawa bakteri Endosimbion

Scanning Electron Microscope (SEM) adalah alat pembesaran yang menggunakan berkas elektron terfokus untuk mendapatkan informasi. Gambar tiga dimensi beresolusi tinggi yang dihasilkan oleh SEM memberikan informasi topografi, morfologi, dan komposisi menjadikannya sangat berharga dalam berbagai aplikasi sains dan industri. Hasil pengamatan SEM dapat menunjukkan kerusakan sel bakteri sehingga dapat menjelaskan keefektifan suatu senyawa sebagai antibiotik. Hasil uji SEM isolat bakteri endosimbion dapat dilihat pada gambar dibawah. Gambar tersebut menunjukkan kerusakan sel bakteri uji setelah penambahan senyawa bakteri endosimbion.



Gambar 32. Morfologi kerusakan sel bakteri setelah penambahan senyawa bakteri

IV.7 Analisis senyawa dengan LCMS

Analisis LC-MS isolat bakteri endosimbion dilakukan melalui Layanan Bioinformatika dan Biomolekuler INBIO Indonesia, Malang. Hasil proses analisis

sampel dapat dilihat pada tabel dibawah. Hasil analisis kemudian diolah untuk dilanjutkan pada proses reverse docking.

Proses analisis pada LC-MS memadukan daya pemisahan HPLC untuk bahan berat molekul besar dengan kemampuan MS untuk mendeteksi dan mengonfirmasikan identitas molekul secara selektif. LC-MS menggunakan sistem HPLC, tetapi pada saat fase gerak cair meninggalkan kolom, sampel cairan disemprotkan untuk menghasilkan tetes mikro. Tetes ini menguap dengan cepat dan melepaskan molekul analit terionisasi yang kemudian dapat dipisahkan dalam MS. Semprotan beraliran besar dapat memanfaatkan atomisasi atau nebulisasi tambahan yang menggunakan aliran tinggi gas inert seperti Nitrogen.

Analisis senyawa Supernatan isolat bakteri endosimbion menggunakan Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry yang terdiri atas HPLC dan High Resolution Mass Spectrometer. Instrumen HPLC menggunakan Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 RSLCnano yang dilengkapi microflow meter dengan pelarut 0.1% asam format dalam air dan 0.1% asam format dalam acetonitrile. Hypersil GOLD aQ 50 x 1 mm x 1.9 u particle size digunakan sebagai kolom analitik instrumen. Laju aliran analitik diatur pada 40 uL/menit dengan rentang waktu selama 30 menit dan suhu kolom pada 30°C. Instrumen High Resolution Mass Spectrometer menggunakan Thermo Scientific Q Exactive, dengan pemindai penuh pada resolusi 70,000 dan data dependent MS2 pada resolusi 17,500 dengan rentang waktu 30 menit.

Tabel 5. Hasil analisis LC-MS BLT-1

No	Name	Formula	Molecular Weight	RT [min]	Area (Max.)	mzCloud Best Match
1	3,4-Dihydroxyphenylpropionic acid	C ₉ H ₁₀ O ₄	164,0478	14,801	20.271.863,34	55,8
2	Triethanolamine	C ₆ H ₁₅ N O ₃	149,1055	26,404	5.385.828,47	72,6
3	L-Norleucine	C ₆ H ₁₃ N O ₂	131,095	1,078	4.179.728,80	80,6
4	2,2,6,6-Tetramethyl-1-	C ₉ H ₁₉ N O	157,1472	13,014	3.504.343,15	70,3

	piperidinol (TEMPO)					
5	4-Methoxybenzaldehyde	C ₈ H ₈ O ₂	136,0528	14,792	3.492.172,75	74
6	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,1524	18,537	2.767.522,68	86,8
7	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinol (TEMPO)	C ₉ H ₁₉ N O	157,1472	1,013	1.984.512,09	67,2
8	Stearamide	C ₁₈ H ₃₇ N O	283,2877	25,307	1.953.241,94	85,6
9	Proline	C ₅ H ₉ N O ₂	115,0638	1,045	1.822.466,12	77,8
10	Erucamide	C ₂₂ H ₄₃ N O	337,3353	0,905	1.795.480,53	92,8
11	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ N O ₄	147,0536	1,077	1.648.424,73	69,3
12	L-Phenylalanine	C ₉ H ₁₁ N O ₂	165,0794	1,085	1.582.754,31	68,7
13	Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	C ₂₄ H ₃₀ O ₆	414,2054	15,232	1.438.371,00	84,4
14	Urocanic acid	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	138,0431	26,421	1.271.137,84	84,8
15	N,N-Diisopropylethylamine (DIPEA)	C ₈ H ₁₉ N	129,1521	1,35	1.164.837,85	50,4
16	D-(+)-Proline	C ₅ H ₉ N O ₂	115,0637	26,492	1.042.713,79	56,3
17	2-Amino-1,3,4-octadecanetriol	C ₁₈ H ₃₉ N O ₃	317,2937	14,976	1.033.187,88	65,4
18	Proline	C ₅ H ₉ N O ₂	115,0638	1,258	933.554,73	77
19	4-tert-Butylcyclohexyl acetate	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	198,1625	19,506	868.078,11	50,9
20	4-Methoxycinnamic acid	C ₁₀ H ₁₀ O ₃	178,0634	21,09	852.239,74	84,1
21	2-[(3S)-1-(Cyclohexylmethyl)-3-pyrrolidinyl]-1H-benzimidazole-5-carbonitrile	C ₁₉ H ₂₄ N ₄	308,197	19,501	814.683,16	56,5
22	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,2772	23,492	728.794,96	93,2
23	N-Desmethylselegiline	C ₁₂ H ₁₅ N	173,1209	1,003	638.736,40	50,1

24	n-Pentyl isopentyl phthalate	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	323,2103	18,523	614.675,98	61,6
25	Oleamide	C ₁₈ H ₃₅ N O	281,2723	22,409	594.378,30	92,8
26	L-Glutamic acid	C ₅ H ₉ N O ₄	147,0536	1,355	556.715,64	51,3
27	4-(Dimethylamino)benzophenone	C ₁₅ H ₁₅ N O	225,1159	14,089	549.470,79	55,5
28	Dodecamethylcyclohexasiloxane	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	444,1138	1,018	549.098,53	81,7
29	Cycluron	C ₁₁ H ₂₂ N ₂ O	198,1737	14,112	545.293,90	53
30	Oleoyl ethanolamide	C ₂₀ H ₃₉ N O ₂	307,2879	22,656	533.639,82	83
31	Stearamide	C ₁₈ H ₃₇ N O	283,2877	24,968	528.598,22	87
32	cis,cis-Muconic acid	C ₆ H ₆ O ₄	142,027	0,895	503.914,07	83,7
33	Nicotinic acid	C ₆ H ₅ N O ₂	123,0325	1,033	486.610,52	74,4
34	Melamine	C ₃ H ₆ N ₆	126,0658	1,131	451.344,86	50,3
35	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,2772	23,063	440.351,22	91,9
36	Triethylene glycol monobutyl ether	C ₁₀ H ₂₂ O ₄	206,1524	0,915	414.135,99	52,4
37	Nicotinamide	C ₆ H ₆ N ₂ O	122,0485	1,021	413.394,73	67,9
38	4-(Dimethylamino)benzophenone	C ₁₅ H ₁₅ N O	225,116	1,01	397.795,08	50,1
39	Choline	C ₅ H ₁₃ N O	71,07398	26,412	385.495,86	79,6
40	3,5-di-tert-Butyl-4-hydroxybenzaldehyde	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234,1625	17,487	322.200,06	87,2
41	N-Phenyl-1-naphthylamine	C ₁₆ H ₁₃ N	219,1054	17,868	293.698,89	78,5
42	2-Methyl-S-benzothiazole	C ₈ H ₇ N S ₂	181,0024	14,6	288.594,49	68,6
43	3,14-dihydro-15-keto-tetranor Prostaglandin E2	C ₁₆ H ₂₆ O ₅	280,1656	17,696	283.198,23	55,5
44	Sedanolide	C ₁₂ H ₁₈ O ₂	176,1205	20,926	283.101,81	71
45	Valine	C ₅ H ₁₁ N O ₂	117,0795	26,396	281.273,55	79,1
46	N-Butylbenzenesulfonamide	C ₁₀ H ₁₅ N O ₂ S	213,0829	14,119	258.137,26	75,7

47	2-Hydroxyphenylalanine	C ₉ H ₁₁ N O ₃	181,0744	1,092	222.002,58	80,6
48	cis,cis-Muconic acid	C ₆ H ₆ O ₄	142,027	1,017	221.155,74	87,3
49	Caprolactam	C ₆ H ₁₁ N O	113,0845	1,015	220.993,08	66,1
50	Octyl decyl phthalate	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	418,3092	2,006	172.844,65	84
51	Stearamide	C ₁₈ H ₃₇ N O	283,2882	0,906	164.619,93	69,3
52	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,1524	1,018	144.749,10	79,4
53	Stearamide	C ₁₈ H ₃₇ N O	283,2877	25,128	129.604,59	85,5
54	N-Butylbenzenesulfonamide	C ₁₀ H ₁₅ N O ₂ S	213,0829	1,994	127.638,56	77
55	Dibutyl phthalate	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,1524	14,093	105.978,67	84,8

IV.8 Klarifikasi Penghambatan Bakteri Patogen secara In-Silico

Tahapan analisis data secara in silico yaitu:

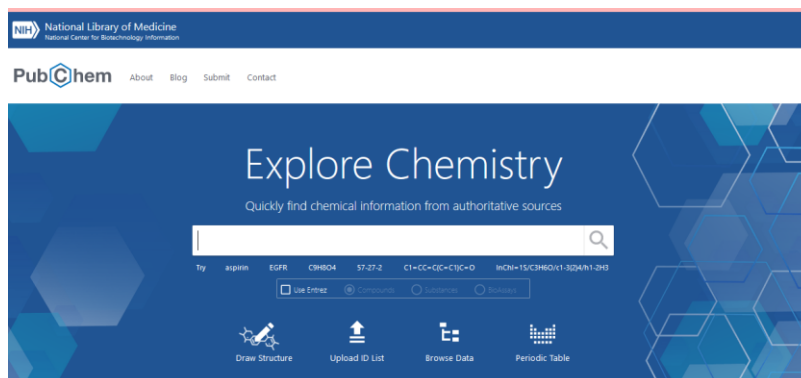
Penentuan senyawa target

Penentuan senyawa target dapat dilakukan melalui analisis senyawa, salah satunya melalui uji LC-MS seperti pada penelitian ini, juga dapat melalui studi literatur baik dari jurnal, buku, ataupun sumber lainnya. Berdasarkan hasil analisis senyawa, senyawa pada bakteri endosimbion yang akan diuji yaitu Oleamide dan Dibutyl phthalate.

Penentuan protein target dengan database senyawa

Setelah ditentukan senyawa yang akan diuji, maka senyawa tersebut dianalisis lebih detail dengan menggunakan “PubChem” yang dapat diakses di <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. *PubChem Substance Database* berisi informasi umum mengenai struktur kimia, sinonim, nomor registrasi, deskripsi, *website* dan referensi terkait yang terhubung dengan PubMed struktur 3D protein, dan hasil *screening* biologis. PubChem menyediakan informasi mengenai *property* dan aktivitas biologis dari satu molekul. Program ini merupakan bagian dari *NIH's Molecular Libraries Roadmap Initiative*. Informasi-informasi yang dapat diakses melalui PubChem meliputi substansi suatu molekul, struktur penyusun dan data

Bioactivity, semua itu secara berturut-turut ada pada 3 *database* primer yaitu *Pcsubstance*, *Pccomound*, dan *PCBioAssay*



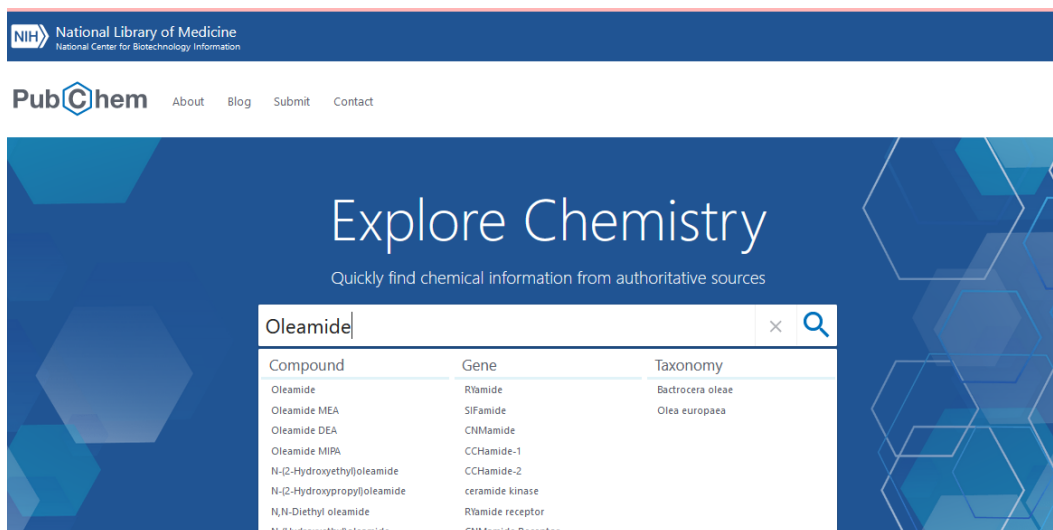
Gambar 33. Laman awal PubChem

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Adapun analisis senyawa uji pada laman pubchem dilakukan sebagai berikut:

1. Oleamide

Pada laman akan terlihat seperti pada gambar diatas, selanjutnya ketik jenis senyawanya yaitu Oleamide.



Gambar 34. Pencarian senyawa Oleamide

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

PubChem About Blog Submit Contact Search PubChem

COMPOUND SUMMARY

Oleamide

PubChem CID: 5283387

Structure: 2D 3D
[Find Similar Structures](#)

Chemical Safety: Irritant
[Laboratory Chemical Safety Summary \(LCSS\) Datasheet](#)

Molecular Formula: C₁₈H₃₅NO
Oleamide
Oleic acid amide

CONTENTS

- Title and Summary
- 1 Structures
- 2 Names and Identifiers
- 3 Chemical and Physical Properties
- 4 Spectral Information
- 5 Related Records
- 6 Chemical Vendors
- 7 Food Additives and Ingredients
- 8 Pharmacology and Biochemistry
- 9 Use and Manufacturing
- 10 Safety and Hazards
- 11 Toxicity
- 12 Associated Disorders and Diseases

Gambar 35. Database senyawa Oleamide pada website PubChem

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu dicatat Pubchem ID dan canonical smile dari senyawa Oleamide. Pubchem ID merupakan nomor ID dari senyawa target di PubChem, sehingga lebih memudahkan kita dalam menemukan senyawa target ini kembali di PubChem. Dan Smile adalah kode spesifik dari senyawa target yang digunakan pada program penentuan senyawa target.

Pubchem ID: 5283387

Canonical Smile: CCCCCCCCC=CCCCCCCC(=O)N

Setelah dicatat, maka langkah selanjutnya yaitu mengunduh bentuk 3D dari senyawa Oleamide. Klik download kemudian pilih format sdf untuk proses unduh. Setelah diunduh, wajib untuk mengubah nama file unduh menjadi nama senyawa. Hal ini bertujuan untuk memudahkan proses *docking* yang akan dilakukan.

Gambar 36. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Oleamide

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Hasil dari Pengerjaan Pubchem adalah untuk mendapatkan File 3D dari Oleamide dalam bentuk format 'sdf'. Langkah selanjutnya ialah mengubah file format 3D 'sdf' ke dalam bentuk file format 'pdb' dengan aplikasi Avogadro.

Avogadro adalah salah satu aplikasi editor molekul yang bisa dikatakan canggih, dimana aplikasi ini dirancang untuk berbagai jenis platform sistem operasi, yang salah satunya adalah sistem operasi Linux Blank On. Aplikasi ini digunakan dalam kimia komputasi, pemodelan molekul, bioinformatika, ilmu material dan bidang terkait.

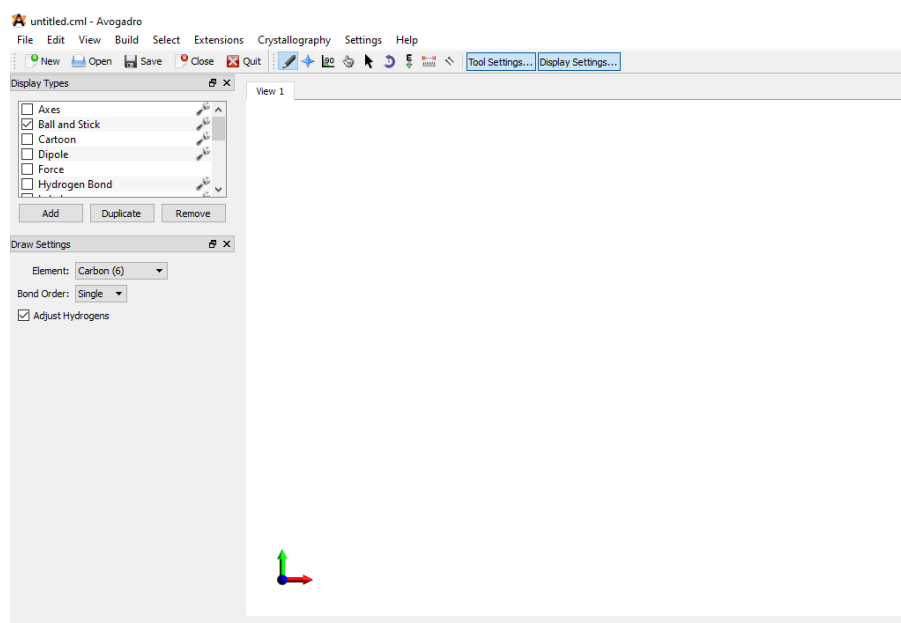
Dengan aplikasi ini kita dapat dengan mudah membuat animasi senyawa tertentu seperti yang diinginkan sekaligus melakukan editing dari senyawa yang telah kita rancang.

Berbagai fungsi dari aplikasi ini yaitu,

- Dapat melakukan pengunduhan secara langsung dari PDB (protein data bank) atau PubChem (database dari molekul kimia dan aktivitasnya terhadap uji biologis)
- Inovatif “auto-optimation”, alat yang memungkinkan Anda untuk terus membangun dan memodifikasi, selama optimasi mekanika molekular.

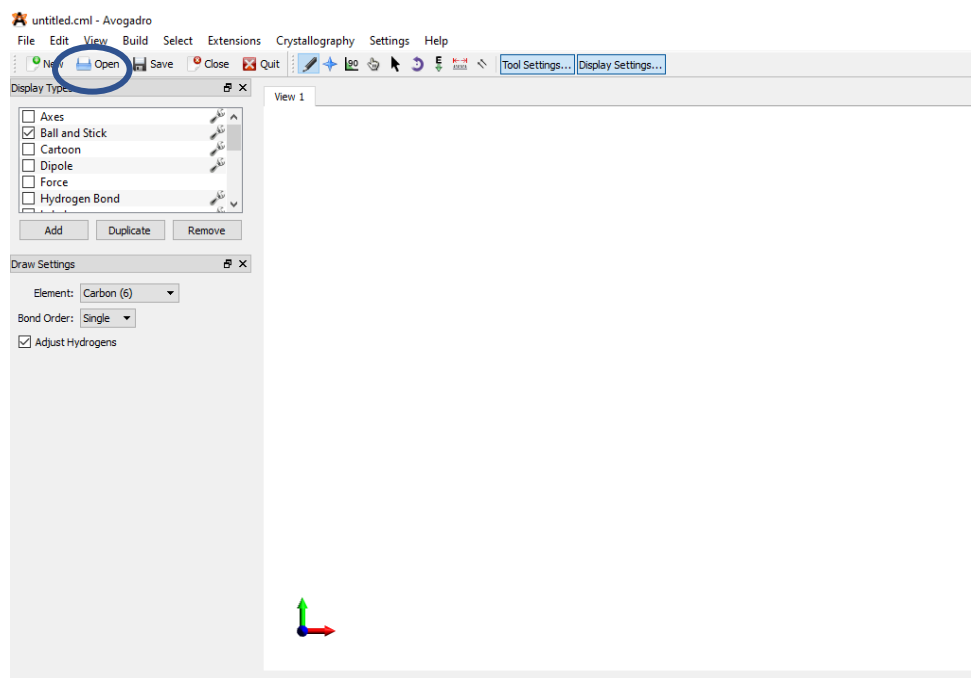
- Terjemahan tersedia dalam 19 bahasa lebih, termasuk antar muka juga sudah bisa berbahasa Indonesia, tersisa hanya beberapa bagian saja yang belum dialihbahasakan.
- Cross-Platform: Molekul pembangun / editor untuk Windows, Linux dan Mac OS X.
- Intuitif: Dibangun untuk dapat digunakan dengan mudah bagi mahasiswa dan peneliti lebih lanjut.
- Cepat: Mendukung multi-threaded rendering dan komputasi.
- Extensible: Plugin arsitektur bagi pengembang, termasuk rendering, tool interaktif, perintah dan skrip Python.
- Fleksibel: Fitur OpenBable yang dapat digunakan untuk impor file-file kimia lain, input untuk beberapa paket kimia komputasi, kristalografi dan biomolekul.

Buka program avogadro kemudian ke menu file lalu open kemudian pilih senyawa yang akan divisualisasikan bentuk 3Dnya.



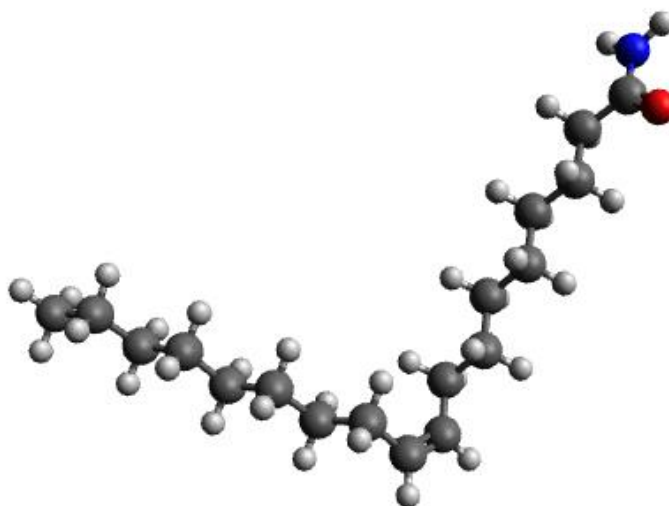
Gambar 37. Tampilan Awal aplikasi Avogadro

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 38. Tampilan Open aplikasi Avogadro

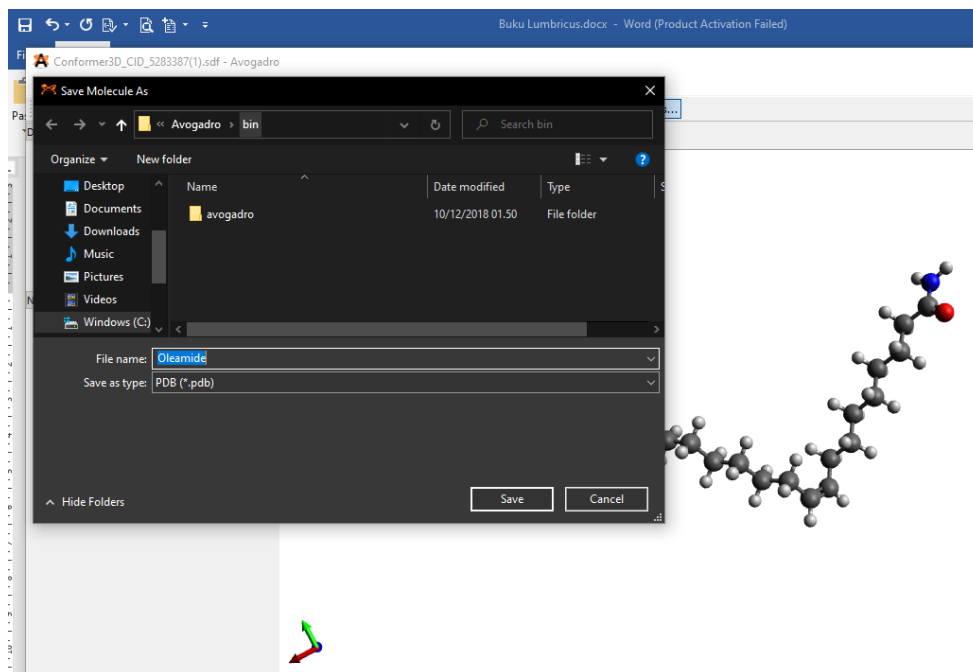
Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 39. Visualisasi bentuk senyawa Oleamide dengan aplikasi Avogadro

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah terlihat visualisasi senyawa Oleamide dalam bentuk 3D, pilih File, lalu Save As, dan ubah jenis format penyimpanan ke Protein Data Bank Files (pdb).

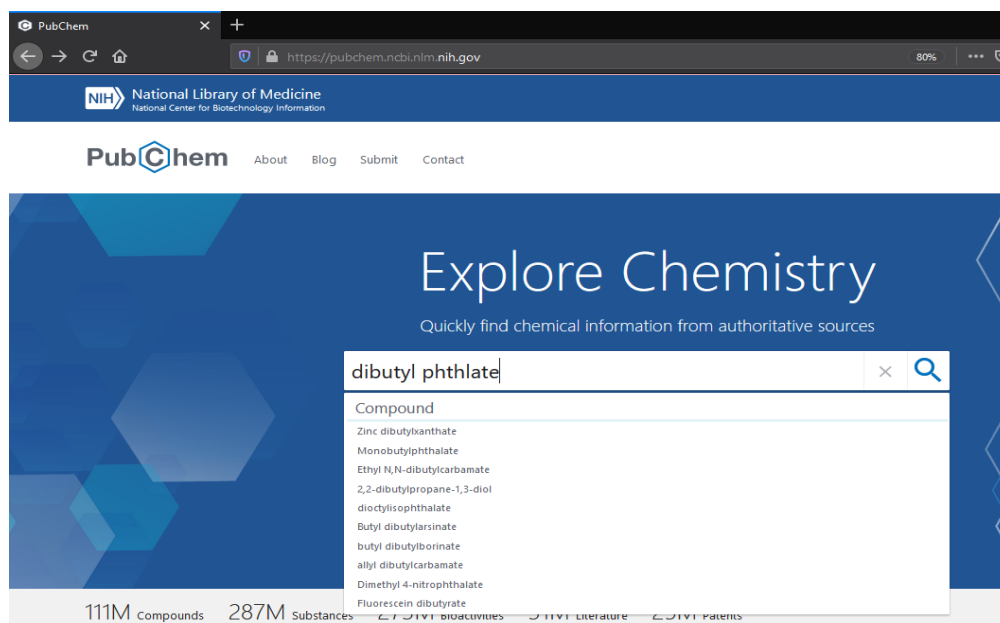


Gambar 40. Penyimpanan senyawa Oleamide dalam bentuk PDB

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

2. Dibuty phthlate

Setelah laman pubchem terbuka, selanjutnya ketik jenis senyawanya yaitu dibutyl phthlate.



Gambar 41. Pencarian senyawa Dibutyl phthlate

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

The image shows a screenshot of the PubChem website. At the top, there is a blue header with the NIH logo and the text 'National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information'. Below this is the PubChem logo and navigation links: 'About', 'Blog', 'Submit', and 'Contact'. A search bar is located in the top right corner. The main content area is titled 'COMPOUND SUMMARY' and 'Dibutyl phthalate'. It displays the PubChem CID: 3026. Under 'Structure:', there are 2D and 3D ball-and-stick models of the molecule. Below the models is a link 'Find Similar Structures'. Under 'Chemical Safety:', there are two hazard icons: 'Health Hazard' and 'Environmental Hazard', with a link to the 'Laboratory Chemical Safety Summary (LCSS) Datasheet'. On the right side, there is a 'CONTENTS' table of contents with the following items: 1. Title and Summary, 2. Structures, 3. Names and Identifiers, 4. Chemical and Physical Properties, 5. Spectral Information, 6. Related Records, 7. Chemical Vendors, 8. Drug and Medication Information, 9. Food Additives and Ingredients, 10. Pharmacology and Biochemistry, 11. Use and Manufacturing. There are also social media sharing options (Share, Tweet) and a 'Down' button.

Gambar 42. Database senyawa Dibutyl phthlate pada website PubChem

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu dicatat Pubchem ID dan canonical smile dari senyawa Dibutyl phthlate. Pubchem ID merupakan nomor ID dari senyawa target di PubChem, sehingga lebih memudahkan kita dalam menemukan senyawa target ini kembali di PubChem. Dan Smile adalah kode spesifik dari senyawa target yang digunakan pada program penentuan senyawa target.

Pubchem ID: 3026

Canonical Smile: CCCCOC(=O)C1=CC=CC=C1C(=O)OCCCC

Setelah dicatat, maka langkah selanjutnya yaitu mengunduh bentuk 3D dari senyawa Dibutyl phthlate. Klik download kemudian pilih format sdf untuk proses unduh. Setelah diunduh, wajib untuk mengubah nama file unduh menjadi nama senyawa. Hal ini bertujuan untuk memudahkan proses *docking* yang akan dilakukan.

1.2 3D Conformer

1.3 Crystal Structures

PDBe Ligand Code	DB7
PDBe Structure Code	4G5I

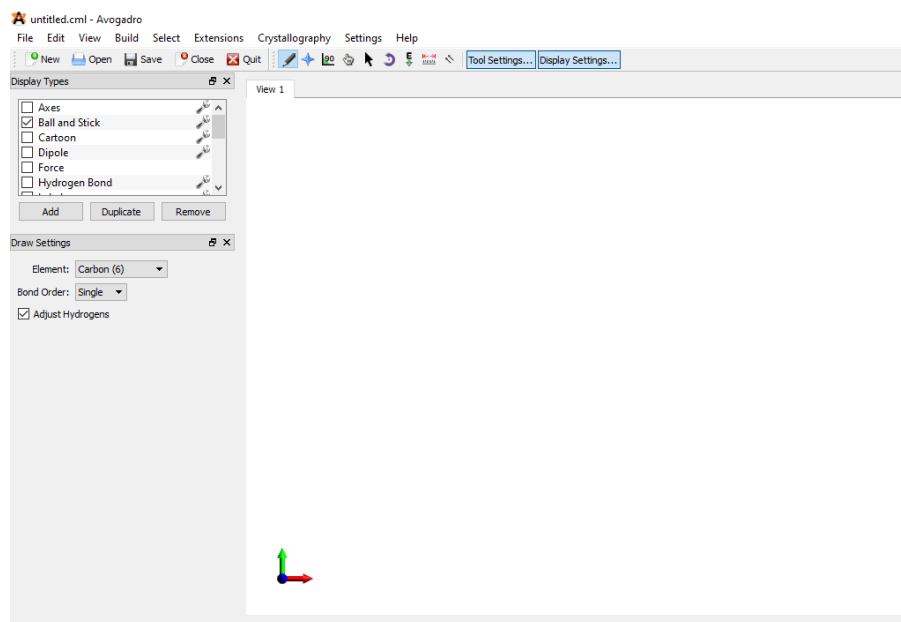
Gambar 43. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Dibutyl phthalate

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Hasil dari Pengerjaan Pubchem adalah untuk mendapatkan File 3D dari Dibutyl phthalate dalam bentuk format 'sdf'. Langkah selanjutnya ialah mengubah file format 3D 'sdf' ke dalam bentuk file format 'pdb' dengan aplikasi Avogadro.

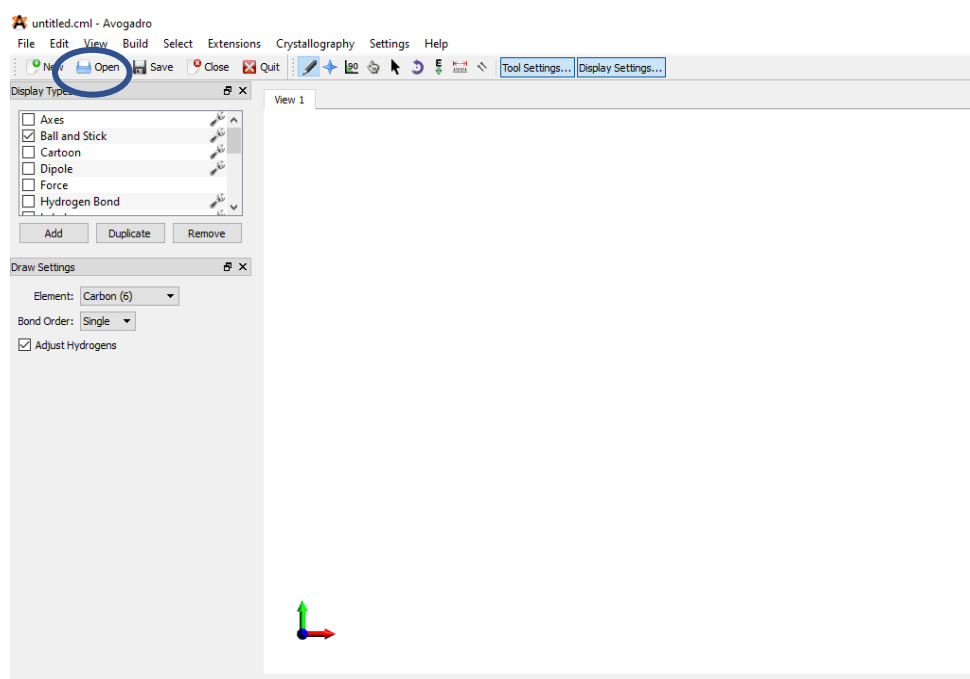
Avogadro adalah salah satu aplikasi editor molekul yang bisa dikatakan canggih, dimana aplikasi ini dirancang untuk berbagai jenis platform sistem operasi, yang salah satunya adalah sistem operasi Linux Blank On. Aplikasi ini digunakan dalam kimia komputasi, pemodelan molekul, bioinformatika, ilmu material dan bidang terkait.

Buka program avogadro kemudian ke menu file lalu open kemudian pilih senyawa yang akan divisualisasikan bentuk 3Dnya.



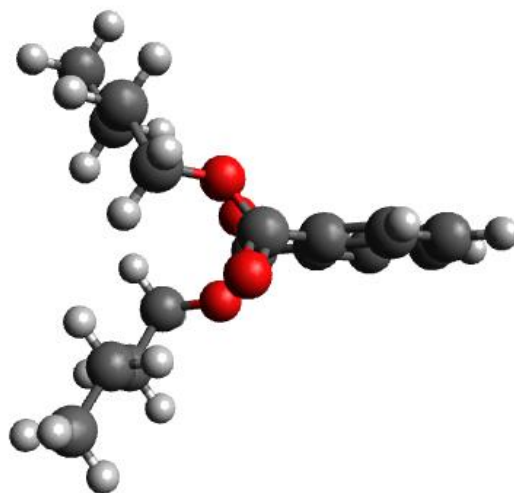
Gambar 44. Tampilan Awal aplikasi Avogadro

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 45. Tampilan Open aplikasi Avogadro

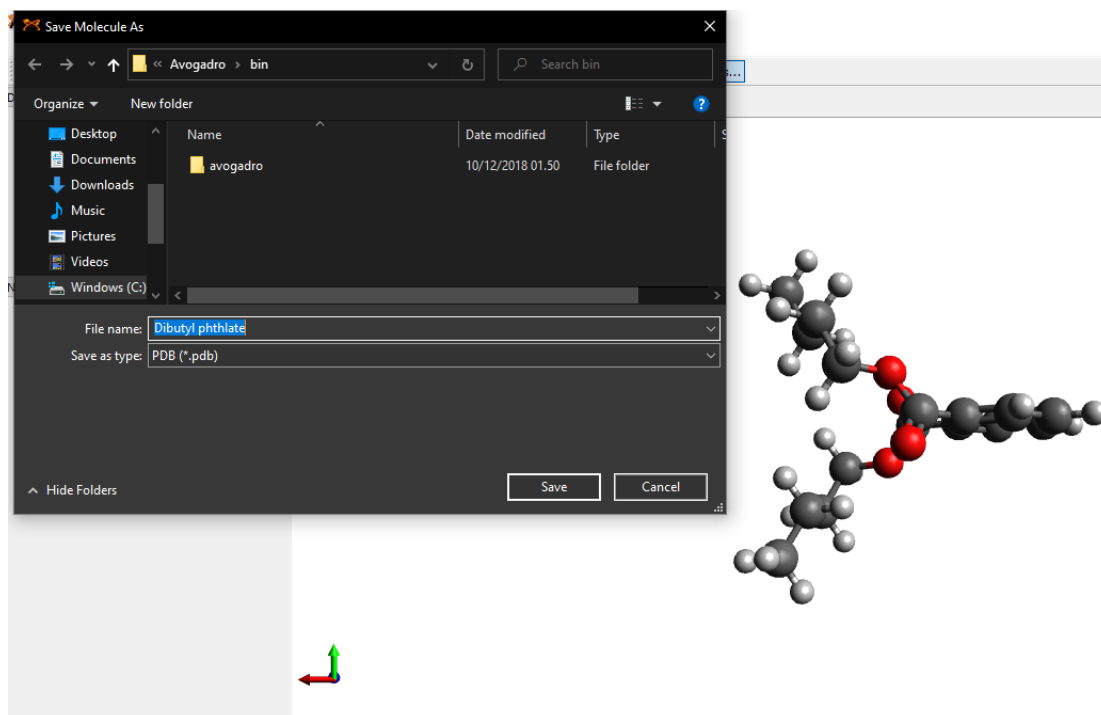
Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 46. Visualisasi bentuk senyawa Dibutyl phthalate dengan aplikasi Avogadro

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah terlihat visualisasi senyawa Dibutyl phthalate dalam bentuk 3D, pilih File, lalu Save As, dan ubah jenis format penyimpanan ke Protein Data Bank Files (pdb).



Gambar 47. Penyimpanan senyawa Dibutyl phthalate dalam bentuk PDB

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Penentuan Senyawa Protein Target/Makromolekul

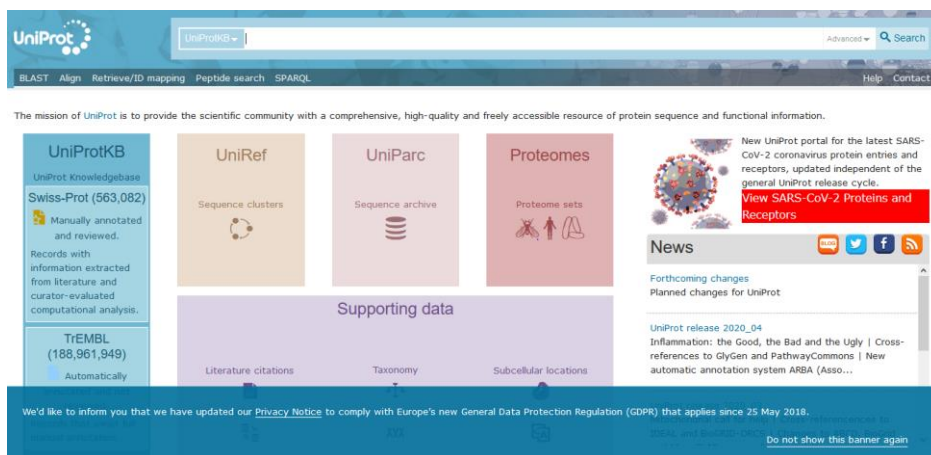
Tahapan selanjutnya adalah mengidentifikasi jenis protein target./makromolekul yang akan direaksikan dengan ligan. Beberapa situs yang dapat digunakan diantaranya PharmMapper, SuperPed, dan Swiss Target. Namun tahap ini dapat diabaikan jika dalam penelitian, peneliti sudah mengetahui protein yang akan ditarget. Seperti dalam penelitian ini mencari kandidat senyawa antibiotik, maka protein-protein yang berperan penting dalam kehidupan bakteri menjadi target untuk direaksikan dengan senyawa ligan. Makromolekul pada penelitian ini adalah protein-protein penting pada bakteri, diantaranya DNA Gyrase, dihydropteroate synthase (DHPS), Topoisomerase, dan protein outer membran. DNA Gyrase berperan penting dalam proses replikasi DNA. Topoisomerase berperan penting dalam proses sintesis asam nukleat, DHPS berperan penting dalam sintesis asam folat dan protein Outer Membrane merupakan komponen penting pada membran sel bakteri.

Setelah mengetahui protein target/makromolekul, identifikasi senyawa yang diasumsikan bersifat sebagai makromolekul atau senyawa protein target dilakukan menggunakan UniProt. Pangkalan Data sekuens biologi dapat berupa pangkalan data primer untuk menyimpan sekuens primer asam nukleat dan protein, pangkalan data sekunder untuk menyimpan motif sekuens protein dan pangkalan data struktur untuk menyimpan data struktur protein dan asam nukleat.

Pangkalan data utama untuk sekuens asam nukleat saat ini adalah GenBank (Amerika Serikat), EMBL (*the European Molecular Biology Laboratory*, Eropa) dan DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*, Jepang). Ketiga pangkalan data tersebut bekerja sama dan bertukar data secara harian untuk menjaga keluasan cakupan masing-masing pangkalan data. Sumber utama data sekuens asam nukleat adalah submisi (pengumpulan) langsung dari peneliti individual, proyek sekuensing genom, dan pendaftaran paten. Selain berisi sekuens asam nukleat, entri dalam pangkalan data sekuens asam nukleat pada umumnya mengandung informasi tentang jenis asam nukleat (DNA atau RNA), nama organisme sumber asam nukleat tersebut dan segala sesuatu yang berkaitan dengan sekuens asam nukleat tersebut.

Selain asam nukleat, beberapa contoh pangkalan data penting yang menyimpan sekuens primer protein adalah PIR (*Protein Information Resource*, Amerika Serikat), Swiss-Prot (Eropa), dan TrEMBL (Eropa). Ketiga pangkalan data tersebut telah digabungkan dalam UniProt, yang didanai terutama oleh Amerika Serikat. Entri dalam UniProt mengandung informasi tentang sekuens protein, nama organisme sumber protein, pustaka yang berkaitan dan komentar yang pada umumnya berisi penjelasan mengenai fungsi protein tersebut.

Di dalam UniProt akan terlampir semua karakteristik dari senyawa yang dicari baik dari binding sites, sifat katalisis, struktur senyawa, hingga jurnal-jurnal yang terkait dengan penelitian senyawa tersebut. Perlu diperhatikan dalam pencarian menggunakan Uniprot untuk selalu mencatat kode senyawa, karena pada server UniProt terdapat banyak data dari satu senyawa akan tetapi memiliki asal yang berbeda misalnya ada yang terdapat di bakteri, jamur, hewan, maupun manusia. Cara menggunakan Uniprot adalah sebagai berikut;



Gambar 48. Halaman Awal UniProt

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

1. Preparasi Makromolekul Dihydropteroate Synthase (DHPS)

Langkah pertama yaitu mencari data mengenai dihydropteroate synthase (DHPS) di kotak pencarian laman Uniprot. Akan muncul beberapa hasil yang dengan kode yang serta asal organisme yang memiliki DHPS. Karena ingin dilihat potensi senyawa sebagai antibiotik, maka dipilih DHPS pada bakteri.

The screenshot shows the UniProtKB search interface. The search bar contains 'dihydropteroate synthase'. Below the search bar, there are navigation options: BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, and SPARQL. The main heading is 'UniProtKB results'. A summary box explains that UniProtKB consists of two sections: 'Reviewed (Swiss-Prot) - Manually annotated' and 'Unreviewed (TrEMBL) - Computationally analyzed'. Below this, there are filter options and a table of search results. The table has columns for Entry, Entry name, Protein names, Gene names, Organism, and Length. The search results are filtered to show 25 of 118,728 results. The first few results are: P9WND1 (DHP51_MYCTU), P29251 (FOL1_PNECA), and Q9J770 (DHP5_NEIMA).

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P9WND1	DHP51_MYCTU	Dihydropteroate synthase	folP1 Rv3608c, MTCY07H7B.14	Mycobacterium tuberculosis (strain ATCC 25618 / H37Rv)	280
P29251	FOL1_PNECA	Folic acid synthesis protein fol1	fol1 fas	Pneumocystis carinii	740
Q9J770	DHP5_NEIMA	Dihydropteroate	folP dhpS, NMA1950	Neisseria meningitidis serogroup A / serotype 4A (strain	283

Gambar 49. Pencarian DHPS pada kotak pencarian

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

<input type="checkbox"/>	Q54YD9	FOL1_DICDI	Folic acid synthesis protein FOL1	fol1 DDB_G0278283	Dictyostelium discoideum (Slime mold)	657
<input type="checkbox"/>	Q9SZV3	FOLM_ARATH	Folate synthesis bifunctional prote...	MtHPPK/DHPS At4g30000, F6G3.30	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	554
<input type="checkbox"/>	D4GW05	FOLCP_HALVD	Probable bifunctional folylpolyglut...	folCP folC-P, HVO_1088, C498_13314	Haloferax volcanii (strain ATCC 29605 / DSM 3757 / JCM 8879 / NBRC 14742 / NCIMB 2012 / VKM B-1768 / DS2) (Halobacterium volcanii)	838
<input type="checkbox"/>	P59655	DHP5_STRR6	Dihydropteroate synthase	suIA spr0266	Streptococcus pneumoniae (strain ATCC BAA-255 / R6)	314
<input type="checkbox"/>	Q9HS44	FOLCP_HALSA	Probable bifunctional folylpolyglut...	folP VNG_0412G	Halobacterium salinarum (strain ATCC 700922 / JCM 11081 / NRC-1) (Halobacterium halobium)	815
<input type="checkbox"/>	P0C0X1	DHP5_MYCLE	Dihydropteroate synthase	folP1 folP, ML0224, MLCB2548.07c	Mycobacterium leprae (strain TN)	284
<input type="checkbox"/>	O05701	DHP5_STAAU	Dihydropteroate synthase	folP dpsA	Staphylococcus aureus	267
<input type="checkbox"/>	P0C002	DHP1_ECOLX	Dihydropteroate synthase type-1	suII sul1	Escherichia coli	279
<input type="checkbox"/>	P05382	DHP5_STRPN	Dihydropteroate synthase	suIA SP_0289	Streptococcus pneumoniae serotype 4 (strain ATCC BAA-334 / TIGR4)	314
<input type="checkbox"/>	Q9Z7E8	FOLKP_CHLPN	Folate synthesis bifunctional prote...	folKP folP, CPn_0758, CP_1114, CpB0786	Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae)	450
<input type="checkbox"/>	O84619	FOLKP_CHLTR	Folate synthesis bifunctional prote...	folKP CT_613	Chlamydia trachomatis (strain D/UW-3/Cx)	450

Gambar 50. Pemilihan database senyawa DHPS

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

UniProtKB - O05701 (DHPS_STAAU)

Display BLAST Align Format Add to basket History Help video

Entry Protein **Dihydropteroate synthase**
 Gene **folP**
 Organism *Staphylococcus aureus*
 Status **Reviewed** - Annotation score: ●●●●○ - Experimental evidence at protein level¹

Function¹

Catalyzes the condensation of para-aminobenzoate (pABA) with 6-hydroxymethyl-7,8-dihydropterin diphosphate (DHPT-PP) to form immediate precursor of folate derivatives. [1 Publication](#)

Miscellaneous

Specific mutations in this gene are a major cause of sulfonamide resistance in MRSA clinical isolates. [1 Publication](#)

Catalytic activity¹

- (7,8-dihydropterin-6-yl)methyl diphosphate + 4-aminobenzoate = 7,8-dihydropteroate + diphosphate [1 Publication](#)

EC:2.5.1.15 [1 Publication](#)

Source: Rhea. [Hide](#)

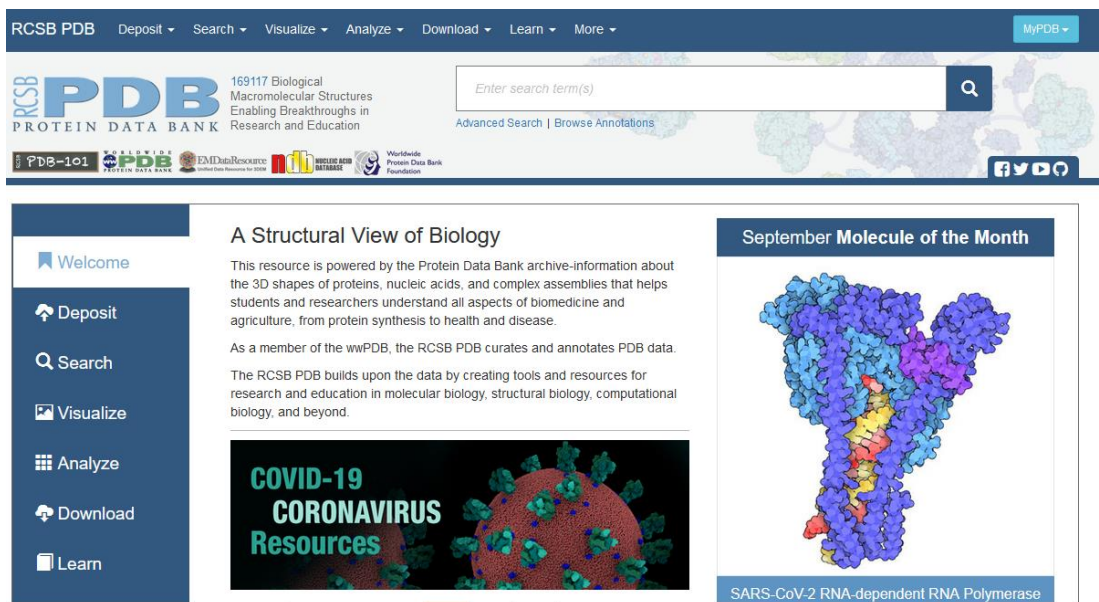
Gambar 51. Database senyawa DHPS pada bakteri

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pada tampilan senyawa DHPS, Scroll ke bawah hingga menemukan daftar struktur 3D dari senyawa pilihan dalam hal ini DHPS. Kemudian pilih kode yang memiliki resolusi terkecil. Untuk DHPS terdapat 4 kode PDB yang disediakan dengan kode 6CLU yang memiliki resolusi terkecil.

Setelah muncul database senyawa DHPS pada laman uniprot, maka selanjutnya perlu dicari struktur 3D dari senyawa protein yang akan diuji bersama dengan ligan. Struktur 3D senyawa protein dapat diunduh di Protein Data Bank yang dapat diakses di <https://www.rcsb.org/>.

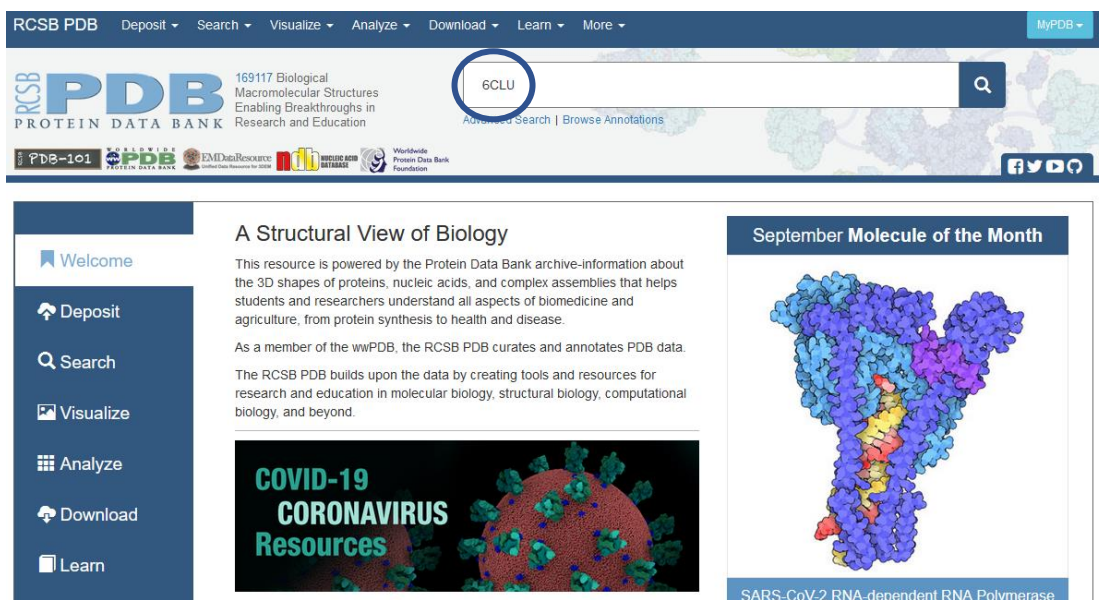
Protein Data Bank PDB merupakan basis data yang sangat penting dalam bidang biologi struktur, seperti genomika struktur. Sebagian besar jurnal ilmiah utama dan beberapa agensi pendanaan, saat ini mengharuskan ilmuwan untuk menyerahkan data struktur hasil penelitian mereka pada PDB. Banyak basis data lainnya yang menggunakan struktur protein yang tersimpan di PDB. Misalnya, SCOP dan CATH mengelompokkan struktur protein, sementara PDB menyediakan ikhtisar grafis dari entri PDB menggunakan informasi dari sumber lain, seperti ontologi gen.



Gambar 52. Tampilan awal situs Protein Data Bank

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Selanjutnya masukkan kode PDB protein DHPS (6CLU) di kotak pencarian pada halaman awal situs Protein Data Bank



Gambar 53. Pencarian kode senyawa DHPS

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu, akan muncul database dari kode yang dimasukkan. Untuk mengunduh format 3D senyawa DHPS, maka klik pada opsi download files, kemudian pilih “PDB format” .

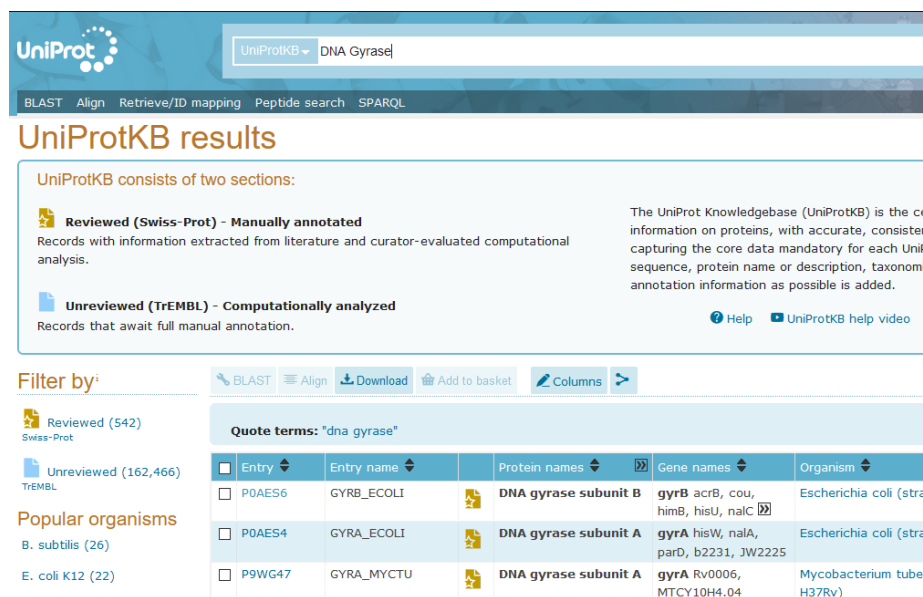


Gambar 54. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DHPS

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

2. Preparasi Makromolekul DNA Gyrase

Langkah pertama yaitu mencari data mengenai DNA Gyrase di kotak pencarian laman Uniprot. Akan muncul beberapa hasil yang dengan kode yang serta asal organisme yang memiliki DNA Gyrase. Karena ingin dilihat potensi senyawa sebagai antibiotik, maka dipilih DNA Gyrase pada bakteri.



Gambar 55. Pencarian DNA Gyrase pada kotak pencarian

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

The screenshot shows the UniProtKB search results for the query "dna gyrase". The search results are filtered by "Reviewed (Swiss-Prot) - Manually annotated". The results table shows two entries:

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
POAES6	GYRB_ECOLI	DNA gyrase subunit B	gyrB acrB, cou, himB, hisU, nalC	Escherichia coli (strain K12)
POAES4	GYRA_ECOLI	DNA gyrase subunit A	gyrA hisW, nalA, parD, b2231, JW2225	Escherichia coli (strain K12)

Gambar 56. Pemilihan database senyawa DNA Gyrase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

The screenshot shows the UniProtKB entry page for P0AES6 (GYRB_ECOLI). The entry is for the protein "DNA gyrase subunit B" (Gene: gyrB) from the organism "Escherichia coli (strain K12)". The status is "Reviewed - Annotation score: 5/5 - Experimental evidence at protein level". The function section is expanded, showing the following text:

DNA gyrase negatively supercoils closed circular double-stranded DNA in an ATP-dependent manner to maintain chromosomes in (PubMed:186775, PubMed:3031051, PubMed:1323022, PubMed:8248233, PubMed:7811004, PubMed:8621650, PubMed:9657678, PubMed:12051843, PubMed:18642932, PubMed:19060136, PubMed:19965760, PubMed:22457353, PubMed:23294697, PubMed:23352267, PubMed:24386374, PubMed:25202966, PubMed:25849408). This makes better substrates for topoisomerase enzyme that unlinks newly replicated chromosomes in E.coli (PubMed:9334322). Gyrase catalyzes the interconversion of other t stranded DNA rings, including catenanes (PubMed:22457352). Relaxes negatively supercoiled DNA in an ATP-independent manne has higher supercoiling activity than other characterized bacterial gyrases; at comparable concentrations E.coli gyrase introduc M.tuberculosis gyrase, while M.tuberculosis gyrase has higher decatenation than supercoiling activity compared to E.coli (PubM more negative supercoils in pBR322 plasmid DNA than S.typhimurium; the S.typhimurium GyrB subunit is toxic in E.coli, while the S.typhimurium even though the 2 subunits have 777/804 residues identical (PubMed:17400739). The enzymatic differences betw topoisomerase IV are largely due to the GyrA C-terminal domain (approximately residues 524-841) and specifically the GyrA-box PubMed:16332690). 27 Publications

Gambar 57. Database senyawa DNA Gyrase pada bakteri

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pada tampilan senyawa DNA Gyrase, Scroll ke bawah hingga menemukan daftar struktur 3D dari senyawa pilihan dalam hal ini DNA Gyrase. Kemudian pilih kode yang memiliki resolusi terkecil. Untuk DNA Gyrase terdapat beberapa kode PDB yang disediakan dengan kode 4DUH yang memiliki resolusi terkecil.

3D structure databases

Select the link destinations: ● PDB <i>e</i> ⁱ ORCSB PDB <i>i</i> OPDB <i>j</i> ⁱ	PDB entry	Method	Resolution (Å)	Chain	Positions	PDBsum
	1AJ6	X-ray	2.30	A	2-220	[>]
	1EI1	X-ray	2.30	A/B	2-392	[>]
	1KZN	X-ray	2.30	A	15-219	[>]
	3G7E	X-ray	2.20	A	15-217	[>]
	3NUH	X-ray	3.10	B	389-804	[>]
	4DUH	X-ray	1.50	A/B	1-220	[>]
	4HYP	X-ray	2.60	A/B/C/D	15-220	[>]
	4KFG	X-ray	1.60	A/B	15-220	[>]
	4PRV	X-ray	2.00	A	2-392	[>]
	4PRX	X-ray	1.80	A	2-392	[>]
	4PU9	X-ray	2.40	A	2-392	[>]
	4WUB	X-ray	1.75	A	2-393	[>]
	4WUC	X-ray	1.90	A	2-393	[>]
	4WUD	X-ray	1.95	A	2-393	[>]
	4XTJ	X-ray	1.92	A	2-392	[>]
	4ZVI	X-ray	2.20	A	16-392	[>]
	5L3J	X-ray	2.83	A	15-392	[>]

Gambar 58. 3D Structure Database DNA Gyrase

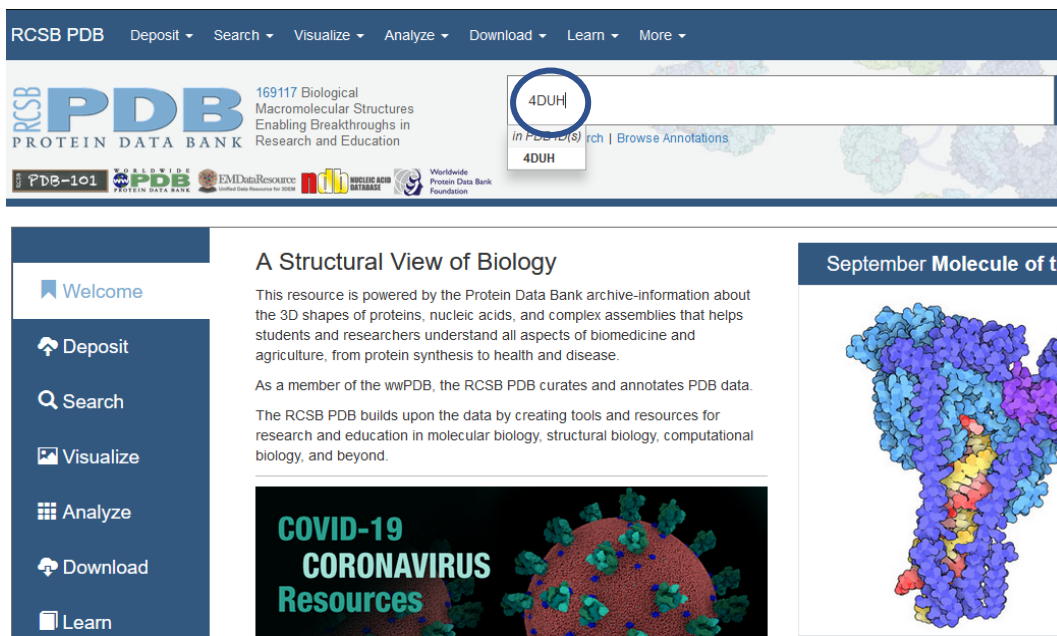
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah muncul database senyawa DNA Gyrase pada laman uniprot, maka selanjutnya perlu dicari struktur 3D dari senyawa protein yang akan diuji bersama dengan ligan. Struktur 3D senyawa protein dapat diunduh di Protein Data Bank yang dapat diakses di <https://www.rcsb.org/>.

Gambar 59. Tampilan awal situs Protein Data Bank

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

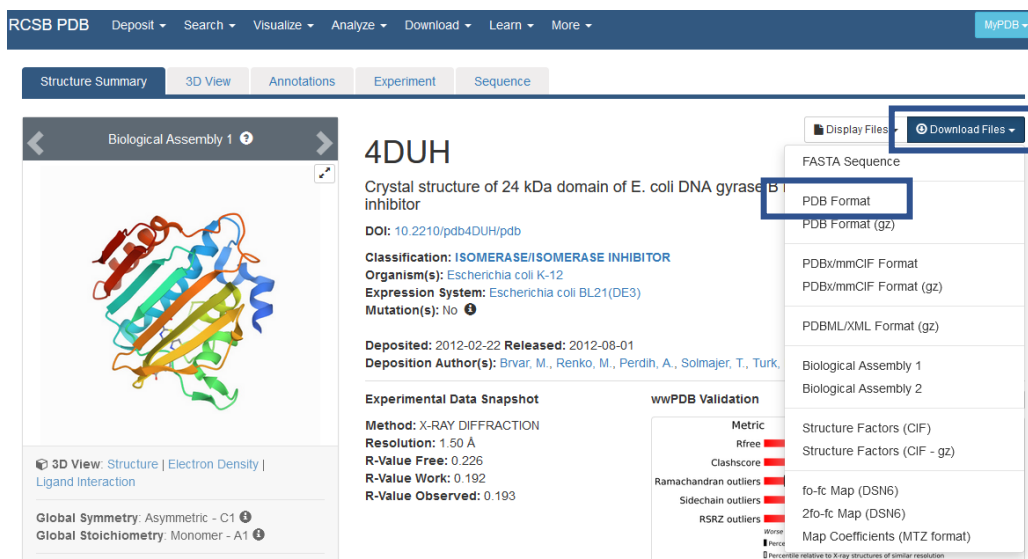
Selanjutnya masukkan kode PDB protein DNA Gyrase (4DUH) di kotak pencarian pada halaman awal situs Protein Data Bank



Gambar 60. Pencarian kode senyawa DNA Gyrase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu, akan muncul database dari kode yang dimasukkan. Untuk mengunduh format 3D senyawa DNA Gyrase, maka klik pada opsi download files, kemudian pilih “PDB format”.



Gambar 61. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DNA Gyrase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

3. Preparasi Makromolekul DNA Topoisomerase

Langkah pertama yaitu mencari data mengenai DNA Topoisomerase di kotak pencarian laman Uniprot. Akan muncul beberapa hasil yang dengan kode yang serta asal organisme yang memiliki DNA Topoisomerase. Karena ingin dilihat potensi senyawa sebagai antibiotik, maka dipilih DNA Topoisomerase pada bakteri.

The screenshot shows the UniProtKB search interface. The search bar contains 'DNA topoisomerase'. Below the search bar, there are navigation options: BLAST, Align, Retrieve/ID mapping, Peptide search, and SPARQL. The main heading is 'UniProtKB results'. A section titled 'UniProtKB consists of two sections:' describes 'Reviewed (Swiss-Prot) - Manually annotated' and 'Unreviewed (TrEMBL) - Computationally analyzed'. Below this, there are filters for 'Filter by:' (Reviewed (1,064), Unreviewed (319,013)), 'Popular organisms' (Human (137), A. thaliana (103)), and a search bar with 'Quote terms: "dna topoisomerase"'. A table of results is displayed with columns: Entry, Entry name, Protein names, Gene names, and Organism.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
P30181	TOP1A_ARATH	DNA topoisomerase 1 alpha	TOP1A FAS5, MGO1, TOP1, TOP1ALPHA, At5g55300	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)
Q92547	TOPB1_HUMAN	DNA topoisomerase 2-binding protein...	TOPBP1 KIAA0259	Homo sapiens (Human)
P11387	TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1	TOP1	Homo sapiens (Human)

Gambar 62. Pencarian DNA Topoisomerase pada kotak pencarian

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

This screenshot shows a detailed view of the search results for 'DNA topoisomerase'. The search bar still contains 'Quote terms: "dna topoisomerase"'. The table below lists several entries with their respective details. The entry for 'P06612' is highlighted with a black box.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
P30181	TOP1A_ARATH	DNA topoisomerase 1 alpha	TOP1A FAS5, MGO1, TOP1, TOP1ALPHA, At5g55300	Arabidopsis thaliana (Mouse-ear cress)	916
Q92547	TOPB1_HUMAN	DNA topoisomerase 2-binding protein...	TOPBP1 KIAA0259	Homo sapiens (Human)	1,522
P11387	TOP1_HUMAN	DNA topoisomerase 1	TOP1	Homo sapiens (Human)	765
P11388	TOP2A_HUMAN	DNA topoisomerase 2-alpha	TOP2A TOP2	Homo sapiens (Human)	1,531
P15348	TOP2_DROME	DNA topoisomerase 2	Top2 CG10223	Drosophila melanogaster (Fruit fly)	1,447
Q02880	TOP2B_HUMAN	DNA topoisomerase 2-beta	TOP2B	Homo sapiens (Human)	1,626
P06786	TOP2_YEAST	DNA topoisomerase 2	TOP2 TOR3, YNL088W, N2244	Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)	1,428
P06612	TOP1_ECOLI	DNA topoisomerase 1	topA supX, b1274, JW1266	Escherichia coli (strain K12)	865
Q01320	TOP2A_MOUSE	DNA topoisomerase 2-alpha	Top2a Top-2, Top2	Mus musculus (Mouse)	1,528

Gambar 63. Pemilihan database senyawa DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

UniProtKB - P06612 (TOP1_ECOLI)

Display BLAST Align Retrieve/ID mapping Peptide search SPARQL Help video Add a publication

Entry Protein **DNA topoisomerase 1**

Publications Gene **topA**

Feature viewer Organism *Escherichia coli (strain K12)*

Feature table Status Reviewed - Annotation score: ●●●●● - Experimental evidence at protein levelⁱ

Functionⁱ

Releases the supercoiling and torsional tension of DNA, which is introduced during the DNA replication and transcription, by transiently cleaving and rejoining a strand of the DNA duplex. Introduces a single-strand break via transesterification at a target site in duplex DNA. The scissile phosphodiester is attacked by the catalytic tyrosine of the enzyme, resulting in the formation of a DNA-(5'-phosphotyrosyl)-enzyme intermediate and the expulsion of a 3'-OH DNA strand. The DNA strand then undergoes passage around the unbroken strand, thus removing DNA supercoils. Finally, in the religation step, the DNA 3'-OH attacks the phosphotyrosyl intermediate to expel the active-site tyrosine and restore the DNA phosphodiester backbone. UniRule annotation 3 Publications

Catalytic activityⁱ

• ATP-independent breakage of single-stranded DNA, followed by passage and rejoining. UniRule annotation 4 Publications EC:5.6.2.1

Cofactorⁱ

Gambar 64. Database senyawa DNA Topoisomerase pada bakteri

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pada tampilan senyawa DNA Topoisomerase, Scroll ke bawah hingga menemukan daftar struktur 3D dari senyawa pilihan dalam hal ini DNA Topoisomerase. Kemudian pilih kode yang memiliki resolusi terkecil. Untuk DNA Topoisomerase terdapat beberapa kode PDB yang disediakan dengan kode 1MW9 yang memiliki resolusi terkecil.

3D structure databases

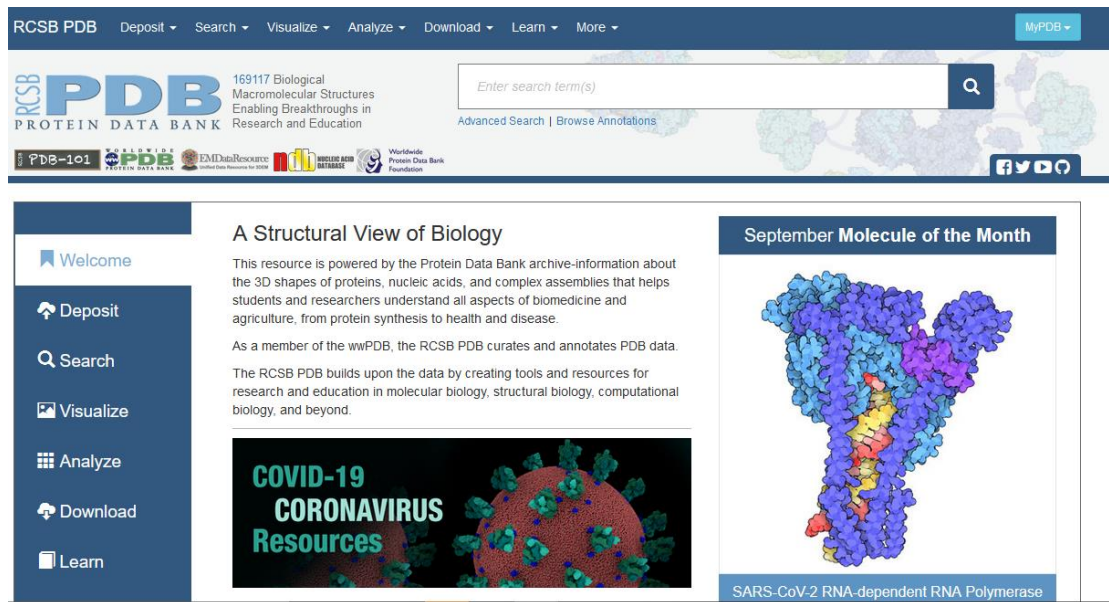
Select the link destinations:
 PDB^e
 RCSB PDBⁱ
 OPDB^j

PDB entry	Method	Resolution (Å)	Chain	Positions	PDBsum
1CY0	X-ray	2.45	A	1-597	[>]
1CY1	X-ray	2.30	A	1-597	[>]
1CY2	X-ray	2.30	A	1-597	[>]
1CY4	X-ray	2.55	A	1-597	[>]
1CY6	X-ray	2.50	A	1-597	[>]
1CY7	X-ray	2.40	A	1-597	[>]
1CY8	X-ray	2.45	A	1-597	[>]
1CY9	X-ray	1.80	A/B	214-477	[>]
1CYY	X-ray	2.15	A/B	214-477	[>]
1ECL	X-ray	1.90	A	1-597	[>]
1MW8	X-ray	1.90	X	1-592	[>]
1MW9	X-ray	1.67	X	1-592	[>]
1YUA	NMR	-	A	745-865	[>]
3PWT	X-ray	1.90	A	1-596	[>]
3PX7	X-ray	2.30	A	1-595	[>]
4RUL	X-ray	2.90	A	2-865	[>]

Gambar 65. 3D Structure Database DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

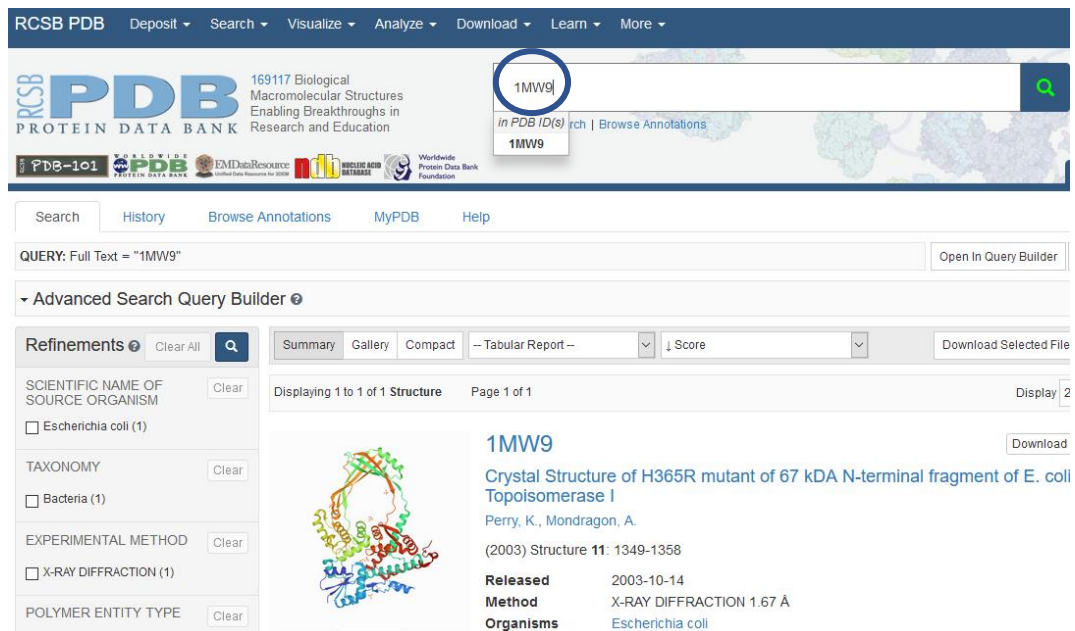
Setelah muncul database senyawa DNA Topoisomerase pada laman uniprot, maka selanjutnya perlu dicari struktur 3D dari senyawa protein yang akan diuji bersama dengan ligan. Struktur 3D senyawa protein dapat diunduh di Protein Data Bank yang dapat diakses di <https://www.rcsb.org/>.



Gambar 66. Tampilan awal situs Protein Data Bank

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Selanjutnya masukkan kode PDB protein DNA Topoisomerase (4DUH) di kotak pencarian pada halaman awal situs Protein Data Bank



Gambar 67. Pencarian kode senyawa DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu, akan muncul database dari kode yang dimasukkan. Untuk mengunduh format 3D senyawa DNA Topoisomerase, maka klik pada opsi download files, kemudian pilih “PDB format”.

The screenshot shows the RCSB PDB interface for entry 1MW9. The 'Download Files' dropdown menu is open, listing various formats. 'PDB Format' is highlighted with a red box. Other options include FASTA Sequence, PDB Format (gz), PDBx/mmCIF Format, PDBx/mmCIF Format (gz), PDBML/XML Format (gz), Biological Assembly 1, Structure Factors (CIF), Structure Factors (CIF - gz), fo-fc Map (DSN6), 2fo-fc Map (DSN6), and Map Coefficients (MTZ format). The main page displays the protein structure, classification as ISOMERASE, organism as Escherichia coli, and experimental data including X-RAY DIFFRACTION with a resolution of 1.67 Å.

Gambar 68. Pengunduhan bentuk 3D senyawa DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

4. Preparasi Makromolekul Outer Membran

Langkah pertama yaitu mencari data mengenai Outer Membran di kotak pencarian laman Uniprot. Akan muncul beberapa hasil yang dengan kode yang serta asal organisme yang memiliki Outer Membran. Karena ingin dilihat potensi senyawa sebagai antibiotik, maka dipilih Outer Membran pada bakteri.

The screenshot shows the UniProtKB search results for the query 'outer membrane'. The search bar at the top contains the text 'outer membrane'. Below the search bar, the results are filtered by 'Reviewed (Swiss-Prot) - Manually annotated'. The first result is for entry P0A910, which is OMPA_ECOLI. The protein is identified as 'Outer membrane protein A' and is associated with the gene names 'ompA con, tolG, tut, b0957, JW0940' and the organism 'Escherichia coli (strain K12)'. The interface includes navigation options like BLAST, Align, Download, and Add to basket, as well as a table of search results.

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism
<input type="checkbox"/> P0A910	OMPA_ECOLI	Outer membrane protein A	ompA con, tolG, tut, b0957, JW0940	Escherichia coli (strain K12)

Gambar 69. Pencarian Outer Membran pada kotak pencarian

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

BLAST Align Download Add to basket Columns 1 to 25 of 2,224,387 Show

Quote terms: "outer membrane"

Entry	Entry name	Protein names	Gene names	Organism	Length
<input type="checkbox"/> P0A910	OMPA_ECOLI	Outer membrane protein A	ompA con, tolG, tut, b0957, JW0940	Escherichia coli (strain K12)	346
<input type="checkbox"/> P02931	OMP_F_ECOLI	Outer membrane porin F	ompF cmlB, coa, cry, tolF, b0929	Escherichia coli (strain K12)	362
<input type="checkbox"/> Q7BCK4	ICSA_SHIFL	Outer membrane protein IcsA autotra...	icsA virG, CP0182	Shigella flexneri	1,102
<input type="checkbox"/> P06996	OMPC_ECOLI	Outer membrane porin C	ompC meoA, par, b2215, JW2203	Escherichia coli (strain K12)	367
<input type="checkbox"/> P9WIU5	ARFA_MYCTU	Peptidoglycan-binding protein ArfA	arfA ompA, Rv0899, MTCY31.27	Mycobacterium tuberculosis (strain ATCC 25618 / H37Rv)	326
<input type="checkbox"/> P02930	TOLC_ECOLI	Outer membrane protein TolC	tolC colE1-i, mtcB, mukA, refl, toc	Escherichia coli (strain K12)	493
<input type="checkbox"/> P49334	TOM22_YEAST	Mitochondrial import receptor subun...	TOM22 MAS17, MAS22, MOM22, YNL131W, N1217	Saccharomyces cerevisiae (strain ATCC 204508 / S288c) (Baker's yeast)	152

Gambar 70. Pemilihan database senyawa Outer Membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

UniProt UniProtKB

BLAST Align Retrieve/ID mapping Peptide search SPARQL

UniProtKB - P0A910 (OMPA_ECOLI)

Display BLAST Align Format Add to basket History

Entry Protein: Outer membrane protein A
Gene: ompA
Organism: Escherichia coli (strain K12)
Status: Reviewed - Annotation score: ●●●●● - Experimental evidence at protein levelⁱ

None **Functionⁱ**

Function
 Names & Taxonomy
 Subcellular location
 Pathology & Biotech
 PTM / Processing
 Expression

With TolR probably plays a role in maintaining the position of the peptidoglycan cell wall in the periplasm (Probab stress, and a role in outer membrane functionality and cell shape (PubMed:11906175, PubMed:361695). Non-cov (Probable). Acts as a porin with low permeability that allows slow penetration of small solutes (PubMed:1370823 abundant protein, there can be up to 210,000 OmpA molecules per cell (PubMed:24766808). Reconstitution in ur protein is in an open conformation, which allows diffusion of L-arabinose at a rate comparable to that of OmpF p (PubMed:7517935). Native and reconstituted protein forms ion channels with 2 conductance states of (50-80 p: in this study. Interconversion requires refolding of the periplasmic domain (PubMed:10636850). Small pores are c temperature; in this model the C-terminal periplasmic domain forms 8 more beta sheets to form a larger pore (Pu

Gambar 71. Database senyawa Outer Membran pada bakteri

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pada tampilan senyawa Outer Membran, Scroll ke bawah hingga menemukan daftar struktur 3D dari senyawa pilihan dalam hal ini Outer Membran. Kemudian pilih kode yang memiliki resolusi terkecil. Untuk Outer Membran terdapat beberapa kode PDB yang disediakan dengan kode 1QJP yang memiliki resolusi terkecil.

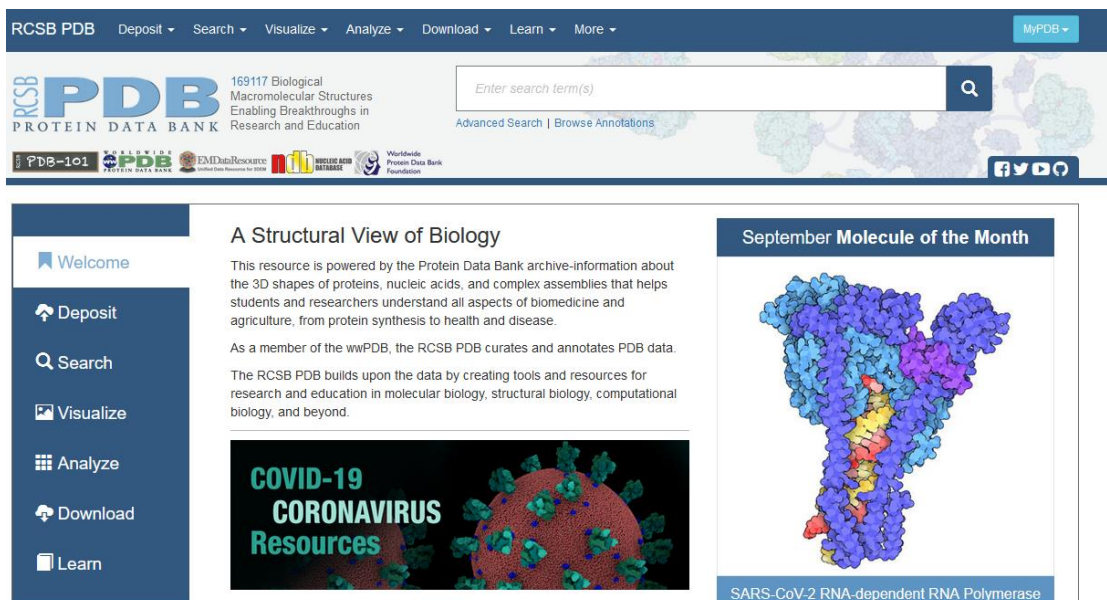
3D structure databases

Select the link destinations:	PDB entry	Method	Resolution (Å)	Chain	Positions
<input type="radio"/> PDBe ⁱ	1BXW	X-ray	2.50	A	21-192
<input type="radio"/> RCSB PDB ⁱ	1G90	NMR	-	A	22-197
<input type="radio"/> OPDB ^j	1QJP	X-ray	1.65	A	22-192
	2GE4	NMR	-	A	22-197
	2JMM	NMR	-	A	23-197
	2MQE	NMR	-	A	201-346
	3JBU	electron microscopy	3.64	Z	1-24
	5M2Q	X-ray	1.70	A/B	1-22
	6ITC	electron microscopy	3.45	B	2-26
SMR ⁱ	P0A910				
ModBase ⁱ	Search...				
PDBe-KB ⁱ	Search...				

Gambar 72. 3D Structure Database Outer Membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

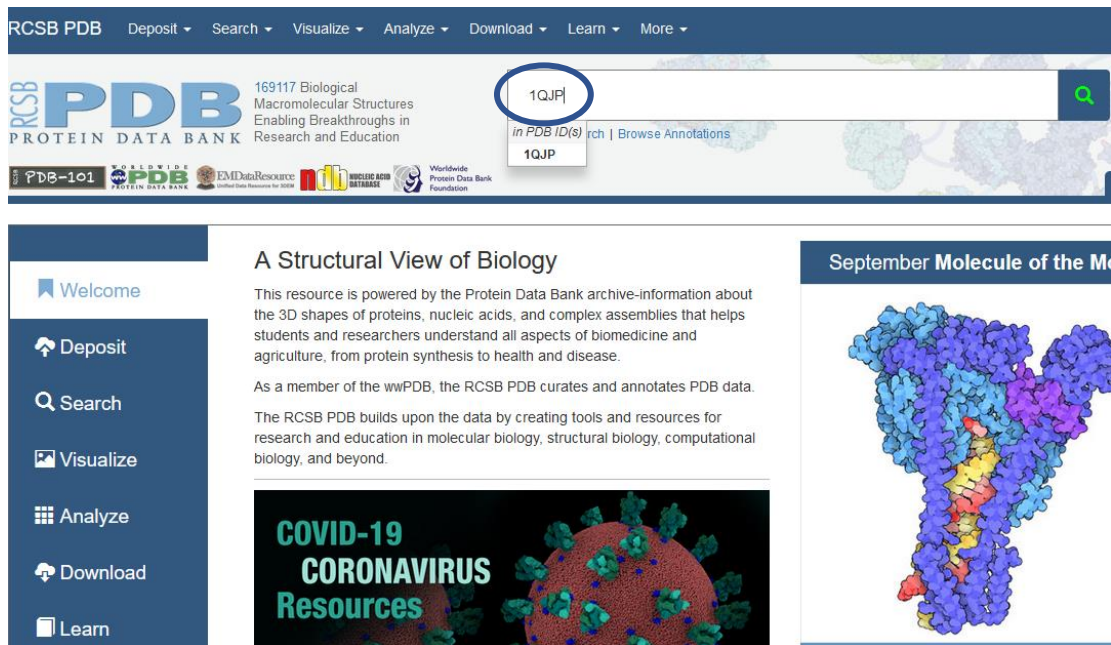
Setelah muncul database senyawa Outer Membran pada laman uniprot, maka selanjutnya perlu dicari struktur 3D dari senyawa protein yang akan diuji bersama dengan ligan. Struktur 3D senyawa protein dapat diunduh di Protein Data Bank yang dapat diakses di <https://www.rcsb.org/>.



Gambar 73. Tampilan awal situs Protein Data Bank

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

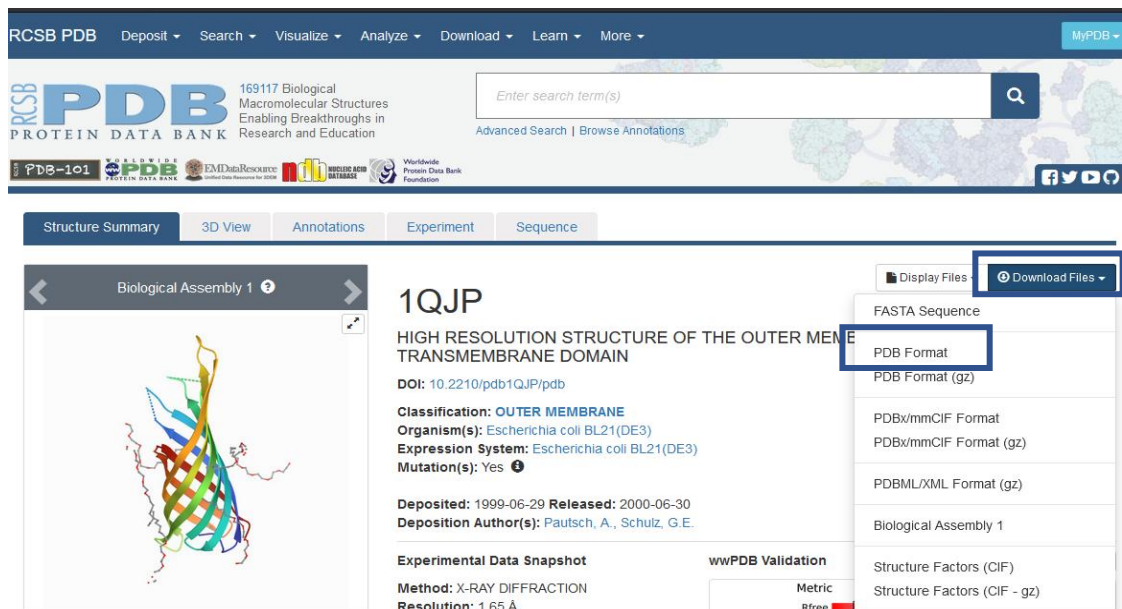
Selanjutnya masukkan kode PDB protein Outer Membran (4DUH) di kotak pencarian pada halaman awal situs Protein Data Bank.



Gambar 74. Pencarian kode senyawa Outer Membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah itu, akan muncul database dari kode yang dimasukkan. Untuk mengunduh format 3D senyawa Outer Membran, maka klik pada opsi download files, kemudian pilih “PDB format”.



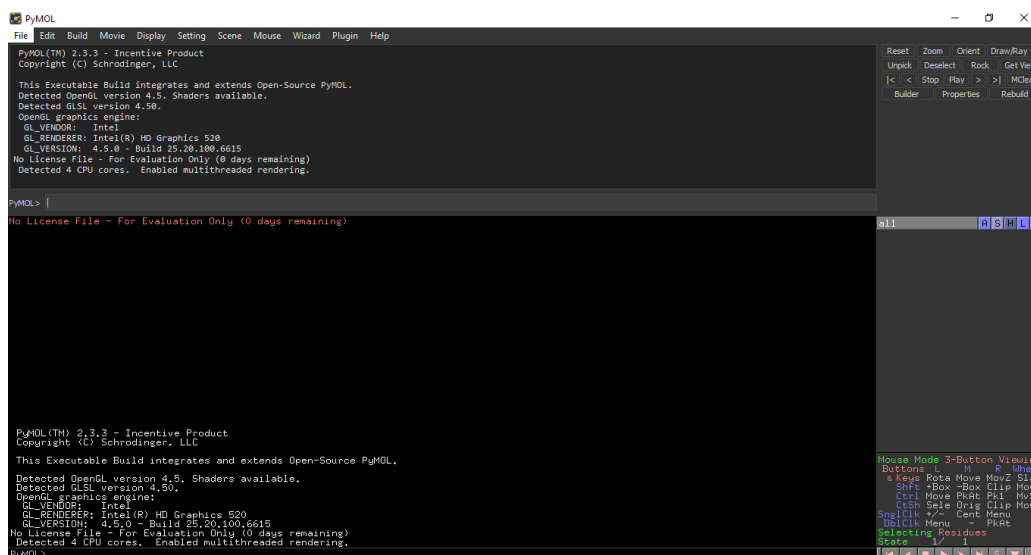
Gambar 75. Pengunduhan bentuk 3D senyawa Outer Membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pemotongan Senyawa Protein

Tahap berikutnya adalah tahap pemotongan protein yang telah diunduh dari server PDB sebelumnya. Pemotongan senyawa DHPS perlu dilakukan untuk memisahkan setiap ikatan protein yang menyusun senyawa ligand tersebut. Selain memisahkan setiap ikatan protein, pemotongan ini juga bertujuan untuk menghilangkan unsur lain selain ikatan protein, misalnya ikatan air. Hal ini dilakukan karena selain ikatan protein, ikatan unsur lain akan mempengaruhi proses perlekatan antara senyawa dan ligand pada tahap ‘docking’ nanti. Pemotongan senyawa protein dilakukan dengan aplikasi PyMol.

Pymol merupakan alat *open source* untuk memvisualisasikan molekul. Pymol memiliki kemampuan yang sangat baik dalam menciptakan gambar yang berkualitas dari struktur 3D, memiliki welldeveloped untuk memanipulasi struktur beberapa fungsi dasar untuk analisis sifat kimia suatu senyawa. Pymol juga berfungsi untuk memisahkan dari setiap ikatan protein yang menyusun senyawa ligan tersebut. Selain memisahkan setiap ikatan protein, pemotongan ini juga bertujuan untuk menghilangkan unsur lain selain ikatan protein, misalnya ikatan air.



Gambar 76. Tampilan awal aplikasi PyMol

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

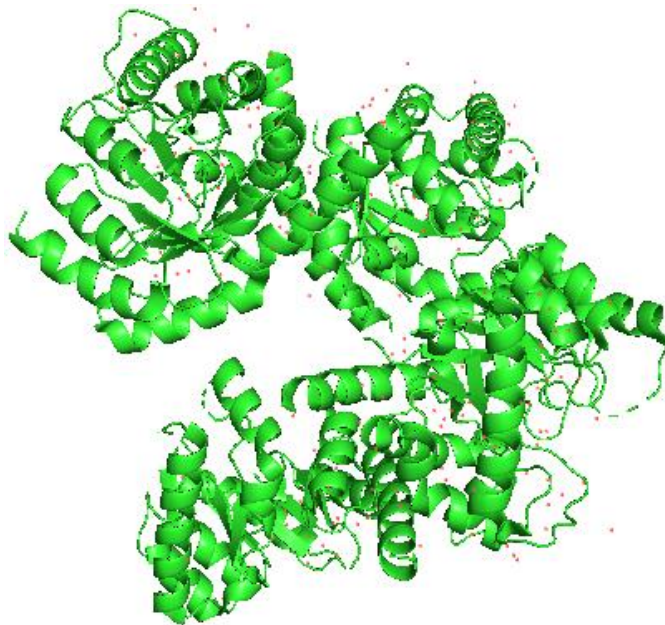
1. Dihydropteroate Synthase (DHPS)



Gambar 77. Buka File DHPS

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah dibuka aplikasi Pymol, klik file kemudian open lalu pilih senyawa DHPS yang sebelumnya telah diunduh dari server PDB.

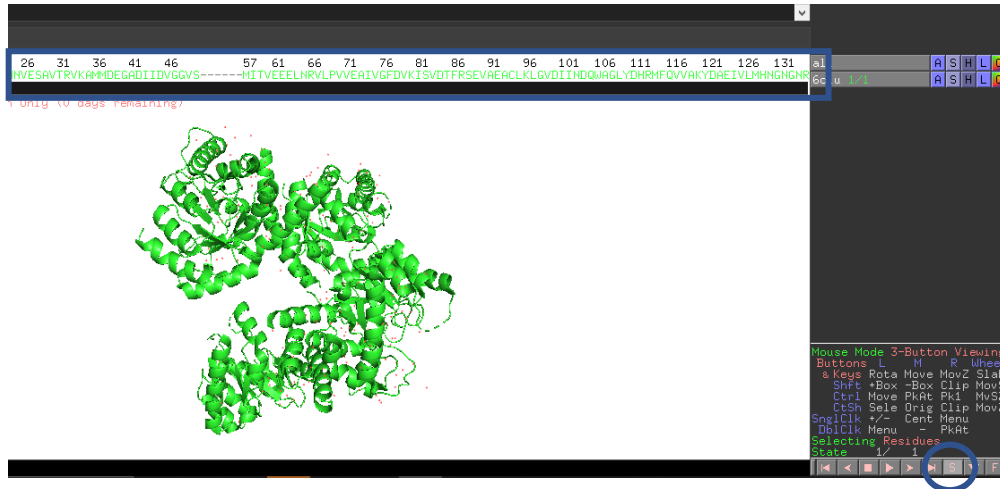


Gambar 78. Struktur 3D senyawa DHPS

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Struktur yang diunduh masih memiliki ikatan selain protein, hal ini akan mempengaruhi hasil "docking nanti". Oleh karena itu perlu dipotong ikatan selain

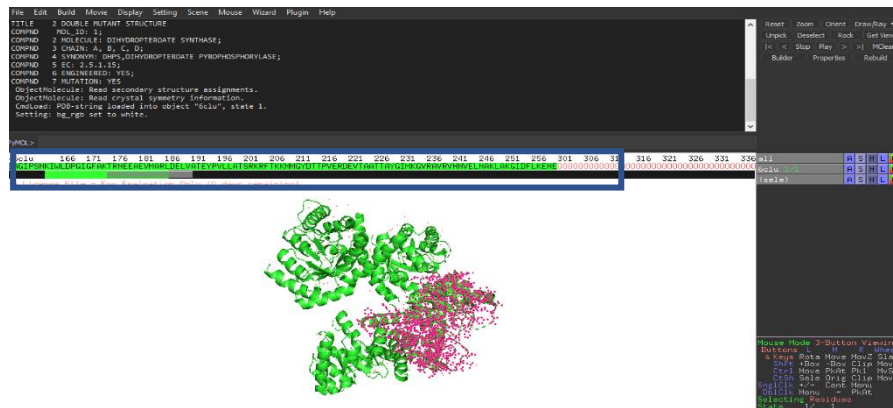
protein dengan ikatan protein dari DHPS. Caranya yang pertama dengan klik menu “S” yang berada di pojok kanan bawah aplikasi PyMol. Dengan mengklik menu “S” maka akan muncul kode ikatan protein pada bagian atas senyawa DHPS.



Gambar 79. Pemilihan ikatan protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

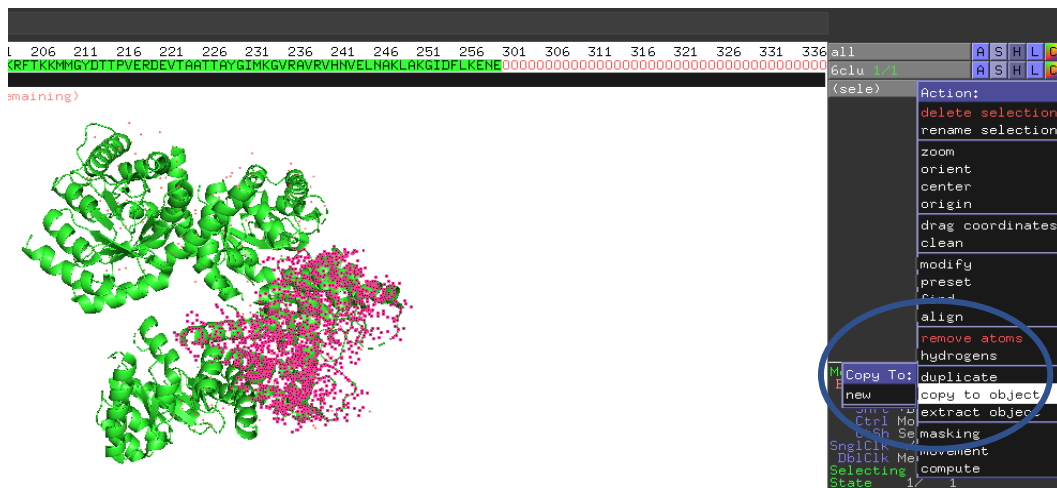
Selanjutnya, klik pada huruf pertama ikatan protein yang berwarna hijau dan tekan ‘Shift’ pada keyboard lalu tarik kursor hingga ke ujung huruf hijau lagi. Perlu diperhatikan bahwa ikatan protein yang dimaksud adalah deretan huruf tanpa spasi dan berwarna hijau, karena terdapat beberapa huruf yang berwarna hijau tetapi memiliki spasi merupakan susunan ligand lain dan bukan protein. Serta juga terdapat susunan angka ‘0’ tanpa spasi, akan tetapi berwarna merah merupakan struktur molekul air dan bukan bagian dari ikatan protein.



Gambar 80. Tahap Pematangan Protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

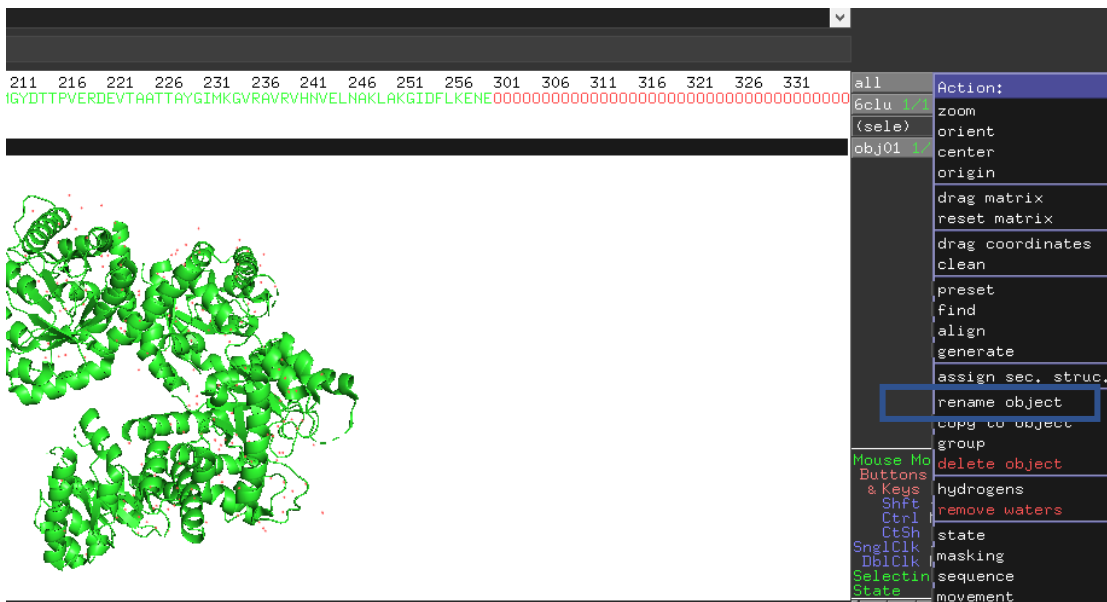
Kemudian pada kotak “sele” klik menu “A” lalu pilih opsi “copy to object” untuk menduplikasi senyawa yang dipotong



Gambar 81. Duplikasi senyawa protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah diduplikasi, maka pada kotak “obj01” klik menu “A” lalu pilih opsi “Rename object” untuk mengganti nama senyawa yang sudah dipisahkan dari ikatan selain protein.



Gambar 82. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan ikatan selain protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

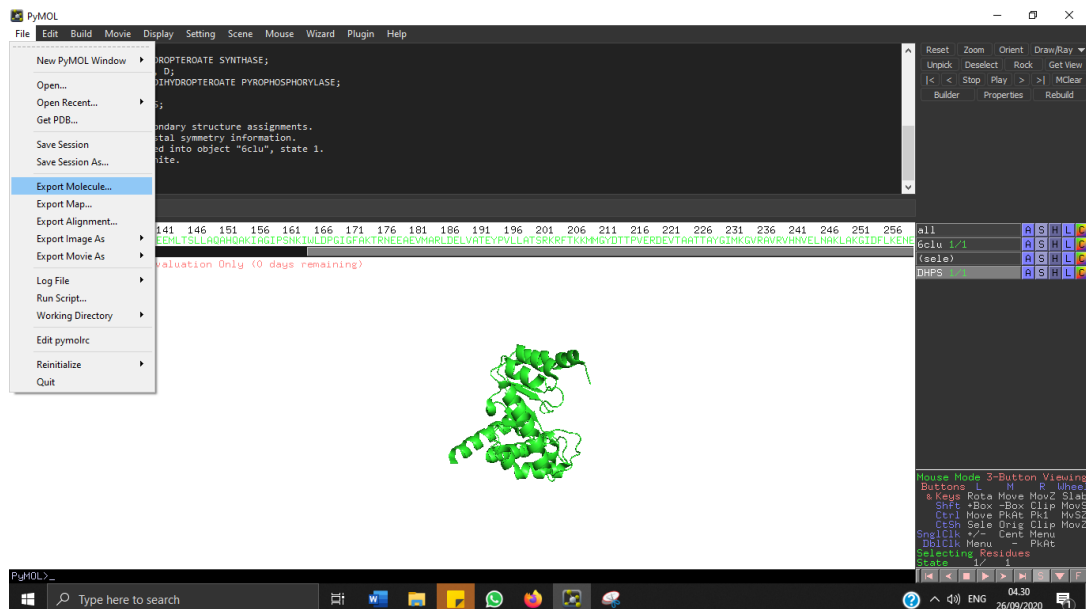
Langkah selanjutnya klik kotak nama senyawa yang diunduh dan kotak sele sehingga akan muncul bentuk DHPS yang telah bersih dari ikatan selain protein.



Gambar 83. Tampilan senyawa DHPS setelah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

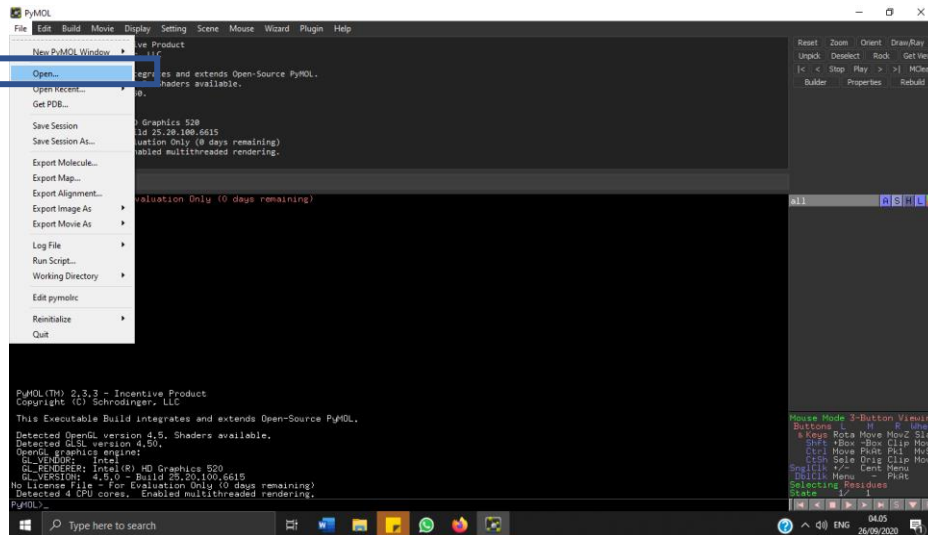
Setelah didapat senyawa protein bersih maka disimpan dengan cara klik menu “File” lalu pilih export molecule lalu klik save. Setelah mengklik save, maka akan muncul tampilan lebih rinci mengenai penyimpanannya. Simpan dengan format PDB dengan nama yang diinginkan.



Gambar 84. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

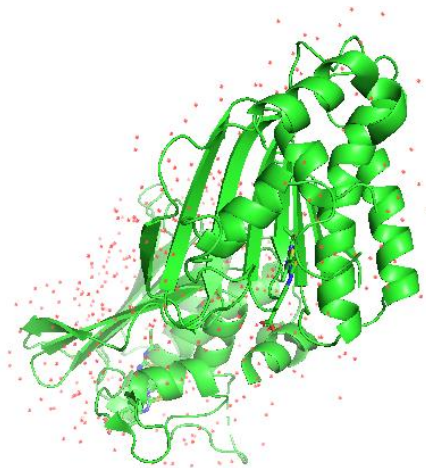
2. DNA Gyrase



Gambar 85. Buka File DNA Gyrase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

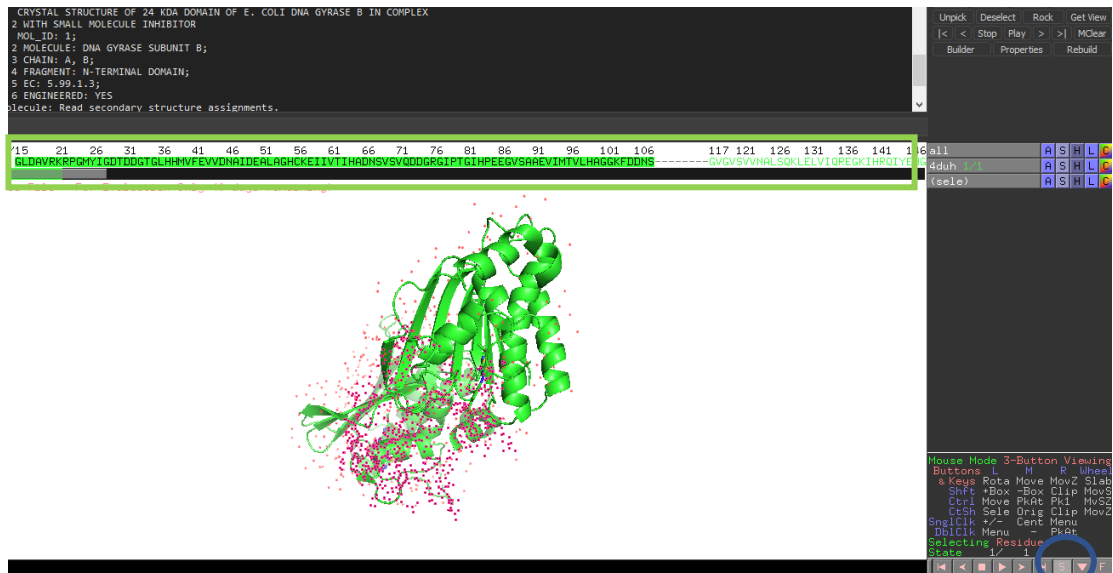
Setelah dibuka aplikasi Pymol, klik file kemudian open lalu pilih senyawa DHPS yang sebelumnya telah diunduh dari server PDB.



Gambar 86. Struktur 3D senyawa DNA Gyrase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Struktur yang diunduh masih memiliki ikatan selain protein, hal ini akan mempengaruhi hasil ”docking nanti”. Oleh karena itu perlu dipotong ikatan selain protein dengan ikatan protein dari DNA Gyrase. Caranya yang pertama dengan klik menu ”S” yang berada di pojok kanan bawah aplikasi PyMol. Dengan mengklik menu ”S” maka akan muncul kode ikatan protein pada bagian atas senyawa DNA Gyrase.



Gambar 87. Pemilihan ikatan protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

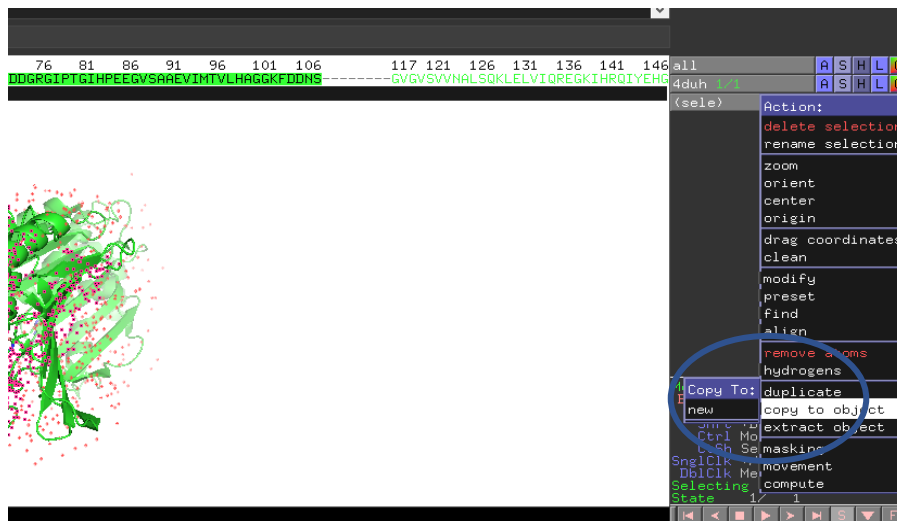
Selanjutnya, klik pada huruf pertama ikatan protein yang berwarna hijau dan tekan ‘Shift’ pada keyboard lalu tarik kursor hingga ke ujung huruf hijau lagi. Perlu diperhatikan bahwa ikatan protein yang dimaksud adalah deretan huruf tanpa spasi dan berwarna hijau, karena terdapat beberapa huruf yang berwarna hijau tetapi memiliki spasi merupakan susunan ligand lain dan bukan protein. Serta juga terdapat susunan angka ‘0’ tanpa spasi, akan tetapi berwarna merah merupakan struktur molekul air dan bukan bagian dari ikatan protein.



Gambar 88. Tahap Pematangan Protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

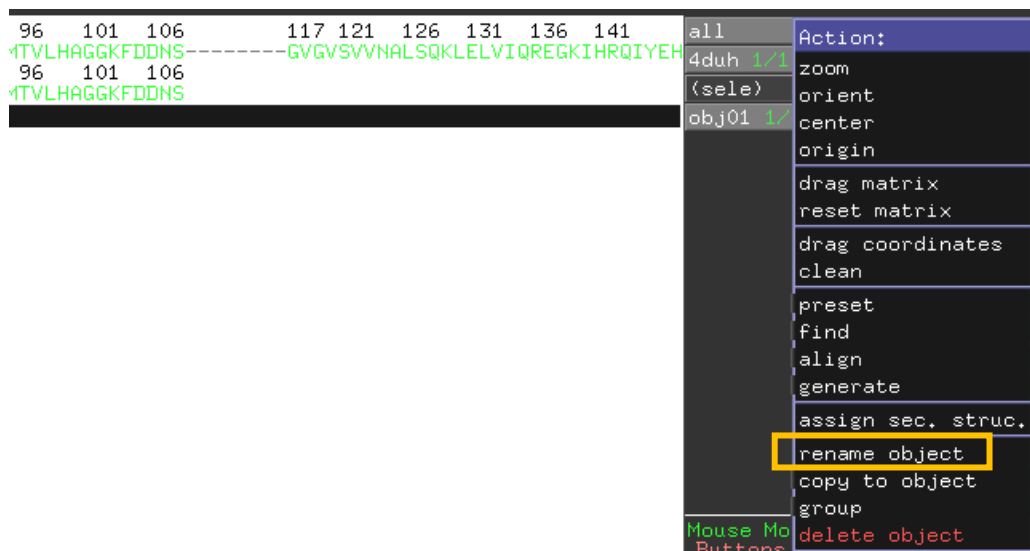
Kemudian pada kotak “sele” klik menu “A” lalu pilih opsi “copy to object” untuk menduplikasi senyawa yang dipotong



Gambar 89. Duplikasi senyawa protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

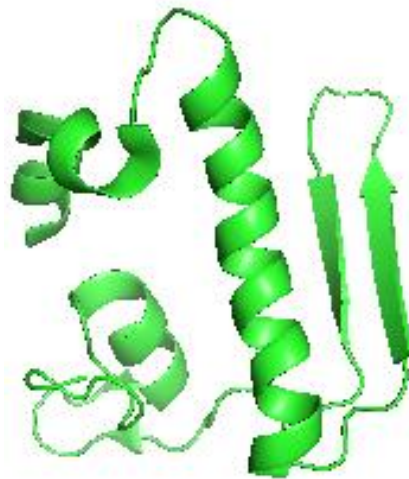
Setelah diduplikasi, maka pada kotak “obj01” klik menu “A” lalu pilih opsi “Rename object” untuk mengganti nama senyawa yang sudah dipisahkan dari ikatan selain protein.



Gambar 90. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

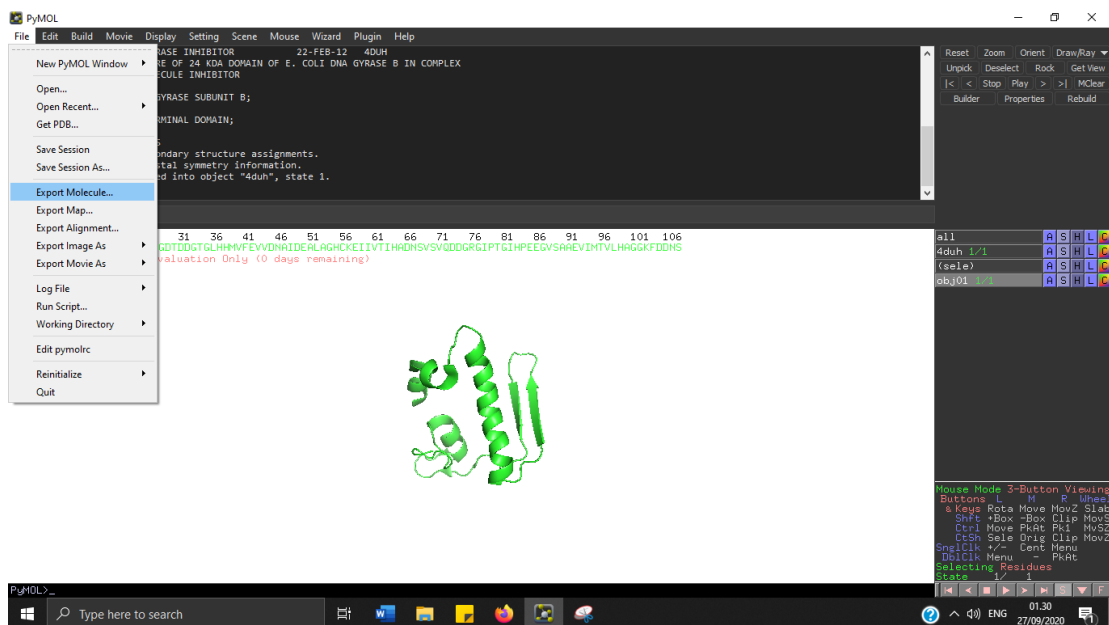
Langkah selanjutnya klik kotak nama senyawa yang diunduh dan kotak sele sehingga akan muncul bentuk DNA Gyrase yang telah bersih dari ikatan selain protein.



Gambar 91. Tampilan senyawa DNA Gyrase setelah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

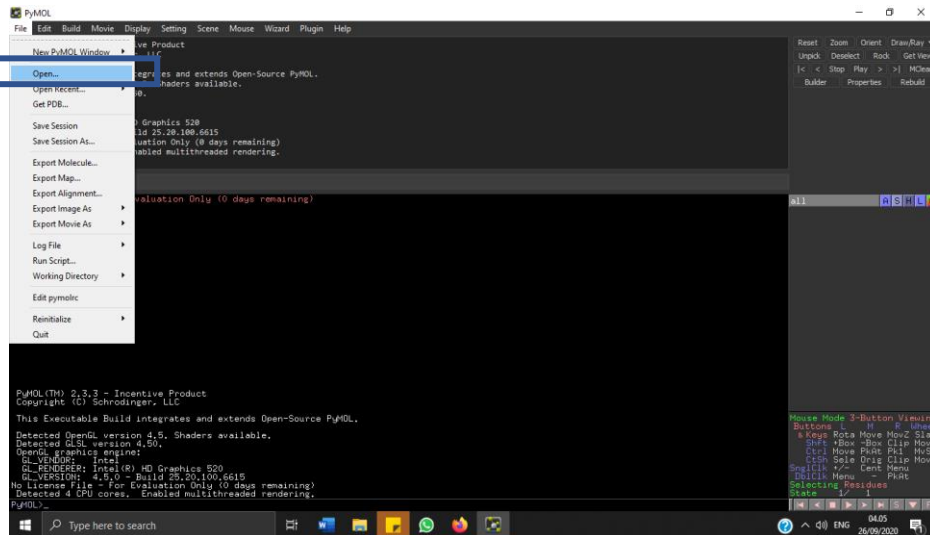
Setelah didapat senyawa protein bersih maka disimpan dengan cara klik menu “File” lalu pilih export molecule lalu klik save. Setelah mengklik save, maka akan muncul tampilan lebih rinci mengenai penyimpanannya. Simpan dengan format PDB dengan nama yang diinginkan.



Gambar 92. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

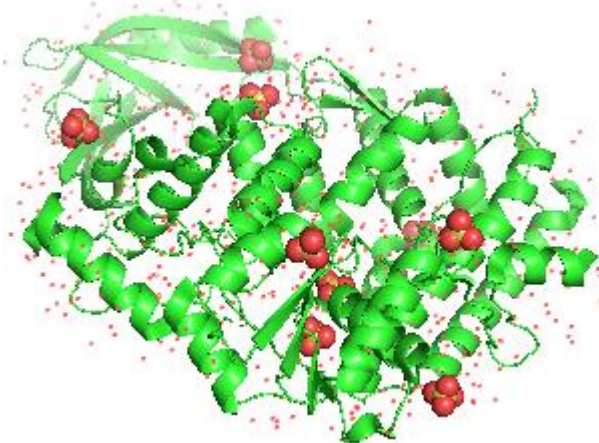
3. DNA Topoisomerase



Gambar 93. Buka File DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

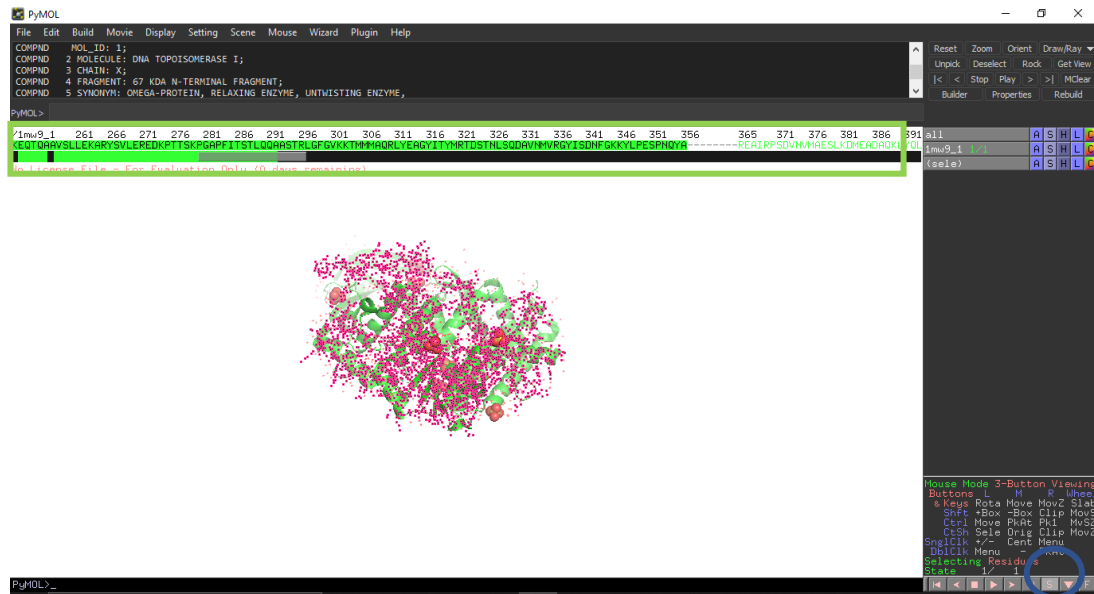
Setelah dibuka aplikasi Pymol, klik file kemudian open lalu pilih senyawa DHPS yang sebelumnya telah diunduh dari server PDB.



Gambar 94. Struktur 3D senyawa DNA Topoisomerase

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

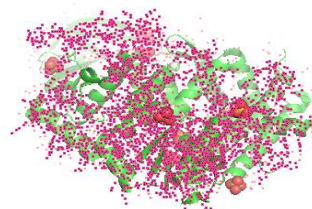
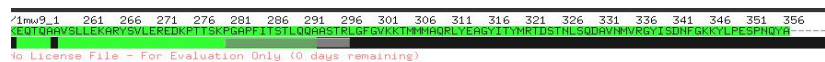
Struktur yang diunduh masih memiliki ikatan selain protein, hal ini akan mempengaruhi hasil ”docking nanti”. Oleh karena itu perlu dipotong ikatan selain protein dengan ikatan protein dari DNA Topoisomerase. Caranya yang pertama dengan klik menu “S” yang berada di pojok kanan bawah aplikasi PyMol. Dengan mengklik menu “S” maka akan muncul kode ikatan protein pada bagian atas senyawa DNA Topoisomerase.



Gambar 95. Pemilihan ikatan protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

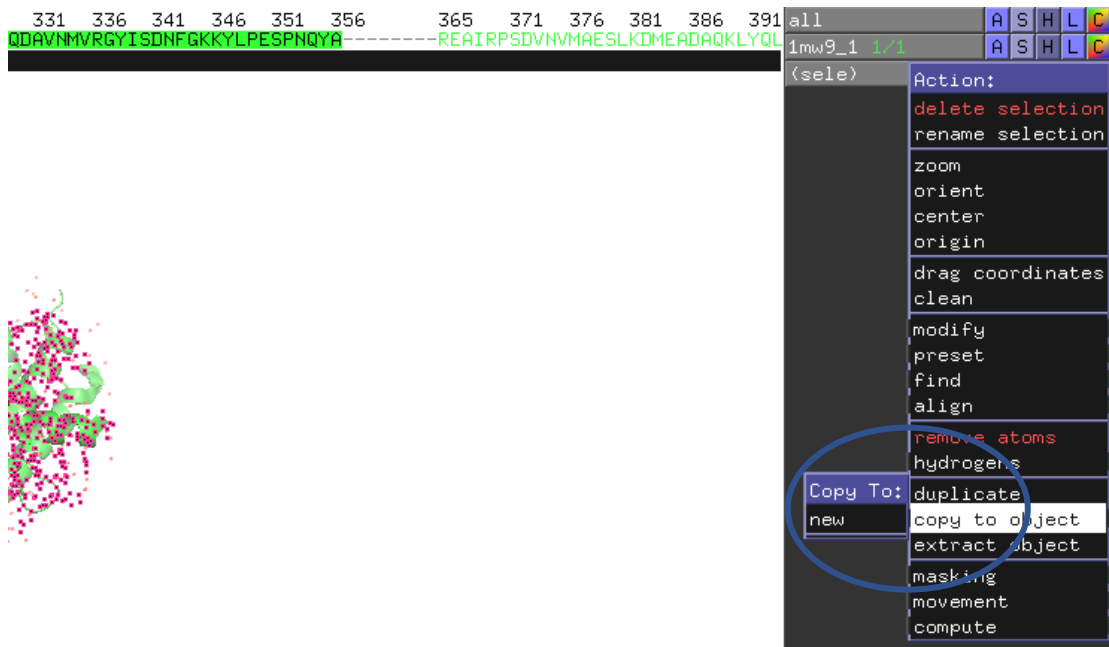
Selanjutnya, klik pada huruf pertama ikatan protein yang berwarna hijau dan tekan ‘Shift’ pada keyboard lalu tarik kursor hingga ke ujung huruf hijau lagi. Perlu diperhatikan bahwa ikatan protein yang dimaksud adalah deretan huruf tanpa spasi dan berwarna hijau, karena terdapat beberapa huruf yang berwarna hijau tetapi memiliki spasi merupakan susunan ligand lain dan bukan protein. Serta juga terdapat susunan angka ‘0’ tanpa spasi, akan tetapi berwarna merah merupakan struktur molekul air dan bukan bagian dari ikatan protein.



Gambar 96. Tahap Pemotongan Protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Kemudian pada kotak “sele” klik menu “A” lalu pilih opsi “copy to object” untuk menduplikasi senyawa yang dipotong



Gambar 97. Duplikasi senyawa protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

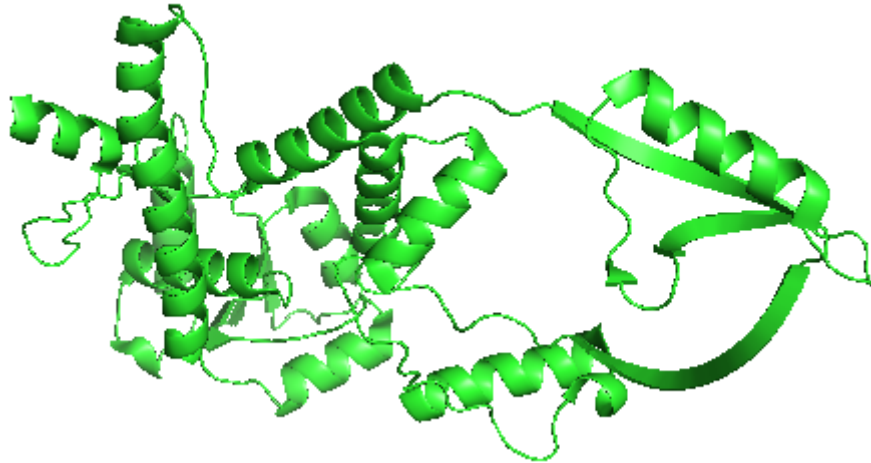
Setelah diduplikasi, maka pada kotak “obj01” klik menu “A” lalu pilih opsi “Rename object” untuk mengganti nama senyawa yang sudah dipisahkan dari ikatan selain protein.



Gambar 98. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

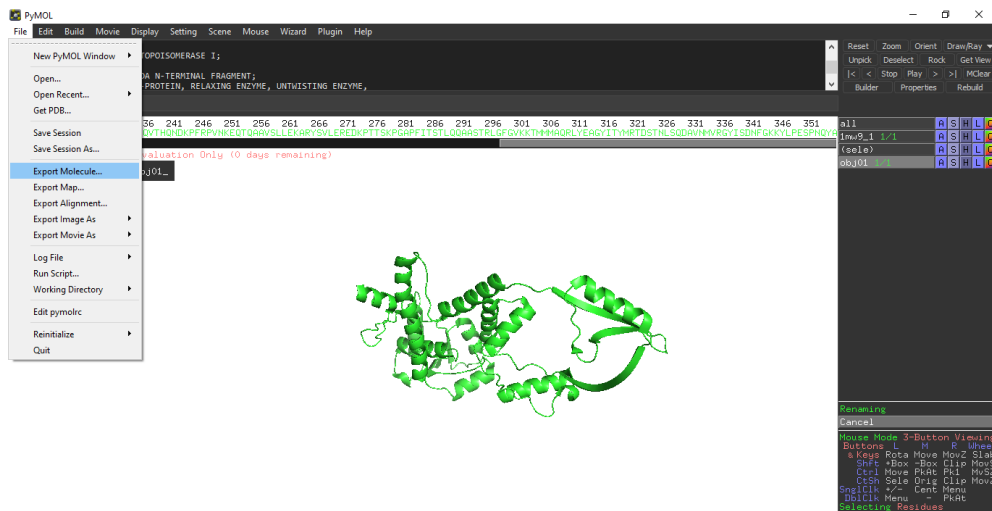
Langkah selanjutnya klik kotak nama senyawa yang diunduh dan kotak sele sehingga akan muncul bentuk DNA Topoisomerase yang telah bersih dari ikatan selain protein.



Gambar 99. Tampilan senyawa DNA Topoisomerase setelah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

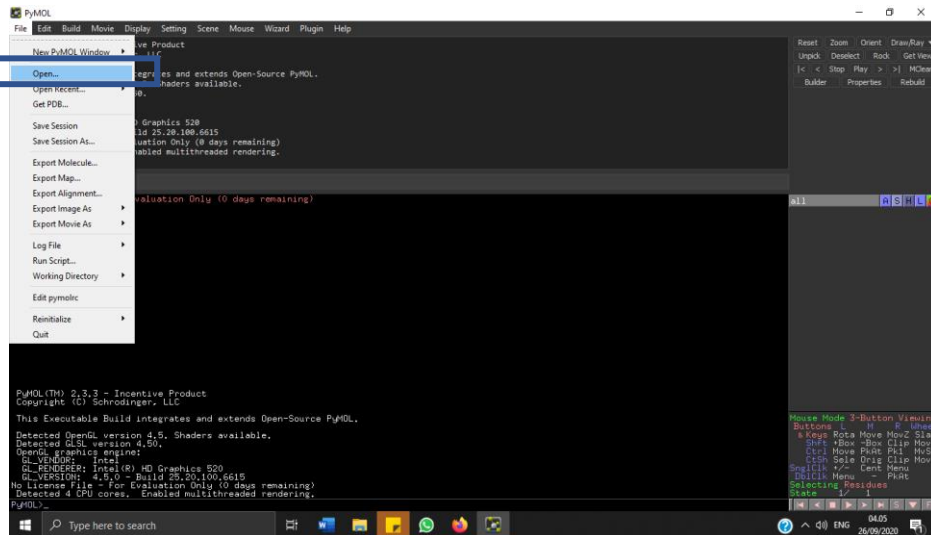
Setelah didapat senyawa protein bersih maka disimpan dengan cara klik menu “File” lalu pilih export molecule lalu klik save. Setelah mengklik save, maka akan muncul tampilan lebih rinci mengenai penyimpanannya. Simpan dengan format PDB dengan nama yang diinginkan.



Gambar 100. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

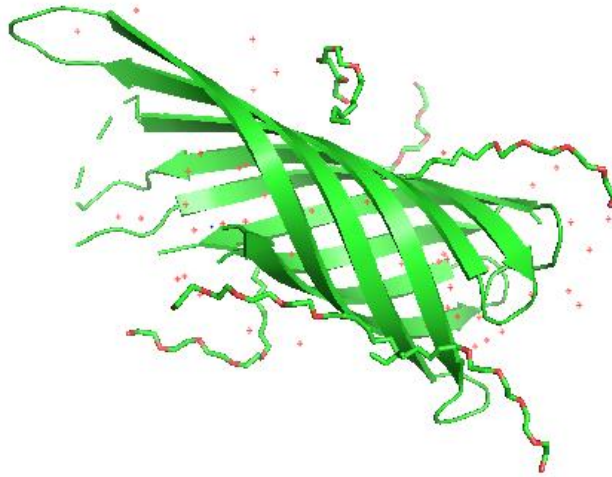
4. Outer Membran



Gambar 101. Buka File Outer membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

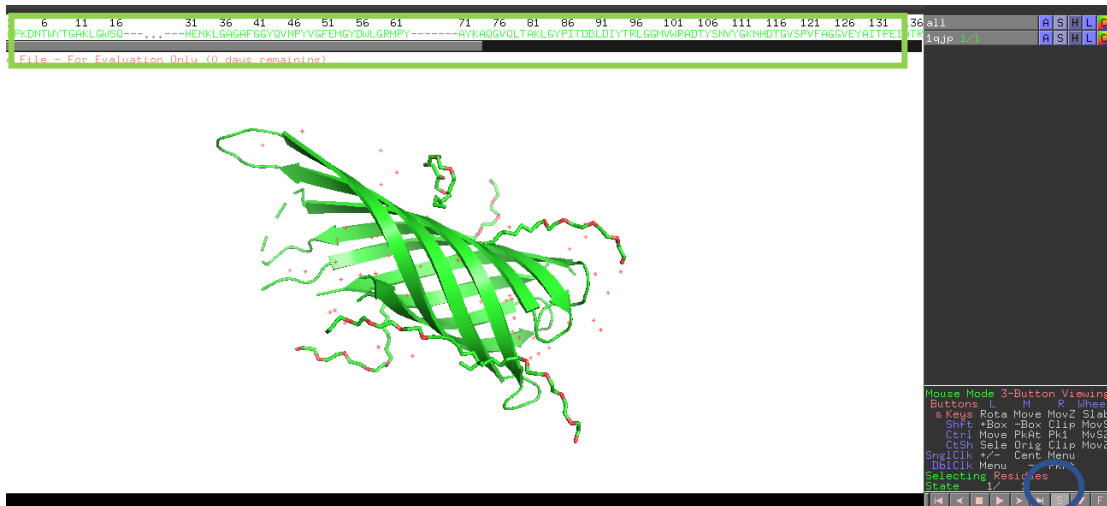
Setelah dibuka aplikasi Pymol, klik file kemudian open lalu pilih senyawa DHPS yang sebelumnya telah diunduh dari server PDB.



Gambar 102. Struktur 3D senyawa Outer membran

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

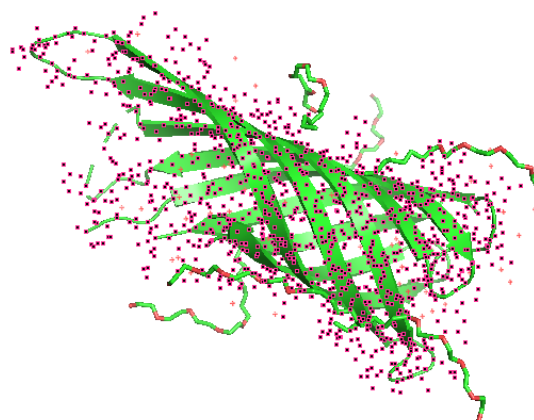
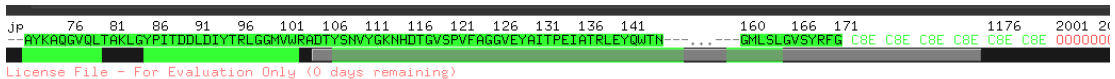
Struktur yang diunduh masih memiliki ikatan selain protein, hal ini akan mempengaruhi hasil ”docking nanti”. Oleh karena itu perlu dipotong ikatan selain protein dengan ikatan protein dari Outer membran. Caranya yang pertama dengan klik menu “S” yang berada di pojok kanan bawah aplikasi PyMol. Dengan mengklik menu “S” maka akan muncul kode ikatan protein pada bagian atas senyawa Outer membran.



Gambar 103. Pemilihan ikatan protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

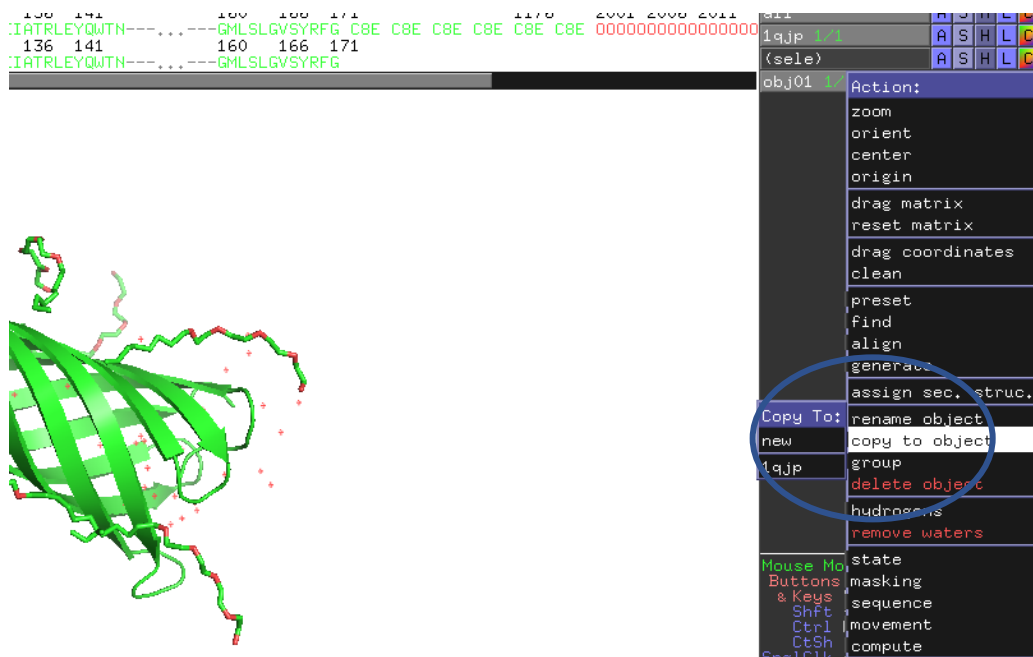
Selanjutnya, klik pada huruf pertama ikatan protein yang berwarna hijau dan tekan 'Shift' pada keyboard lalu tarik kursor hingga ke ujung huruf hijau lagi. Perlu diperhatikan bahwa ikatan protein yang dimaksud adalah deretan huruf tanpa spasi dan berwarna hijau, karena terdapat beberapa huruf yang berwarna hijau tetapi memiliki spasi merupakan susunan ligand lain dan bukan protein. Serta juga terdapat susunan angka '0' tanpa spasi, akan tetapi berwarna merah merupakan struktur molekul air dan bukan bagian dari ikatan protein.



Gambar 104. Tahap Pematangan Protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Kemudian pada kotak “sele” klik menu “A” lalu pilih opsi “copy to object” untuk menduplikasi senyawa yang dipotong



Gambar 105. Duplikasi senyawa protein

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

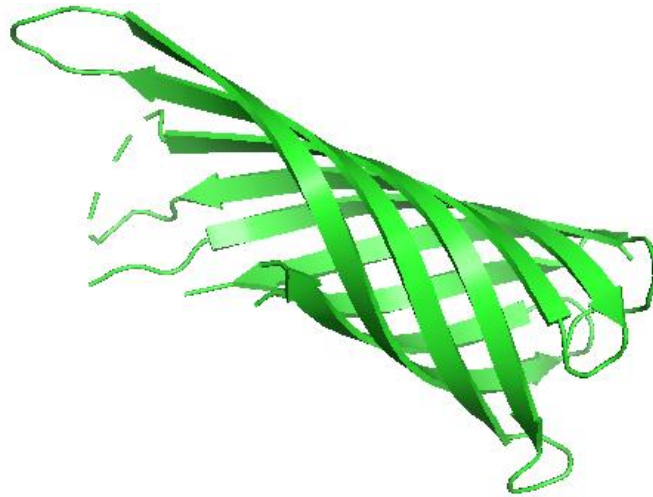
Setelah diduplikasi, maka pada kotak “obj01” klik menu “A” lalu pilih opsi “Rename object” untuk mengganti nama senyawa yang sudah dipisahkan dari ikatan selain protein.



Gambar 106. Penggantian nama senyawa protein yang telah dihilangkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

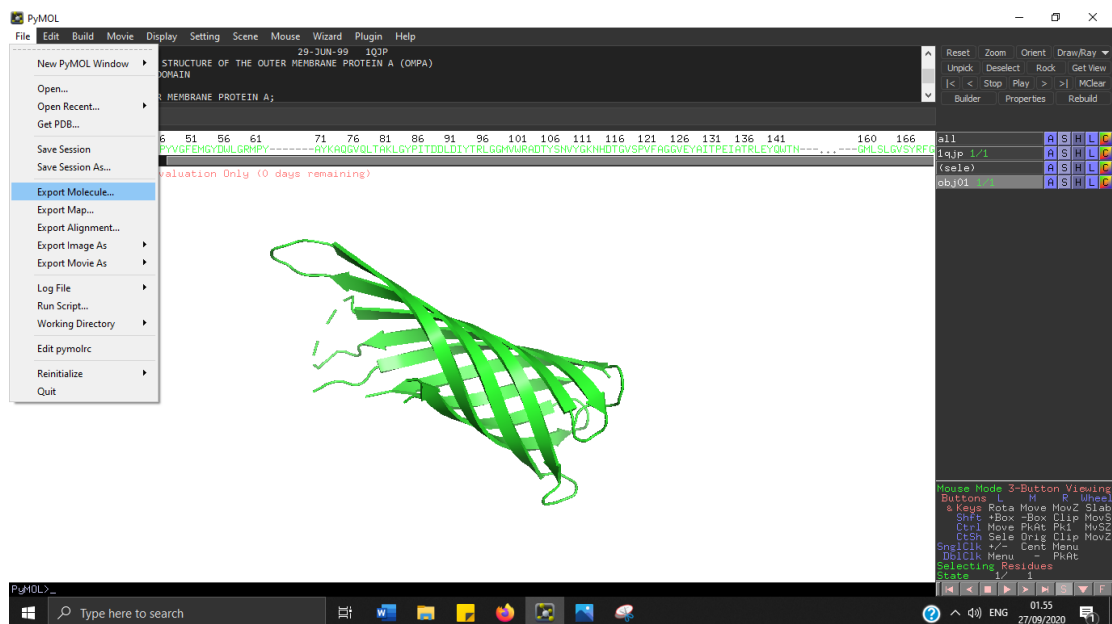
Langkah selanjutnya klik kotak nama senyawa yang diunduh dan kotak sele sehingga akan muncul bentuk Outer membran yang telah bersih dari ikatan selain protein.



Gambar 107. Tampilan senyawa Outer membran setelah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Setelah didapat senyawa protein bersih maka disimpan dengan cara klik menu “File” lalu pilih export molecule lalu klik save. Setelah mengklik save, maka akan muncul tampilan lebih rinci mengenai penyimpanannya. Simpan dengan format PDB dengan nama yang diinginkan.



Gambar 108. Penyimpanan senyawa protein yang sudah dibersihkan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Analisis Senyawa Dengan Teknik Reverse Docking

Penelitian berbasis *In Silico* dengan teknik *reverse docking* memiliki tujuan yaitu mereaksikan senyawa terhadap protein target untuk mengetahui aktivitas biologisnya melalui pengikatan site dari struktur 3 dimensi.

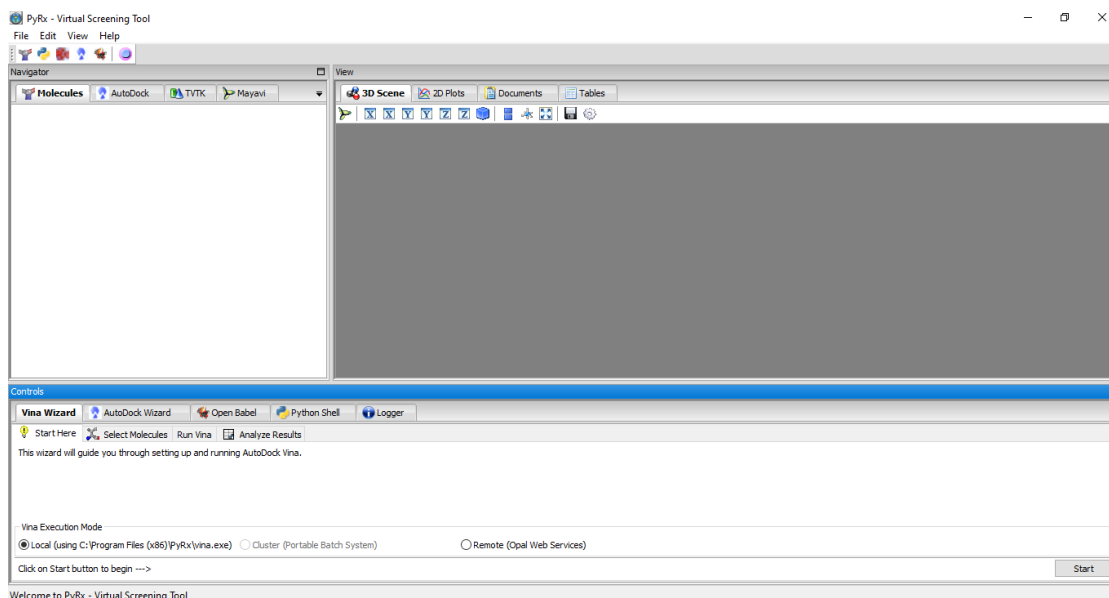
Kelebihan metode ini adalah:

- Presisi yang tinggi dan kualitas data eksperimen lebih baik;
- Dukungan yang lebih baik untuk penelitian data-intensif dan akses ke set yang besar, data yang dihasilkan dan dikumpulkan dari hasil eksperimen oleh komunitas para peneliti secara internasional;
- Simulasi lebih akurat dengan model yang lebih canggih;
- Penelitian lebih cepat secara eksperimen individual;
- Produktivitas kerja lebih tinggi.

Syarat untuk mendapatkan hasil analisis dari penelitian *In silico* ini, yaitu koleksi 3D senyawa (ligan), koleksi 3D protein target, *reverse docking* menggunakan PyRx dan analisis *reverse docking* menggunakan PyMol.

Struktur-struktur 3 dimensi ini yang akan dianalisis kekuatan afinitas pengikatannya bersama protein target. *Binding affinity* atau afinitas pengikatan adalah energi yang dibutuhkan senyawa untuk berikatan dengan protein target. Semakin rendah nilai afinitas pengikatan maka semakin besar pengikatan antara senyawa alami dengan senyawa target.

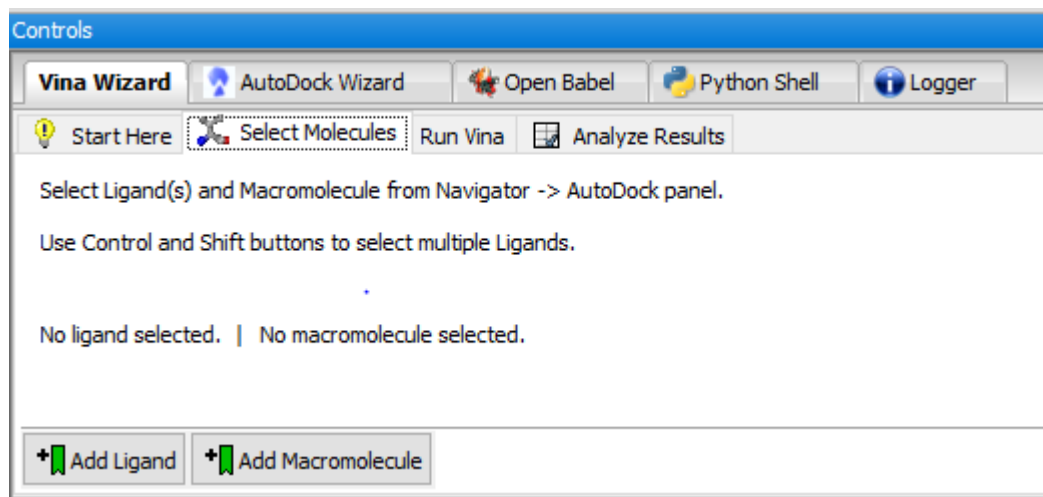
Sebagai contoh, *reverse docking* pada penelitian ini dicontohkan melalui *docking* antara senyawa endosimbion Oleamide dan Dibutyl phthlate dengan makromolekul DHPS yang telah dipreparasi. Langkah pertama, bukalah aplikasi Pyrx



Gambar 109. Tampilan awal PyRx

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

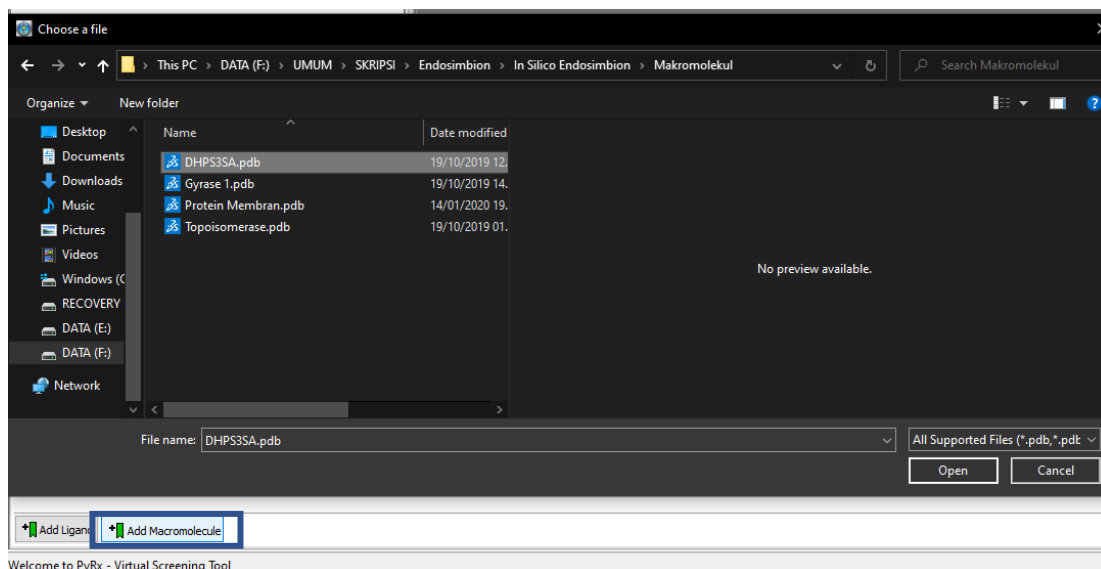
Pilih Vina Wizard untuk melakukan proses *docking* dengan Autodock Vina.



Gambar 110. Tampilan Vina Wizard PyRx

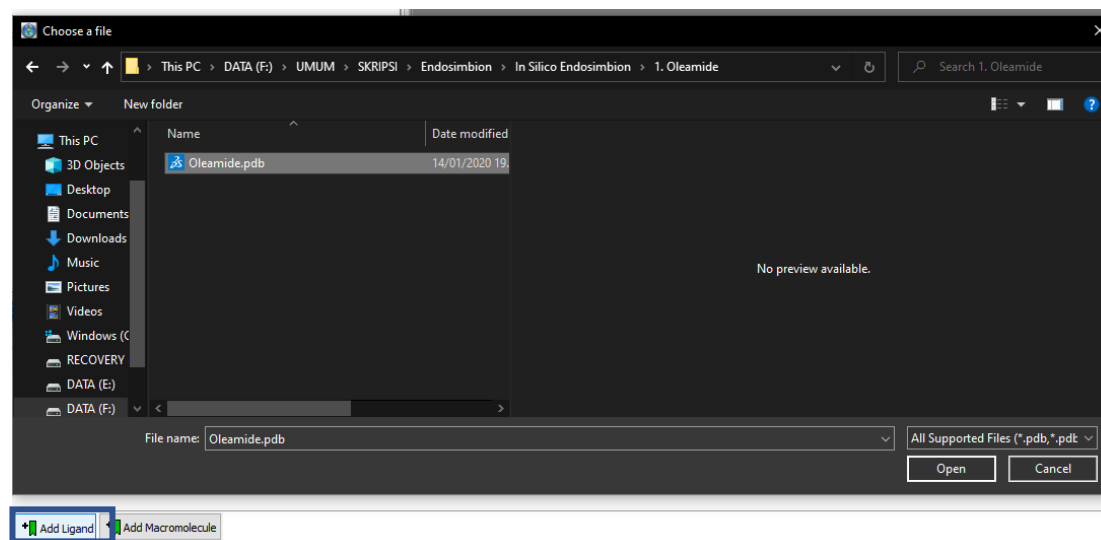
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Kemudian klik “Add Macromolecule” untuk menambahkan protein target yang diinginkan, setelah itu, klik “Add Ligand” untuk menambahkan senyawa yang akan didocking.



Gambar 111. Tampilan Penambahan Protein Target

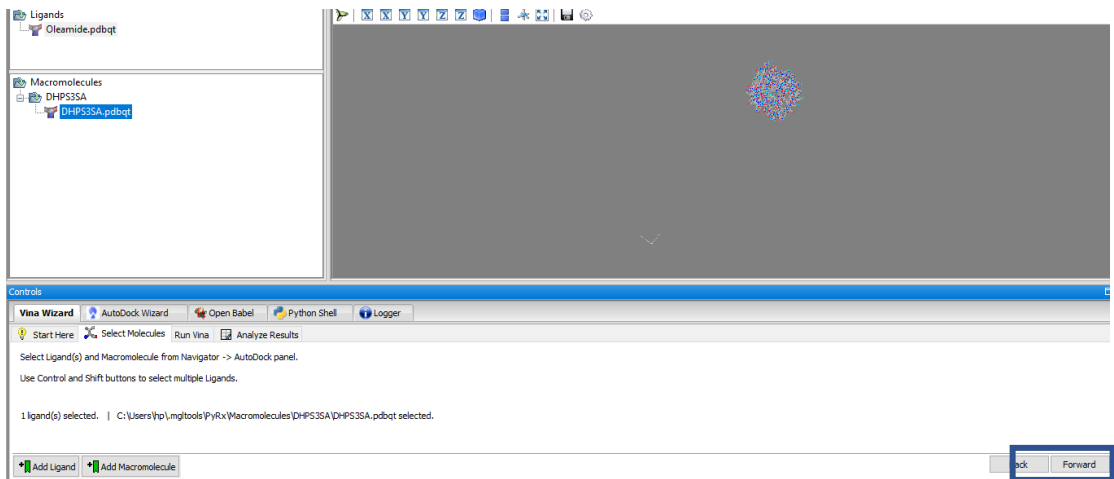
Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 112. Tampilan Penambahan Senyawa

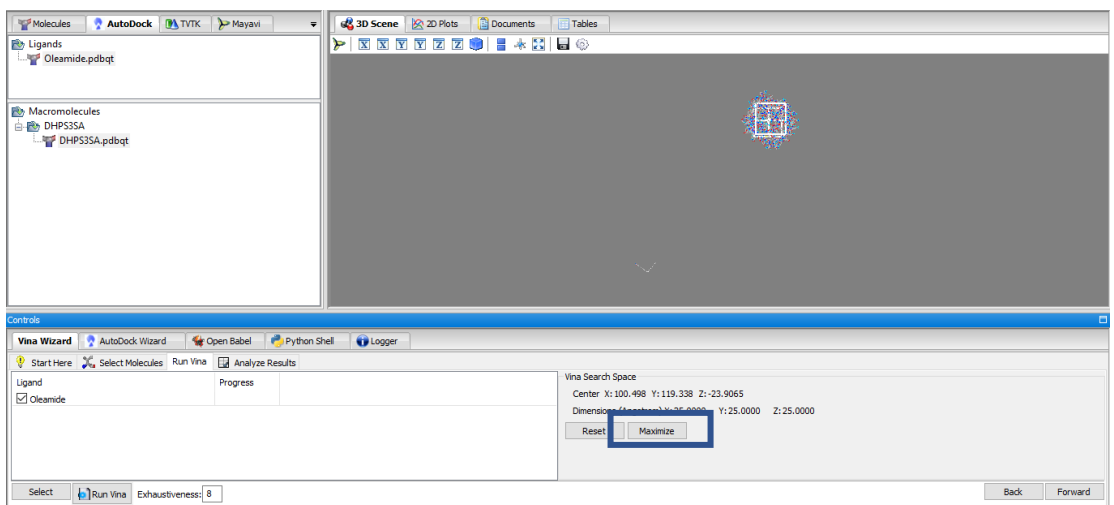
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Kemudian proses *docking* dimulai dengan mengklik Forward jika protein target dan ligan sudah dipilih. Kemudian klik Maximize dan Klik Forward lagi, Proses docking akan berjalan.



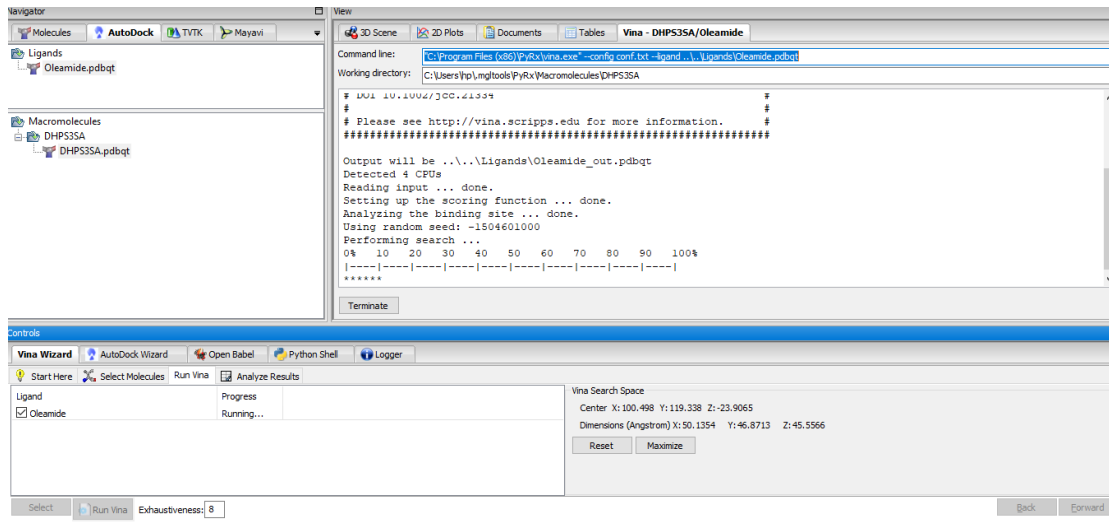
Gambar 113. Pilih Forward

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 114. Tampilan Pilih Maximize

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 115. Proses Reverse Docking sedang Berjalan

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Simpan struktur docking dan hasil docking pada icon sebelah kanan layar.

Ligand	Binding Affinity (kcal/mol)	Mode
DHPS3SA_Oleamide	-4.9	0
DHPS3SA_Oleamide	-4.8	1
DHPS3SA_Oleamide	-4.8	2
DHPS3SA_Oleamide	-4.7	3
DHPS3SA_Oleamide	-4.7	4

Gambar 116. Proses Reverse Docking selesai

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
	0.0	0.0
	19.43	21.899
	18.055	21.108
	21.218	23.925
	17.617	20.592

Gambar 117. Menyimpan struktur Docking

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Mode	RMSD lower bound	RMSD upper bound
0.0	0.0	0.0
19.43	21.899	21.899
18.055	21.108	21.108
21.218	23.925	23.925
17.617	20.592	20.592

Gambar 118. Menyimpan Hasil Docking (Binding Affinity)

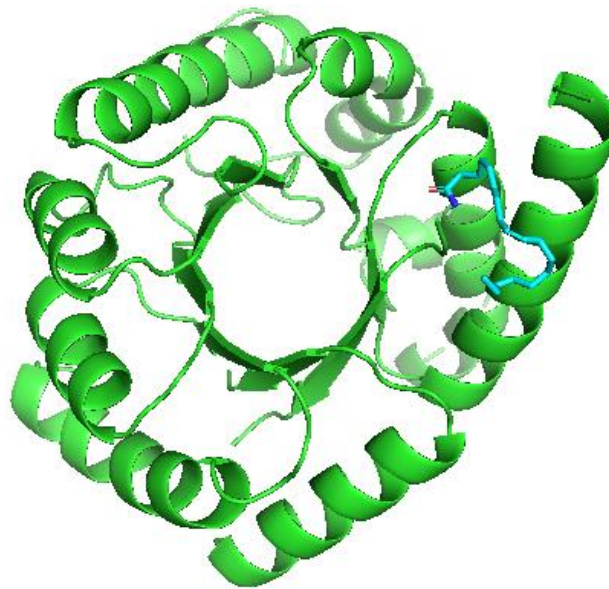
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Tabel 6. Hasil Molecular Docking

No	Senyawa	DHPS	Topoisomerase	Gyrase	Outer Membrane
1	Oleamide	-4,9	-5,4	-6,5	-5,2
2	Dibutyl phthalate	-4,9	-6,9	-5,5	-7,2
3	Sulfamethoxazole (Kontrol)	-6	-	-	-
4	Quinolone (Kontrol)	-	-9	-	-
5	Ciprofloxacin (Kontrol)	-	-	-8,3	-
6	Penicillins (Kontrol)	-	-	-	-8,2

Visualisasi Interaksi Antara Senyawa dengan Protein Target

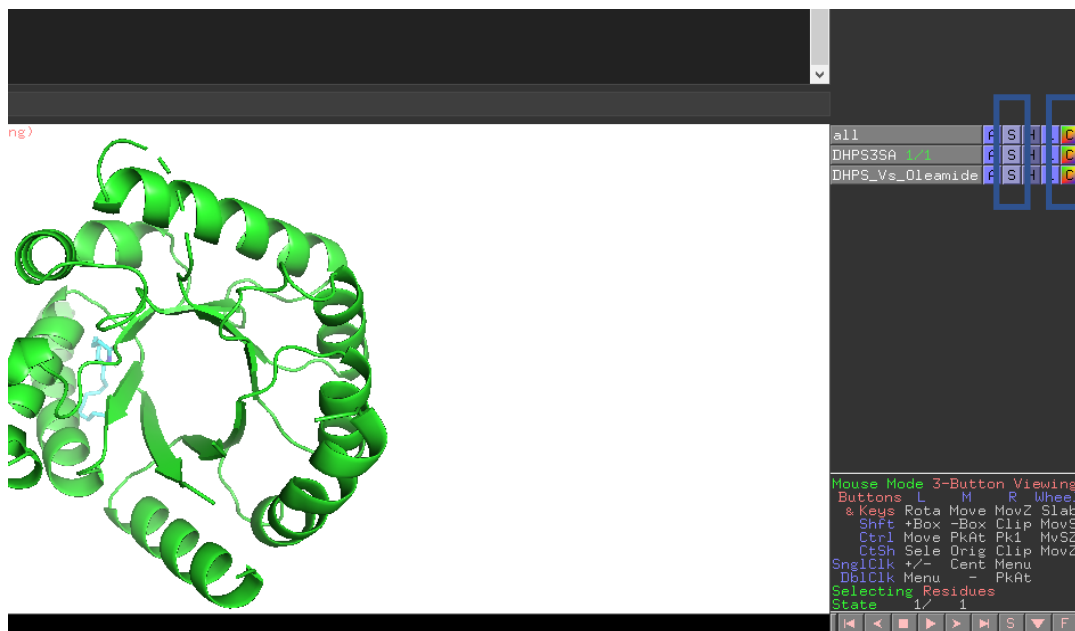
Visualisasi interaksi antara senyawa dengan protein target dilakukan dengan menggunakan aplikasi pymol untuk mengetahui posisi perlekatan antar senyawa. Semakin rendah nilai afinitas suatu senyawa maka semakin sedikit pula energi yang dibutuhkan untuk melakukan pengikatan. Hal ini tentu akan mempengaruhi posisi dari perlekatan, yaitu surface (permukaan). Semakin mudah senyawa berikatan dengan protein target, maka akan semakin kedalam tempat perlekatannya dan interaksi yang terjadi akan semakin kuat.



Gambar 121. Tampilan Hasil Docking pada Pymol

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

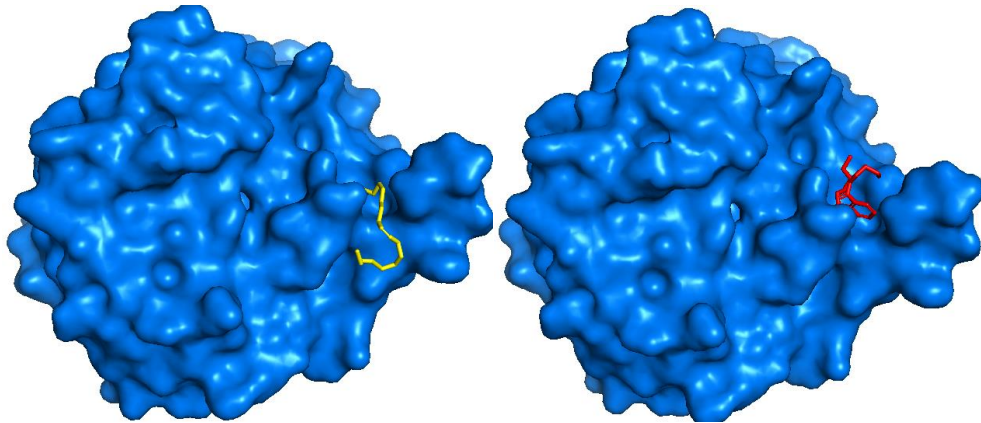
Klik S pada kanan layar untuk mengatur bentuk dari senyawa (ligan) dan protein target (Makromolekul) dan klok C untuk mengatur warna dari untuk mengatur warna dari senyawa (ligan) dan protein target (Makromolekul).



Gambar 122. Tampilan Visualisasi senyawa pada Pymol

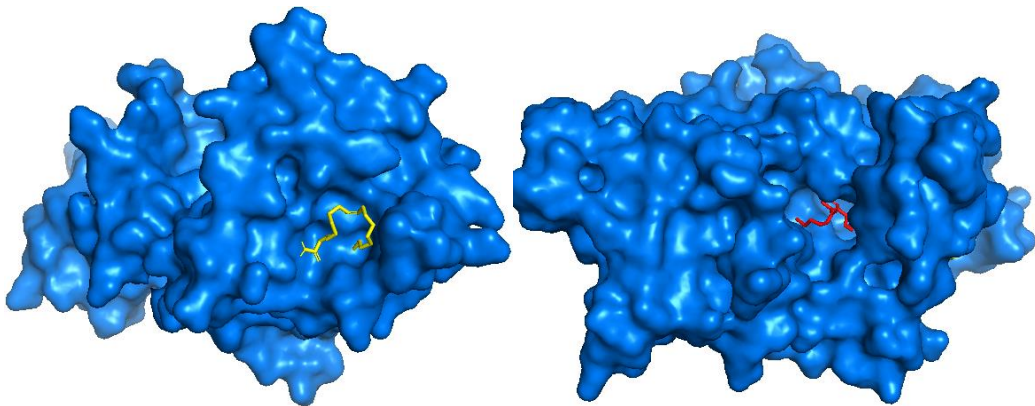
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Tampilan Hasil Visualisasi senyawa pada Pymol, Bentuk Protein target adalah Surface dengan warna biru



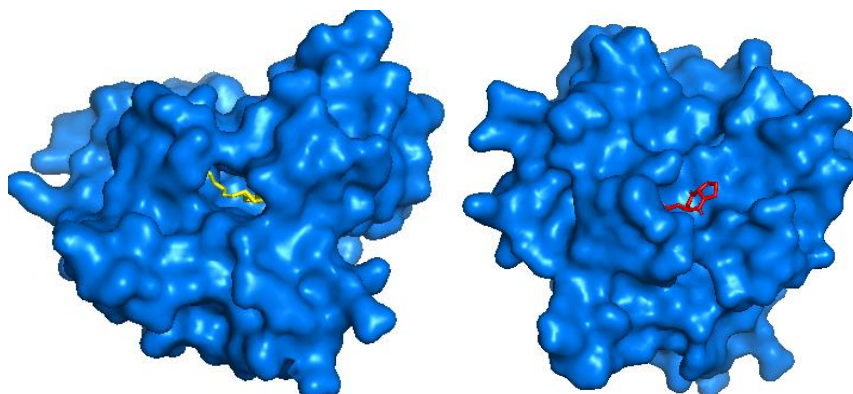
Gambar 123. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlate (merah) dengan Makromolekul DHPS (biru)

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



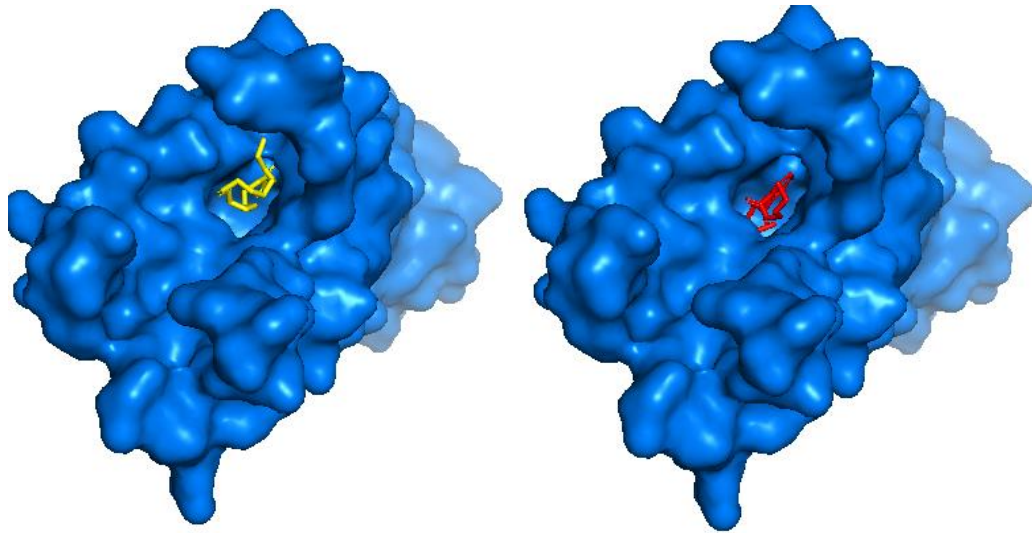
Gambar 124. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlate (merah) dengan Makromolekul Topoisomerase (biru)

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 125. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthlate (merah) dengan Makromolekul Gyrase (biru)

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

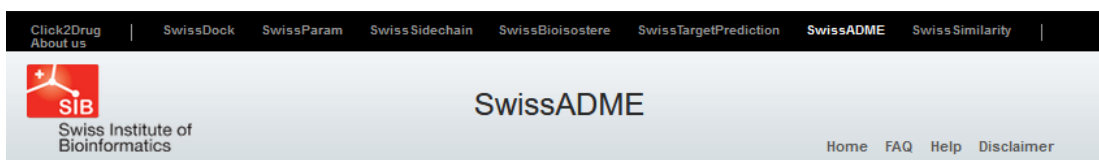


Gambar 126. Visualisasi interaksi Senyawa Oleamide (kuning) dan Dibutyl phthalate (merah) dengan Makromolekul Outer Membran (biru)

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Uji Fisikokimia Senyawa Kandidat Obat

Saat mendesain suatu senyawa untuk dijadikan kandidat obat, maka ada yang disebut dengan tes *Drug-likeness*. *Drug-likeness* adalah istilah yang digunakan untuk menjelaskan bagaimana sifat fisikokimia senyawa mempengaruhi sifat molekuler secara *in vivo*. Kebanyakan aturan untuk menguji drug likeness menggunakan sifat fisikokimia yang didapatkan dari struktur molekuler dan mencocokkan sifat tersebut dengan obat-obatan yang telah terdaftar. Tes *Drug-likeness* dari suatu senyawa dapat dilakukan di SwissADME yang dapat diakses di <http://www.swissadme.ch>. Ada dua cara untuk mendapatkan informasi *drug-likeness* dari senyawa yang diuji, yaitu dengan menggambar bentuk 2D molekul atau dengan menggunakan canonical SMILES dari senyawa tersebut. Setelah dimasukkan data baik bentuk 2D molekul atau Canonical SMILES dari senyawa klik “Run” untuk melihat hasilnya.



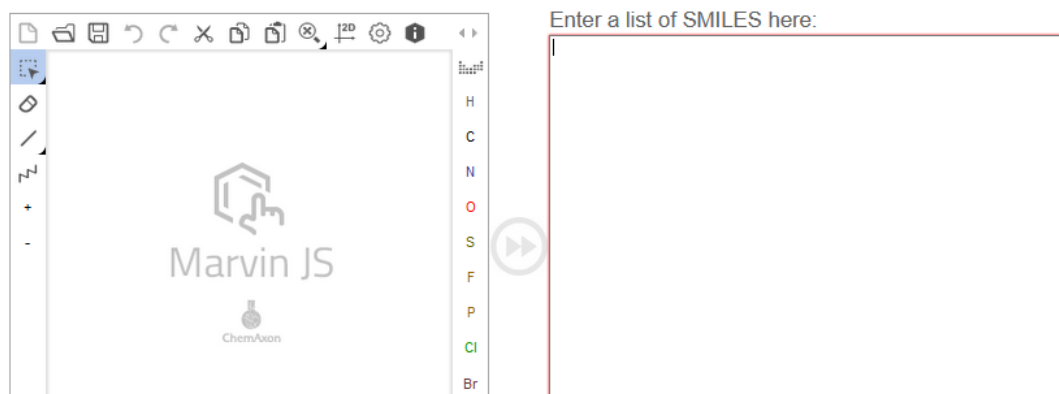
This website allows you to compute physicochemical descriptors as well as to predict ADME parameters, pharmacokinetic properties, druglike nature and medicinal chemistry friendliness of one or multiple small molecules to support drug discovery.

The main article describing the web service and its underlying methodologies is [SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci. Rep.* \(2017\) 7:42717.](#)

For details about development and validation of iLOG, please refer to this article: [iLOGP: a simple, robust, and efficient description of *n*-octanol/water partition coefficient for drug design using the GB/SA approach. *J. Chem. Inf. Model.* \(2014\) 54\(12\):3284-3301.](#)

For details about development and validation of the BOILED-Egg, please refer to this article: [A BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules. *ChemMedChem* \(2016\) 11\(11\):1117-1121.](#)

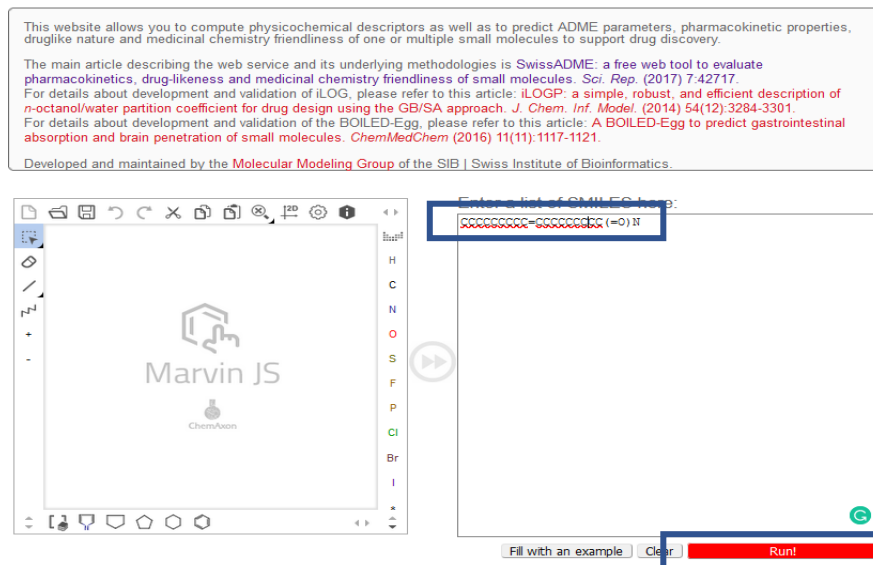
Developed and maintained by the [Molecular Modeling Group](#) of the SIB | Swiss Institute of Bioinformatics.



Gambar 127. Tampilan Awal SwissADME

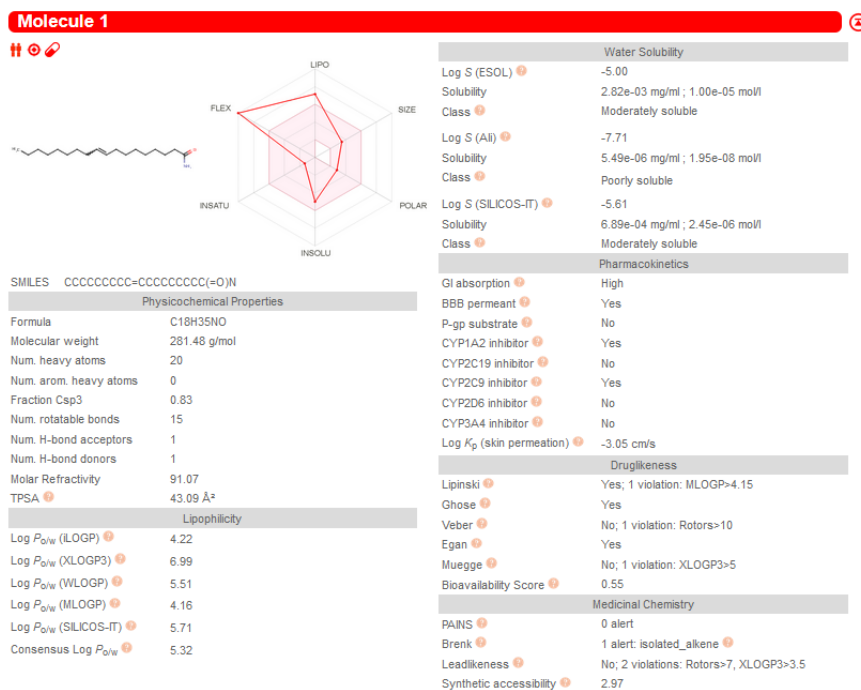
Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Masukkan Canonical Smile senyawa yang telah diperoleh pada halaman Pubchem, lalu klik Run



Gambar 128. Pilih Run setelah Memasukkan Canonical Smile senyawa

Sumber: (Dokumentasi pribadi)



Gambar 129. Hasil SwissADME

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Tabel 7. Hasil Uji Lipinski

Compound	MW	M Log P	NHA	NHD	NRB	TPSA	Nv
Oleamide	281.48 g/mol	4.16	1	1	15	43.09 Å ²	1
Dibutyl phthalate	278,34	3,43	4	0	10	52,6	0

*MW: Molecular Weight; M Log P: Calculated Lipophilicity; NHA: Number of Hydrogen Bond Acceptor; NHD: Number of Hydrogen Bond Donor; NRB: Number of Rotatable Bond; TPSA: Topological Polar Surface Area; Nv: Violations of Lipinski Rule

Salah satu aturan yang banyak digunakan dalam sifat fisikokimia obat/senyawa adalah aturan Lipinski, dimana suatu molekul harus memiliki berat ≤ 500 kDa, nilai $\text{LogP} \leq 5$, jumlah grup donor proton hidrogen ≤ 5 dan grup aseptor proton ≤ 10 . Kriteria tersebut mirip dengan kriteria senyawa dengan bioavailabilitas oral yang bagus. Aspek yang tidak dipenuhi oleh Oleamide yaitu grup aseptor proton yang melebihi nilai minimal. Berat molekul suatu senyawa menentukan kemudahan senyawa tersebut untuk dapat menembus sel dan digunakan dalam proses metabolisme. Jumlah donor dan aseptor proton hidrogen menunjukkan energi yang dibutuhkan tubuh untuk menyerap suatu senyawa. Secara umum aturan

Lipinski menggambarkan solubilitas senyawa tertentu untuk menembus membran sel oleh difusi pasif.

Uji ADME/TOX Senyawa Bakteri Endosimbion

ADME/TOX merupakan singkatan dari *Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination, dan Toxicity*. Uji ADME/TOX sangat penting untuk dilakukan agar suatu senyawa dapat dijadikan kandidat obat. Telah diperkirakan hampir 50% obat-obatan tidak efektif digunakan akibat kurangnya bioavailabilitas karena tidak mampu diserap usus dan terjadi gangguan metabolisme yang tidak diinginkan akibat adanya senyawa tersebut. 40% kandidat obat juga gagal dijadikan obat karena tidak aman. Oleh karena itu, Uji ADME/Tox sangat penting dalam mencari kandidat obat yang efektif untuk pengobatan,

Uji ADME/Tox dapat dilakukan dengan mengakses situs AdmetSAR di <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar1>. Setelah muncul halaman awal, pilih menu predict. Kemudian, masukkan canonical smiles senyawa dan klik predict untuk melihat hasilnya.



Gambar 130. Tampilan Awal SwissADME

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pilih Predict lalu Masukkan *Canonical smile* yang telah didapatkan pada laman pubchem.

Notice! New version of admetSAR - 2.0 is available: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2/>

A comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties

Home Search **Predict** About

Home

What is admetSAR ?

admetSAR provides the latest and most comprehensive manually curated data for diverse chemicals associated with known Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity profiles. admetSAR created a user-friendly interface to search for ADMET properties profiling by name, CASRN and similarity search. In addition, admetSAR can predict about 50 ADMET endpoints by our recently development chemoinformatics-based toolbox, entitled ADMET-Simulator which integrates high quality and predictive QSAR models. admetSAR will be helpful for *in silico* screening ADMET profiles of drug candidates and environmental chemicals.

Main Features of admetSAR

✓ **Absorption**
 Human Intestinal Absorption (HIA)
 Human Oral Bioavailability (HOB)
 Blood-Brain Barrier (BBB) Penetration
 Caco-2 Permeability
 ↳ Transporter
 P-glycoprotein Substrate, Inhibitor, etc...
 Renal Organic Cation Transporter (OCT2/SLC22A2)

✓ **Distribution**
 Plasma Protein Binding (PPB)

News & Updates

- October 23, 2012, The paper of admetSAR was published by J. Chem. Inf. Model. selected as the hot paper of JCI in Dec. 2012 (2012, 52(11): 3099-3105).
- October 2, 2012, New computational methodologies and high predictive models were published for chemical mutagenicity prediction (J. Chem. Inf. Model. 2012, 52(11): 2840-2847.)
- June 30, 2012, A comprehensive drug side effects database, namely MetaADEDB v1.0 was released.
- March 21, 2012, The admetSAR v1.0 was released.
- New modeling methods and high predictive models were reported for chemical hindrance prediction (J. Chem.

Gambar 131. Tampilan SwissADME

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Pilih predict

Notice! New version of admetSAR - 2.0 is available: <http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSAR2/>

A comprehensive source and free tool for evaluating chemical ADMET properties

Home Search **Predict** About

Predict

Models

Blood-Brain Barrier

Model	A_BBB_I		
Desc.	The entire dataset were collected from Shen's work, which included 1839 compounds (1438 BBB+ and 401 BBB- compounds).		
Q	0.9429	SE	0.9861
SP	0.788	AUC	0.9517

[Reference](#)

Input SMILES Here

SMILES:

Predict ADMET Properties

Prediction of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity Profiles for drug candidates and environmental chemicals plays an important role in drug discovery and environmental hazard assessment. Herein, we developed a chemoinformatics-based web server by integrating 50 high quality QSAR models for chemical ADMET profiling.

Regression Models

- Caco-2 Permeability --- R_A_Caco2_I
- Aqueous solubility --- R_A_WS_I
- Fish Toxicity --- R_T_FHMT_I
- Rat Acute Toxicity --- R_T_RAT_I
- Tetrahymena Pyriformis Toxicity --- R_T_TPT_I

Gambar 132. Tampilan Predict SwissADME

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Blood-Brain Barrier			
Model	A_BBB_I		
Desc.	The entire dataset were collected from Shen's work, which included 1839 compounds (1438 BBB+ and 401 BBB- compounds).		
Q	0.9429	SE	0.9861
SP	0.788	AUC	0.9517
Reference			

Results		
ADMET Predicted Profile --- Classification		
Model	Result	Probability
Absorption		
Blood-Brain Barrier	BBB+	0.9972
Human Intestinal Absorption	HIA+	1.0000
Caco-2 Permeability	Caco2+	0.6255
P-glycoprotein Substrate	Non-substrate	0.6264
P-glycoprotein Inhibitor	Non-inhibitor	0.7291
Renal Organic Cation Transporter	Non-inhibitor	0.9452
Distribution		
Subcellular localization	Lysosome	0.4638
Metabolism		
CYP450 2C9 Substrate	Non-substrate	0.8241
CYP450 2D6 Substrate	Non-substrate	0.7486
CYP450 3A4 Substrate	Non-substrate	0.6255
CYP450 1A2 Inhibitor	Inhibitor	0.9107
CYP450 2C9 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9071
CYP450 2D6 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9231
CYP450 2C19 Inhibitor	Non-inhibitor	0.8650
CYP450 3A4 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9101
CYP Inhibitory Promiscuity	Low CYP Inhibitory Promiscuity	0.7462
Excretion		
Toxicity		

Gambar 133. Hasil SwissADME

Sumber: (Dokumentasi pribadi)

Adapun data hasil uji ADME/Tox dari senyawa *Oleamide dan Dibutyl phthlate* adalah sebagai berikut:

Tabel 8. Hasil Uji ADME/TOX Oleamide dan Dibutyl phthlate

Model	Oleamide		Dibutyl phthlate	
	Hasil	Probabilitas	Hasil	Probabilitas
Absorpsi				
Blood-Brain Barrier	BBB+	0.9972	BBB+	0.9396
Human Intestinal Absorption	HIA+	1.0000	HIA+	0.9790
Caco-2 Permeability	Caco2+	0.6255	Caco2+	0.7253
P-glycoprotein Substrate	Non-substrate	0.6264	Non-substrate	0.5477
P-glycoprotein Inhibitor	Non-inhibitor	0.7291	Non-inhibitor	0.7907
	Non-inhibitor	0.9452	Non-inhibitor	0.9557

Renal Organic Cation Transporter	Non-inhibitor	0.8756	Non-inhibitor	0.8493
Distribusi				
Lokasi subseluler	Lysosome	0.4638	Mitokondria	0.8874
Metabolisme				
CYP450 2C9 Substrate	Non-substrate	0.8241	Non-substrate	0.8402
CYP450 2D6 Substrate	Non-substrate	0.7486	Non-substrate	0.8741
CYP450 3A4 Substrate	Non-substrate	0.6255	Non-substrate	0.6234
CYP450 1A2 Inhibitor	Inhibitor	0.9107	Inhibitor	0.6309
CYP450 2C9 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9071	Non-inhibitor	0.6948
CYP450 2D6 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9231	Non-inhibitor	0.8947
CYP450 2C19 Inhibitor	Non-inhibitor	0.8650	Non-inhibitor	0.5341
CYP450 3A4 Inhibitor	Non-inhibitor	0.9101	Non-inhibitor	0.9087
CYP Inhibitory Promiscuity	Low CYP Inhibitory Promiscuity	0.7462	Low CYP Inhibitory Promiscuity	0.6851
Toksisitas				

Human Ether-a-go-go-Related Gene Inhibition	Weak inhibitor	0.9685	Weak inhibitor	0.9412
	Non-inhibitor	0.8939	Non-inhibitor	0.9260
AMES Toxicity	Non AMES toxic	0.9131	Non AMES toxic	0.9133
Carcinogens	Non-carcinogens	0.7076	Non-carcinogens	0.7325
Fish Toxicity	High FHMT	0.6884	High FHMT	0.9683
Tetrahymena Pyriformis Toxicity	High TPT	0.9785	High TPT	0.9978
Honey Bee Toxicity	Low HBT	0.6230	High HBT	0.5568
Biodegradation	Not ready biodegradable	0.6251	Ready biodegradable	0.8752
Acute Oral Toxicity	III	0.6537	IV	0.6453
Carcinogenicity (Three-class)	Non-required	0.6608	Warning	0.5214
	nilai	unit	nilai	unit
Rat Acute Toxicity	2.0712	LD50, mol/kg	1.5386	LD50, mol/kg

Fish Toxicity	1.0950	pLC50, mg/L	0.1252	pLC50, mg/L
Tetrahymena Pyriformis Toxicity	0.2431	pIGC50, ug/L	1.3204	pIGC50, ug/L

1. Absorpsi

Jalur utama suatu obat dapat diserap tubuh yaitu melalui sistem gastrointestinal dan kulit. Penyerapan obat dapat terjadi di tempat lain tergantung dari mana obat tersebut diberi pada manusia. Molekul obat yang ideal harus mampu diserap dengan cepat sesuai dosis yang diberikan dengan efek yang minimal. Suatu obat harus mampu melewati membran sel usus melalui difusi pasif, difusi terfasilitasi, atau transpor aktif agar dapat menuju sistem sistem sirkulasi. Sel Caco-2 merupakan sel yang berasal dari kanker kolon manusia dan banyak digunakan sebagai model eksperimen in vitro untuk memahami mekanisme penyerapan usus manusia. Sel Caco-2 mampu mengekspresikan transporter untuk senyawa gula, protein dan sistem transport obat-obatan pada usus manusia. Berdasarkan hasil uji, dua senyawa bakteri endosimbion positif dalam uji Human Intestinal Absorption dan Caco2 permeability. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa tersebut mampu diserap oleh tubuh.

Penetrasi senyawa obat pada otak berbeda dari organ lain. Di otak, terdapat dinding pemisah antara otak dan darah yang disebut dengan *Blood-Brain Barrier (BBB)*. Suatu senyawa harus mampu melewati dinding pemisah tersebut melalui difusi. Oleh karena itu, kemampuan obat untuk masuk melewati BBB penting dalam desain kandidat obat. Diperlukan kemampuan penetrasi yang besar untuk obat-obatan yang aktif di sistem saraf pusat manusia. Obat-obatan seperti anribiotik penisilin memiliki efek pada sistem saraf. Dua senyawa bakteri endosimbion positif dalam tes *Blood-Brain Barrier*, artinya mampu untuk berpenetrasi masuk ke dalam sistem saraf pusat manusia.

Ginjal merupakan organ utama pembuangan obat-obatan dan hasil metabolitnya dari tubuh manusia. *Renal drug transporter*, yang ditemukan di

tubulus proksimal berperan penting dalam sekresi dan reabsorpsi senyawa obat di ginjal. Senyawa yang bersifat inhibitor terhadap renal drug transporter akan menghambat sekresi obat di tubulus. Hal ini akan meningkatkan konsentrasi obat dalam plasma darah sehingga mengubah respon farmakologis dan toksikologi tubuh. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut akan mengakibatkan terjadinya akumulasi senyawa obat di ginjal yang dapat berakibat kerusakan pada ginjal tersebut. Data menunjukkan bahwa dua senyawa bakteri endosimbion bersifat non-inhibitor terhadap *Renal Organic Cation Transporter*, sehingga tidak menghambat proses sekresi dari *Renal Organic Transporter* ginjal.

P-glycoprotein (PGP) merupakan salah satu superfamili dari *ATA-Binding cassette transporter*, dikenal karena ditemukan dalam resistensi multidrug pada kemoterapi. Transporter ini mencegah akumulasi dan efek sitotoksik dari obat kanker dengan mengeluarkannya dari membran sel sebelum obat tersebut masuk ke dalam intraseluler. PGP banyak ditemukan dalam jaringan manusia. Karena sifatnya yang tersebar luas, maka fungsinya juga berbeda di tiap jaringan. PGP memegang peranan penting dalam bagaimana suatu obat diserap, didistribusikan, dan dikeluarkan dari dalam tubuh. Contohnya, jika suatu obat merupakan substrat PGP di saluran gastrointestinal, maka penyerapan obat akan terganggu, sebaliknya, jika suatu obat merupakan substrat pada tubulus ginjal, maka akan membantu dalam sekresi obat pada urin. Berdasarkan hasil uji ADME/TOX, dua senyawa bakteri endosimbion tidak berperan sebagai substrat ataupun inhibitor dari p-glycoprotein. Namun karena belum diketahui dimana lokasi senyawa tersebut menjadi substrat ataupun inhibitor, maka belum diketahui dengan jelas efeknya pada tubuh.

2. Distribusi

Setelah diserap tubuh, molekul obat akan menuju sel dan masuk ke lokasi intraseluler yang menjadi targetnya. Ada yang masuk ke dalam mitokondria, lisosom, retikulum endoplasma, dan lain-lain. Berdasarkan hasil uji, dua senyawa bakteri endosimbion memiliki lokasi intraseluler yang berbeda. Yaitu Oleamide di lisosim dan Dibutyl phthlate di mitokondria.

3. Metabolisme

Eliminasi senyawa obat dari dalam tubuh merupakan proses *irreversible*. Ada dua jalur eliminasi senyawa obat dari dalam tubuh yaitu dari ekskresi yang dilakukan oleh ginjal dan melalui metabolisme (biotransformasi). Metabolisme melibatkan enzim untuk mengubah obat, dan proses kimiawi yang mengubah senyawa obat tersebut menjadi suatu metabolit. Senyawa xenobiotik yang terlalu *lipophilic* tidak bisa langsung diekskresikan oleh ginjal sehingga diperlukan metabolisme untuk mengubah senyawa obat tersebut menjadi lebih hidrofilik sehingga dapat dikeluarkan melalui ginjal atau direabsorpsi kembali menuju sistem sirkulasi.

Sitokrom P450s (CYPS) merupakan anggota enzim monooxygenase yang mengkatalisis metabolisme senyawa dari luar maupun dalam tubuh, termasuk xenobiotik, obat-obatan, steroid, dan asam lemak. Beberapa jenis isoenzim CYPs yang banyak terlibat dalam tubuh manusia yaitu CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 DAN CYP3A4. CYP3A4 banyak terdapat di hati dan usus dan memproses lebih dari 50% jenis obat-obatan yang beredar (Zhou, 2008).

Interaksi obat-obatan yang melibatkan enzim CYP berasal dari penggunaan obat-obatan secara bersamaan, dimana salah satu obat berperan sebagai substrat isoenzim dan obat lainnya yang memiliki jalur metabolisme yang sama tetapi berperan sebagai *inducer* atau *inhibitor* isoenzim yang bekerja. Beberapa obat-obatan merupakan substrat bagi suatu isoenzim dan inhibitor untuk enzim lainnya, yang membuat interaksi antar obat-obatan semakin kompleks. Obat-obatan yang tergolong sebagai *inducer* enzim CYP merupakan obat-obatan yang dapat meningkatkan sintesis enzim dan aktivitasnya sedangkan obat-obatan yang tergolong inhibitor enzim CYP merupakan obat-obatan yang dapat menghambat metabolisme obat yang menjadi substrat sehingga meningkatkan resiko toksisitas. Dari hasil uji ADME/TOX, senyawa Oleamide dan dibutyl phthalate merupakan inhibitor untuk isoenzim 1A2.

4. Toksisitas

The human Ether-a-go-go Related Gene (hERG, KCNH2) merupakan gen yang mengkode pembentukan sub-unit α dari porin kanal potasium Kv11.1. tiap

kanal memiliki 4 a sub-unit, masing-masing dengan enam domain transmembran. Pada manusia, penghambatan hERG oleh obat-obatan dapat menyebabkan arrhythmia (detak jantung yang tidak beraturan). Dari hasil uji yang dilakukan, dua senyawa bakteri endosimbion bersifat inhibitor lemah terhadap hERG. Hal ini berarti bahwa dua senyawa ini dalam menghambat kinerja hERG lemah sehingga masih aman digunakan.

Zat karsinogen, atau zat yang dapat menyebabkan kanker, dapat dibagi menjadi dua yaitu zat karsinogen mutagenik dan non-mutagenik. Zat karsinogen yang bersifat mutagenik merupakan zat yang berpotensi menyebabkan mutasi pada DNA. Salah satu tujuan utama pencarian kandidat obat yaitu mengidentifikasi zat yang berpotensi menjadi zat karsinogen mutagenik dan non-mutagenik. Untuk uji zat karsinogen yang bersifat mutagen, digunakan uji AMES *toxicity*. Berdasarkan uji ADME/TOX, dua senyawa bakteri endosimbion bersifat non-AMES Toxic atau tidak menyebabkan mutasi DNA. Selain itu, senyawa tersebut tidak bersifat karsinogen sehingga tidak memicu kanker.

Acute oral toxicity adalah istilah untuk menjelaskan efek obat setelah pemberian selama 24 jam. Untuk uji secara akurat, diperlukan uji secara *in vivo*, akan tetapi, metode *in vivo* sangat rumit, mahal dan memakan waktu. Oleh karena itu, dikembangkan metode *in silico* sebagai alternatif. Untuk kriteria *Acute Oral Toxicity*, lembaga EPA (*Environmental Protection Agency*) Amerika Serikat mengkategorikannya dalam empat kategori berdasarkan *median lethal dose* (LD50) atau *median lethal concentration* (LC50).

Tabel 9. Kategori Toksisitas Berdasarkan EPA Amerika Serikat

<i>Acute toxicity</i>	Kategori			
	I (sangat beracun)	II (Beracun)	III (sedikit beracun)	IV (tidak beracun)
Oral (mg/kg)	≤50	>50 ≤500	>500 ≤5000	>5000
Kulit (mg/kg)	≤200	>200 ≤2000	>2000 ≤5000	>5000

Berdasarkan hasil uji ADME/Tox, senyawa oleamide termasuk dalam kategori III, yaitu sedikit beracun, sedangkan senyawa dibutyl phthlate termasuk

dalam kategori IV, yaitu tidak beracun. Dengan demikian, dua senyawa bakteri endosimbion cukup aman untuk digunakan asalkan diperhatikan dosisnya apabila akan dilanjutkan pada tahap produksi.

REFERENSI

- Adzitey, F. 2015. Antibiotic Classes and Antibiotic Susceptibility of Bacterial Isolates from Selected Poultry; A Mini Review. *World's Veterinary Journal*. **5**, 36-41
- Amberg, A. 2013. In silico Methods. R&D DSAR Preclinical Safety, Sanofi Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Germany, Drug Discovery and *In silico* Techniques. *A Mini-Review*. 1273-1296
- Ansari, A. A. dan Saywack, P. 2011. Identification and Classification of Earthworm Species in Guyana. *International Journal of Zoological Research*. **7**: 93-99
- Aspe, N. M. and James, S.W. 2016. New species of Pheretima, Amynthes, Polypheretima, and Pithemera (Clitellata: Megascolecidae) from Mindanao and Associated Islands. *Philippines Zoological Studies*. **55**, 1-33
- Balouiri, M., Sadiki, M., and Ibsouda, S. K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. **6**(2). 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Baig, M.H., Ahmad, K., Adil, M., Khan, Z.A., Khan, M.I., Lohani, M., Khan, M.S. and Kamal, M.A. 2014. Drug Discovery and In Silico Techniques: A Mini-Review. *Enzyme Engineering*. 4(1): 1-3.
- Becton Dickinson. 2008. BD™ Tryptic Soy Broth (TSB). 1–4.
- Benfenati, E., Gini, G., Hoffmann, S., and Luttk, R. 2010. Comparing *In Vivo*, *In Vitro* and *In silico* Methods and Integrated Strategies for Chemical Assessment: Problems and Prospects. *ATLA*. **38**, 153–166
- Bleidorn, C., Helm, C., Weigert, A. and Aguado M. T. 2015. *Annelida*. 193-230. doi:10.1007/978-3-7091-1871-9
- Blouin, Hodson, M.E., Delgado, E.A., dkk. 2013. A review of earthworm impact on soil function and ecosystem services. *European Journal of Soil Science*. **64**, 161-182.

- Brito-vega, H. and Espinosa-victoria, D. 2009. Bacterial Diversity in the Digestive Tract of Earthworms (Oligochaeta). *Journal of Biological Science*. **9**, 192-199
- Byzov, B. A., Nechitaylo, T. Y., Bumazhkin, B. K., Kurakov, A. V., Golyshin, P. N. and Zvyagintsev, D. G. 2009. Culturable Microorganisms from the Earthworm Digestive Tract. *Mikrobiologiya*. **78**, 404-413 doi:10.1134/S0026261709030151
- CABI 2020 Invasive Species Compendium: *Lumbricus* sp. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109385>
- Cayot, A., Laroche, D., Disson-Dautriche, A., Arbault, A. Maillefert, J. F., Ornetti, P. 2014. Cytochrome P450 Interactions and Clinical Implication in Rheumatology. *Clinical Rheumatology*. **33**(5):1231-1238
- Cezur, S. dan Demiroz, A.P. 2013. Antibiotics and The Mechanisms of Resistance to Antibiotics. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences*. **21** (4) 138-142.
- Chanu, L. J. S. Hazarika, B.U. Choudhury, Ramesh T., Balusamy A., P. Moirangthem, A. Yumnam dan P. K. Sinha. 2018. A Guide to vermicomposting-production process and socio economic aspects. Extension Bulletin No. 81 ICAR Research Complex for NEH Region, Umiam-793 103, Meghalaya.
- Chikhale, H.U. 2020. Review on In-silico techniques: An approach to Drug discovery. *Current Trends in Pharmacy and Pharmaceutical Chemistry*. **2**(1): 24-32
- Crump, John A. 2019. Progress in Typhoid Fever Epidemiology. *Supplement Article*. 1-6
- Dalynn Biologicals. 2014. *Triple Sugar Iron Agar 1*
- Darmawan, A., Raffiudin, R. and Widarto, T. H. 2016. Morphological Characters and Histology of *Pheretima darnleiensis*. *Journal of Biosciences*. **19**, 44-48 doi:10.4308/hjb.19.1.44

- DeLeo, F., and Chambers, H. 2009. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* 119. 2464–2474
- Difco™ and BBL™ 2009 *MR-VP Medium • MR-VP Broth* Difco™ & BBL™ Manual 2nd Edition 1
- Dougan, G. dan Baker, S. 2014. *Salmonella Enterica* Serovar Typhi and the Pathogenesis of Typhoid Fever. *Annu. Rev. Microbiol.* 68: 317–36
- Etebu, E. and Arikekpar, I. 2016. Antibiotics : Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research.* 4, 90-101
- Eyler, R. F. and Shvets, K. 2019. Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology.* **14**, 1-11
doi:10.2215/CJN.08140718
- Faurle, Bertrand. 2019. *GRAM Staining Procedure.* 2–3
- Fernando, D.P., Arciniega, M., and Franco, J.L.M. 2018. Molecular docking: current advances and challenges. *Publicación Anticipada.* **1**, 1-23.
- Fishback, M.A., and Walsh, C.T. 2009. Antibiotics For Emerging Pathogens. *Science.* 325(5944): 1089-1093.
- Freeman, M.F., Gurgui, C., Helf, M.J., Morinaka, B.I., Uria, A.R., Oldham, N.J., Sahl, H.G., Matsunaga, S., Piel, J. 2012. Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides. *Science*, 338, 387–390.
- Geldenhuys, W.J., Gaasch Kevin E., Watson M., Allen David D., and Van der Schyf Cornelis J. 2006 . Optimizing The Use Of Open-Source Software Applications In Drug Discovery. *DDT.* 11 (2006):127-132.
- Ghai, S., Sood, S. S. and Jain, R. K. 2007. Antagonistic and antimicrobial activities of some bacterial isolates collected from soil samples. *Journal of Microbiology.* **47** 77.

Himedia 2018 *MR-VP Medium* (Glucose Phosphate Broth) 1

Hong, Y. and James, S. W. 2010. Six New Earthworms of the Genus *Pheretima* (Oligochaeta : Megascolecidae) from Balbalan-Balbalasang, Kalinga Province, the Philippines. *Zoological Studies*. **49**, 523-533X`

Huang, X.-P., Mangano, T., Hufeisen, S., Setola, V., dan Roth, B. L. 2010. Identification of Human Ether-à-go-go Related Gene Modulators by Three Screening Platforms in an Academic Drug-Discovery Setting. *ASSAY and Drug Development Technologies*, **8**(6), 727–742. doi:10.1089/adt.2010.0331

Husain D R, Fitriani, Hasyim Z, Abdullah A, and Sulfahri 2018 Endosymbiont Bacteria of *Pheretima* sp. Earthworms (Annelida: Oligochaeta) Possesses Antibacterial Activity *Asian Jr. of Microbiol. Biotech. Env. Sc.* **20** 4 1177-82

Jacob, J. 2015. Antibiotics approved for use in conventional poultry production. Available at: <http://www.extension.org/pages/66981/antibiotics-approved-for-use-in-conventional-poultryproduction#.ViZ2Z9LhBdg> accessed on 19/08/2019

Jumaa, S. and Karaman, R. 2015. Antibiotics. *Nova Science Publishers, Inc.* 41-73 doi:10.13140/RG.2.1.5114.4804

Kamdiem, M. M., Otomo, P. V., Ngakou, A. and Yanou, N. N. 2018. Distribution and diversity of earthworm (Annelida, Clitellata) populations across four land use types in northern. *Turkish Journal of Zoology*. **42**, 79-89 doi:10.3906/zoo-1704-52

Kapoor, G., Saigal, S. and Elongavan, A. 2019. Action and resistance mechanisms of antibiotics : A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. **33**, 300-305 doi:10.4103/joacp.JOACP

Kaushal J, Mehandia S, Singh G, Raina A, Arya S K 2018 *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **16** 1

- Khan, F. 2018. Antibiotics Classification and Visual Target Sites for Bacterial Inhibition. *Advances in Pharmacology and Clinical Trials*. **3**, 1-3
- Kırmusaoğlu, S., Gareayaghi, N. and Kocazeybek, B. S. Introductory Chapter : The Action Mechanisms of Antibiotics and Antibiotic Resistance. 1–9 DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85211>
- Kiyasudeen, K., Ibrahim, M.H., Quaik, S. dan Ismail, S.H. 2016. Prospects of Organic Waste Management and the Significance of Earthworms. *Springer*.
- Lay, B., 1994, Analisis Mikroba di Laboratorium, PT Raja Grafindo Persada, Jakarta
- Lewis, K. 2013. Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12: 371–387.
- Li, A. P., 2001. *Screening for Human ADME/TOX Drug Properties in Drug Discovery*. DDT. **6**(7):357-366
- Li, X., Chen, L., Cheng, F., Wu, Z., Bian, H., Xu, C., Li, W., Liu, G., Tang, Y., 2014. In Silico Prediction of Chemical Acute Oral Toxicity Using Multi-Classification Method. *Journal of Chemical Information and Modelling*. 54:1061-1069
- Li, X., Chen, L., Cheng, F., Wu, Z., Bian, H., Xu, C., Li, W., Liu, G., Tang, Y., 2014. In Silico Prediction of Chemical Acute Oral Toxicity Using Multi-Classification Method. *Journal of Chemical Information and Modelling*. 54:1061-1069
- Lin, J., Sahakian, D. C., Morais, S. M. F., Xu, J.J Polzer, R. J., Winter, S. M., 2003. The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and Toxicity in Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3:1125-1154
- Lin, J., Sahakian, D. C., Morais, S. M. F., Xu, J.J Polzer, R. J., Winter, S. M., 2003. The Role of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, and

Toxicity in Drug Discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*.
3:1125-1154

Liofilchem. 2017. Tryptic Soy Broth Casein Soya, and Bean Digest. 1-3

Lu, T. dan Deleo, F.R. 2016. Pathogenesis of *Staphylococcus aureus* in Humans.
National Institutes of Health, Hamilton, MT, USA.

Lund, M. B., Kjeldsen, K. U. And Schramm. 2014. The earthworm-
Verminephrobacter symbiosis: an emerging experimental system to study
extracellular symbiosis. *Mini review article*. **5**, 1–6

Macwilliams M P 2009 *Indole Test Protocol* American Society for Microbiology
1–9.

Mukesh, Bachwani and Kumar Rakhes. 2011. Molecular Docking. *A review*
International journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2(6): 1746-
1751.

Munita, J.M. dan Arias, C.A. 2017. *Mechanisms of Antibiotic Resistance*. American
Society for Microbiology Press.

NEL. 2016. Triple Sugar Iron Agar. Northeast Laboratory Services.

Northeast Laboratory Services (NEL). 2016. *Technical Product Information Triple*
Sugar Iron Agar. 1

Onkara *et al.* 2013. Molecular Docking Studies Synthesis and Anti-bacterial
Properties of new Mannich Bases. *International Journal of Pharma and*
Bio Science. 4(2): 263-270.

Palla, M. S., Guntuku, G. S., Muthyala, M. K. K., Pingali, S., & Sahu, P. K. 2018.
Isolation and molecular characterization of antifungal metabolite
producing actinomycete from mangrove soil. *Beni-Suef University Journal*
of Basic and Applied Sciences, 7(2), 250–256.
doi:10.1016/j.bjbas.2018.02.006

Parry, C.M., Thuy, C.T., Dongol, S., Karkey, A. Vinh, H., Chinh, N.T., Duy, P.T.,
Vu, T. Nga, T., Campbell, J.I. Hoang, N.V.M. Arjyal, A., Bhutta, Z.A.

- Bhattacharya, S.K., Agtini, M.D., Dong., B., Canh, D.G., Naheed, A., Wain, J., Hien, T.T., Basnyat, B., Ochiai, L., Clemens, J., Farrar, J.J., Dolecek, C., Baker, S. 2010. Suitable Disk Antimicrobial Susceptibility Breakpoints Defining *Salmonella Enterica* Serovar Typhi Isolates with Reduced Susceptibility to Fluoroquinolones. 5201-08
- Purschke, G. Bleidorn, C. and Struck, T. 2014. Evolution, Systematics and phylogeny of Annelida – a morphological perspective. *Memoirs of Museum Victoria*. 269, 247–269
- Remel. 2011. *Citrate agar (simmons)*. American Type Cultural Collection 1
- Richter K 2009 *Genetic Structure in European Populations of the Earthworms Lumbricus terrestris* Kassel University Press GMBH: Kassel
- Sanchez Sergio and Arnold L.Demain. 2015. *Antibiotics: Current Innovations and Future Trends*. Norfolk, UK : Caister Academic Press.
- Sandle, Tim. 2017. Gram’s Stain: History and Explanation of the Fundamental Technique of Determinative Bacteriology. *IST Science and Technology Journal*. 3-4
- Schumacher, A., Vranken, T., Malhotra, A. and Habibovic P. 2018. In vitro antimicrobial susceptibility testing methods: agar dilution to 3D tissue-engineered models. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 37:187–208 DOI 10.1007/s10096-017-3089-2
- Sharma, P.C., Jain, A., Jain, S. Pahwa, R., dan Yar, M.S. 2010. Ciprofloxacin: Review on Developments in Synthetic, Analytical, and Medicinal Aspects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 25(4): 577-589
- Shen, Y. 2014. Zoology in the Middle East Earthworms in Traditional Chinese Medicine. **51**, 37–41. doi:10.1080/09397140.2010.10638470
- Shields, P. and Cathcart, L. 2011. *Motility Test Medium Protocol*. American society for microbiology. 1
- Soares, G.M.S., Figueiredo, L.C., Faveri, M., Cortelli, S.C., Duarte, P.M., dan Feres, M. 2010. Mechanisms of action of systemic antibiotics used in

- periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci.* 20 (3): 295-309.
- Thakuria, D., Schmidt, O., Finan, D., Egan, D. and Doohan, F. M. 2009. Gut wall bacteria of earthworms : a natural selection process. *The ISME Journal.* **4**: 357–366
- Verma, Y. Kumar dan Verma, M. K. 2012. Earthworm-A Potential Source For Stable and Potent Antimicrobial Compounds Isolation and Purification Study. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* **4**: 540-543
- World Health Organization (WHO). 2014. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.*
- World Health Organization (WHO). 2014. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance.*
- World Health Organization (WHO). 2019. *Immunization, Vaccines and Biologicals Typhoid.*
- Yin, J. & Wang, J., 2016. Review:Renal Drug Transporters and Their Significance in Drug-Drug Interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **6**(5):363-373
- Yin, J. dan Wang, J., 2016. Review:Renal Drug Transporters and Their Significance in Drug-Drug Interactions. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* **6**(5):363-373
- Yu, D. K., 1999. Special Review: The Contribution of P-glycoprotein to Pharmacokinetic Drug-Drug Interaction. *J Clin Pharmacol.* 39: 1203-1211
- Yu, D. K., 1999. Special Review: The Contribution of P-glycoprotein to Pharmacokinetic Drug-Drug Interaction. *J Clin Pharmacol.* 39: 1203-1211
- Zhou, S. F., 2008. Drugs Behave as Substrates, Inhibitors, and Inducers of Human Cytochrome P450 3A4. *Current Drug Metabolism.* 9:310-322

Zuegg, Johannes and Matthew, A. 2012. CooperDrug-Likeness and Increased Hydrophobicity of Commercially Available Compound Libraries for Drug Screening. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 12. 1500-1513