

RINGKASAN (INTISARI)

Resistensi bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) terhadap sejumlah antibiotik memicu terjadinya perubahan substansial pada epidemiologi dan spektrum infeksi MRSA. Resistensi MRSA dikaitkan erat dengan keberadaan *Penicillin-Binding Protein 2a* (PBP2a) dengan afinitas yang rendah terhadap antibiotik sehingga menyulitkan pengobatan infeksi MRSA. Untuk itu, penelitian guna menemukan anti-MRSA alternatif menjadi penting dilakukan. Salah satu sumber senyawa bioaktif yang bersifat antimikroba adalah bakteri asal sedimen mangrove. Pantai Logending, Kebumen, Jawa Tengah, merupakan wilayah hutan mangrove dengan keragaman hayati yang kompleks. Isolat bakteri asal sedimen mangrove Pantai Logending dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Namun potensi mikroba di sedimen mangrove Pantai Logending belum sepenuhnya dieksplorasi. Berdasarkan hal tersebut maka tujuan penelitian ini adalah (a) mengetahui aktivitas anti-MRSA dari senyawa bioaktif yang dihasilkan oleh bakteri asal sedimen mangrove Pantai Logending Kebumen, (b) mengidentifikasi senyawa bioaktif yang dihasilkan, (c) mengetahui prediksi interaksi antara senyawa bioaktif yang dihasilkan dengan protein PBP2a, dan (d) mengetahui identitas bakteri yang potensial sebagai agen anti-MRSA berdasarkan sekuen gen 16S rRNA.

Penelitian dilakukan dengan metode survei dan menggunakan analisis secara deskriptif. Penelitian dilakukan melalui 5 tahapan utama yaitu (a) penapisan bakteri dari sedimen mangrove Pantai Logending Kebumen yang potensial penghasil senyawa bioaktif anti-MRSA, (b) identifikasi bakteri potensial penghasil senyawa bioaktif anti-MRSA, (c) produksi senyawa bioaktif anti-MRSA, (d) karakterisasi senyawa bioaktif anti-MRSA, dan (e) analisis interaksi senyawa bioaktif anti-MRSA dengan Protein target PBP2a.

Penapisan dan penentuan aktivitas penghambatan terhadap MRSA pada penelitian ini dilakukan terhadap 99 isolat bakteri asal dari sedimen mangrove Pantai Logending. Pengujian anti-MRSA dilakukan terhadap supernatan bebas sel dari masing-masing isolat bakteri. Dari total isolat bakteri yang diuji tersebut,

sebanyak 2 isolat (LG16 dan LG85) menunjukkan kemampuan penghambatan terhadap MRSA, ditandai dengan terbentuknya zona jernih di sekitar kertas cakram yang telah ditetesi dengan supernatan bakteri. Isolat potensial tersebut kemudian diidentifikasi secara molekular menggunakan deteksi gen 16S rRNA. Berdasarkan analisis gen 16S rRNA, LG16 memiliki kemiripan paling dekat dengan *Bacillus subtilis* (99,93 %), sedangkan LG85 memiliki kemiripan paling dekat dengan *B. tropicus* (99,39 %).

Ekstraksi senyawa bioaktif anti-MRSA dilakukan pada isolat terpilih yakni LG16 dan LG85 menggunakan pelarut etil asetat. Diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak kasar LG16 dan LG85 berturut-turut yaitu $43,1 \pm 1,20$ mm dan $34,6 \pm 3,13$ mm. Nilai tersebut menunjukkan daya anti-MRSA yang sangat tinggi bila dibandingkan dengan kontrol positifnya yaitu *clindamycin* yang rata-rata zona hambatnya hanya $16,4 \pm 0,50$ mm. Fraksi aktif diperoleh melalui metode pemisahan Kromatografi Lempeng Tipis (KLT). Fraksi aktif anti-MRSA ekstrak ditentukan dengan uji bioautografi dilanjutkan dengan isolasi senyawa menggunakan metode KLT preparatif. Selanjutnya, untuk memahami senyawa kimia yang terlibat dalam aktivitas biologisnya, komposisi kimia fraksi aktif dianalisis menggunakan GC-MS. Hasil menunjukkan bahwa senyawa yang paling dominan dalam fraksi aktif LG16 adalah 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester sedangkan pada LG85 adalah 10-Octadecenoic acid, methyl ester.

Berdasarkan hasil analisis GC-MS diketahui pula bahwa fraksi aktif *B. subtilis* LG16 memiliki 7 *peak* utama dengan luas area antara 1,61-28,68 %. Fraksi aktif *B. tropicus* LG85 diketahui memiliki 5 *peak* utama dengan luas area antara 9,97-23,12 %. Semua senyawa tersebut diprediksi interaksinya dengan protein target (4DKI dan 3ZFZ) menggunakan *molecular docking*. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa pada senyawa bioaktif yang terkandung dalam fraksi aktif *B. tropicus* LG85 yaitu Androst-4-en-11-ol-3,17-dione, 9-thiocyanato- (AD) memiliki *binding energy* yang lebih rendah baik bila dibandingkan dengan *native ligand* maupun *clindamycin* pada kedua struktur protein yaitu berturut-turut sebesar -12,6 dan -10,8 Kcal/mol.

Validasi hasil *molecular docking* dilakukan dengan menganalisis interaksi molekular yang terjadi. Senyawa AD dan *native ligand* RB6 pada protein 4DKI

terikat dengan asam amino SER-403 melalui ikatan hidrogen. Hasil *redocking* pada *native ligand ceftaroline* terhadap 3ZFZ menunjukkan adanya ikatan hidrogen yang terjadi pada SER-240. Sementara AD hanya mampu terikat pada SER-240 melalui ikatan Van der Waals. Asam amino serin diketahui sebagai asam amino kunci yang bertanggung jawab dalam situs aktif protein PBP2a. Sehingga apabila ligan mampu membentuk ikatan dengan asam amino serin, interaksi ini menegaskan bahwa ligan dapat tertambat pada situs aktif PBP2a. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa baik ekstrak kasar maupun fraksi aktif dari LG16 dan LG85 pada pengujian *in vitro* dan *in silico* memiliki potensi untuk dikembangkan sebagai anti-MRSA.

Kata kunci: 16s rRNA, anti-MRSA, PBP2a, resistensi, senyawa bioaktif



SUMMARY

The resistance of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to several antibiotics has significantly altered the epidemiology and spectrum of MRSA infections. This resistance is closely linked to the presence of Penicillin-Binding Protein 2a (PBP2a), which has a low affinity for antibiotics, making MRSA infections challenging to treat. Therefore, it is crucial to conduct research aimed at discovering alternative anti-MRSA agents. Bacteria from mangrove sediments are a promising source of bioactive compounds with antimicrobial properties. Logending Beach in Kebumen, Central Java, hosts a mangrove forest with rich biodiversity. Bacterial isolates from these sediments have shown inhibitory activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. However, the full potential of the microbes in the mangrove sediments of Logending Beach remains unexplored. This research aims to: (a) assess the anti-MRSA activity of bioactive compounds produced by bacteria from the mangrove sediments of Logending Beach, Kebumen; (b) identify the bioactive compounds produced; (c) predict the interaction between these bioactive compounds and the PBP2a protein; and (d) determine the identity of potential anti-MRSA bacteria based on the 16S rRNA gene sequence.

The research was conducted using a survey method and used descriptive analysis. The research was carried out through 5 main stages, namely: (a) screening of bacteria from the mangrove sediments of Logending Beach, Kebumen, which have the potential to produce anti-MRSA bioactive extracts, (b) identification of potential bacteria to produce anti-MRSA bioactive extracts, (c) production of anti-MRSA bioactive extracts, (d) characterization of the anti-MRSA bioactive extract, and (e) analysis of the interaction of the anti-MRSA bioactive compound with the PBP2a target protein.

Screening and determination of inhibitory activity against MRSA in this study were carried out on 99 bacterial isolates from mangrove sediments of Logending Beach. Anti-MRSA testing was carried out on cell-free supernatants from each bacterial isolate. Of the total bacterial isolates tested, LG16 and LG85 showed inhibitory ability against MRSA, indicated by forming a clear zone around the disc

paper that dripped by bacterial supernatant. The potential isolates were then identified molecularly using 16S rRNA gene detection. Based on the analysis of the 16S rRNA gene, LG16 has the closest similarity to *Bacillus subtilis* (99,93%), while LG85 has the closest similarity to *B. tropicus* (99,39%).

Extraction of anti-MRSA bioactive compounds was carried out on selected isolates, namely LG16 and LG85 using ethyl acetate solvent. The diameter of the inhibition zone produced by the crude extracts of LG16 and LG85 were 43.1 ± 1.20 mm and 34.6 ± 3.13 mm, respectively. These values indicate a very large anti-MRSA activity to its positive control, clindamycin, which had an average inhibition zone of only 16.4 ± 0.50 mm. The active fraction was obtained through the Thin Layer Chromatography (TLC) separation method. The active anti-MRSA fraction of the extract was determined by bioautography test followed by compound isolation using the preparative TLC method. Furthermore, to understand the chemical compounds involved in their biological activity, we identified the chemical composition of the active fraction by GC-MS analysis. The results revealed that the most dominant compound in the active fraction of LG16 was 9-Octadecenoic acid (Z) -, methyl ester, while in LG85 it was 10-Octadecenoic acid, methyl ester.

Based on the results of GC-MS analysis, it is also known that the active fraction LG16 has 7 main peaks with an area of between 1.61-28.68%. The active fraction of *B.tropicus* LG85 is known to have 5 main peaks with an area of between 9.97-and 23.12%. These compounds are predicted to interact with the target protein (4DKI and 3ZFZ) using molecular docking. In the bioactive compounds contained in the active fraction of *B.tropicus* LG85, the results showed that the compound Androst-4-en-11-ol-3,17-dione, 9-thiocyanato- (AD) has a lower binding energy when compared to both native ligands and clindamycin in both protein structures, namely -12.6 and -10.8 Kcal/mol, respectively.

Validation of molecular docking results was carried out by analyzing the molecular interactions that occurred. The AD compound and the native ligand RB6 in the 4DKI protein were bound to the amino acid SER-403 through hydrogen bonds. The results of the redocking of the native ligand ceftaroline to 3ZFZ showed a hydrogen bond that occurred at SER-240. While AD was only able to bind to SER-

240 through Van der Waals bonds. Serine amino acids are key amino acids responsible for the active site of the PBP2a protein. Therefore, if the ligand can form a bond with the amino acid serine, this interaction confirms that the ligand can be tethered to the active site of PBP2a. The results of this study indicate that both crude extracts and active fractions of LG16 and LG85 in vitro and silico tests have potential in the health sector as anti-MRSA.

Keywords: 16S rRNA, anti-MRSA, bioactive compound, PBP2a, resistance

