

Flavonoid Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) sebagai Terapi Adjuvant Infeksi *Clostridium difficile* melalui Inhibisi Adhesin CD0873 dan CDD-1 β -Lactamase, suatu Studi *In Silico*

Bima Alda Pratama, Rio Risandiansyah, Reza Hakim*

ABSTRAK

Pendahuluan: Infeksi *Clostridium difficile* adalah salah satu infeksi nosokomial yang sering terjadi akibat pemakaian antibiotik dalam jangka panjang. Strategi pencegahan infeksi *C. difficile* dapat dilakukan dengan dua mekanisme yaitu dengan penghambatan proses adhesi bakteri dengan melakukan inhibisi protein adhesin CD0873 yang bertujuan mencegah penempelan bakteri dan penghambatan enzim β -Lactamase dengan menginhibisi protein CDD-1 β -Lactamase sehingga bakteri akan tereradikasi dengan antibiotik umum yang digunakan secara klinis.

Metode: Penelitian dilakukan dengan metode *in silico* menggunakan *molecular docking*. Dengan menganalisa hasil afinitas senyawa aktif kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap protein CDD-1 β -Lactamase dan CD0873 diukur menggunakan *website docking server* dengan parameter energi ikatan bebas (ΔG). Analisa data dilakukan secara diskriptif analitik.

Hasil: Senyawa aktif memiliki afinitas yang tinggi terhadap CDD-1 β -Lactamase ditinjau dari energi ikatan bebas (ΔG) antara lain Quercetin-3-rutinoside (ΔG : -9.83), Leucoside(Kaempferol-3-O-sambubioside) (ΔG : -9.45), Quercetin-3-sambioside (ΔG : -9.16). Senyawa aktif memiliki afinitas yang tinggi terhadap CD0873 antara lain *Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside)* (ΔG : -8.17), Tiliroside (ΔG : -6.89), 5-Caffeoylquinic Acid (ΔG : -5.79).

Kesimpulan: Senyawa aktif kelopak bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) mempunyai afinitas tinggi untuk berikatan dan menghambat CDD-1 β -Lactamase dan CD0873 yang dibuktikan dengan parameter afinitas *molecular docking* dibandingkan dengan kontrol yang ditinjau dari energi ikatan bebas, konstanta inhibisi, luas permukaan dan residu asam amino.

Kata Kunci: Anti-adhesi, Adhesi, Adhesin, β -Lactamase, CD0873, *Hibiscus sabdariffa*, *Clostridium difficile*

Korespondensi Penulis : dr. Reza Hakim, M. Biomed

Email : rezahakim@unisma.ac.id

Flavonoid of Rosella Calyx (*Hibiscus sabdariffa*) as Adjuvant Therapy for *Clostridium difficile* Infection through Inhibition of Adhesin CD0873 and CDD-1 β -Lactamase, an *In Silico* Study

Bima Alda Pratama, Rio Risandiansyah, Reza Hakim*

ABSTRACT

Introduction: *Clostridium difficile* infection is a nosocomial infection that often occurs due to long-term use of antibiotics. The strategy for preventing *C. difficile* infection can be carried out by two mechanisms, namely by inhibiting the bacterial adhesion process by inhibiting the CD0873 adhesin protein which aims to prevent bacterial attachment and inhibiting the β -Lactamase enzyme by inhibiting the CDD-1 β -Lactamase protein so that the bacteria will be eradicated by common antibiotics used clinically.

Method: This research was computationally study using the molecular docking. The affinity of the rosella flower active compounds for protein CDD-1 β -Lactamase and CD0873 was measured using a website docking server with parameters are free binding energy (ΔG). The model for analysis was using analytical descriptive.

Result: Active compounds that have a high affinity for CDD-1 β -Lactamase include Quercetin-3-rutinoside (ΔG : -9.83), Leucoside(Kaempferol-3-O-sambubioside) (ΔG : -9.45), Quercetin-3-sambioside (ΔG : -9.16). Active compounds that have a high affinity for CD0873 include *Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside)* (ΔG : -8.17), Tiliroside (ΔG : -6.89), 5-Caffeoylquinic Acid (ΔG : -5.79).

Conclusion: The active compound of rosella flower (*Hibiscus sabdariffa*) has a high affinity to bind and inhibit CDD-1 β -Lactamase and CD0873 as evidenced affinity parameters molecular docking compared with control reviewed from free binding energy, inhibition constant, surface interaction and amino acid residues.

Keywords: Anti-adhesion, Adhesion, Adhesin, β -Lactamase, CD0873, *Hibiscus sabdariffa*, *Clostridium difficile*

Correspondence Author : dr. Reza Hakim, M.Biomed

Email : rezahakim@unisma.ac.id

PENDAHULUAN

Clostridium difficile adalah bakteri basil Gram positif oportunistik pada sistem pencernaan. Infeksi *C.difficile* dapat menyebabkan kolitis megakolon dengan angka kematian 19% sampai 45%. Dengan adanya kolitis megakolon tersebut dapat menyebabkan ruptur kolon akibat kerusakan jaringan.^{3,4,8}

Faktor risiko infeksi *C.difficile* adalah terapi antibiotik jangka panjang, yang mengakibatkan peningkatan populasi bakteri *C.difficile* karena memiliki ketahanan terhadap terapi antibiotik melalui kerja enzim β -lactamase yang dapat menghidrolisis antibiotik golongan β -lactam yang umumnya digunakan secara klinis.^{12,13}

Patogenesis *C.difficile* diawali dengan penempelan bakteri pada permukaan sel inang. Salah satu molekul novel yang terlibat adalah Lipoprotein CD0873. Protein ini diduga terletak pada dinding sel bakteri, dan telah diketahui mampu berikatan dengan sel kultur CaCo-2.⁵

Pencegahan terjadinya infeksi *C.difficile* dapat dilakukan dengan pencarian agen baru yang bersifat adjuvant untuk mencegah adhesi bakteri. Salah satu sumber obat baru yang perlu dilakukan eksplorasi adalah bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*). Secara *in vitro* bunga *H.sabdariffa* menunjukkan aktivitas anti adhesi terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii*. Namun, potensi antiadhesi pada bakteri *C.difficile* masih belum diketahui.¹⁷

Penelitian ini akan menguji pencegahan infeksi *C.difficile* dengan studi *in silico* melalui dua strategi. Pertama, melalui penghambatan enzim β -lactamase dari *C.difficile* sehingga bakteri *C.difficile* akan tereradikasi pada pemberian antibiotik β -lactam. Kedua, melalui penghambatan molekul adhesin yang diperlukan bakteri *C.difficile* untuk menempel pada saluran cerna dan memulai proses infeksi.

Protein target yang digunakan adalah protein β -lactamase *C.difficile* (kode protein: 6EDM) yang berikatan dengan cefotaxime sebagai natural ligand, dan protein CD0873 pada struktur tertutup (kode protein: 6HNI) yang memiliki natural ligand tyrosine dan polyethylene glycol (PEG).

METODE PENELITIAN

Desain Penelitian

Penelitian menggunakan metode *in silico* atau *molecular docking* untuk menilai afinitas senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* terhadap protein target CDD-1 β -Lactamase dan CD0873 dengan menambatkan molekul menggunakan metode *molecular docking* ([dockingserver.com](http://www.dockingserver.com)). Dengan menilai

parameter energi ikatan bebas, konstanta inhibisi, luas permukaan dan residu asam amino

Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang (UNISMA) penelitian mulai dilaksanakan pada bulan Januari-Februari 2022.

Alat dan Bahan

Alat yang dibutuhkan untuk uji *in silico* adalah komputer dengan spesifikasi RAM 4096 MB, Intel ® core™ I3, CPU @2.0 GHz, Sistem operasi *Microsoft Windows 10 Pro 64-bit*, koneksi internet, software *molecular docking* berbasis web pada *docking server* (<http://www.dockingserver.com>).

Bahan yang diperlukan untuk penambatan molekul yaitu senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa*, struktur Cefotaxime dan Tyrosine sebagai kontrol *download* pada pubchem.

Uji Penambatan Molekular Senyawa Aktif Rosella dengan Protein CDD-1 β -Lactamase dan CD0873

Pengunduhan senyawa aktif herbal dan obat yang akan dibandingkan di <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dalam format *sdf*. Format file tersebut dikonversi menjadi *pdb* menggunakan software SMILEY. Kemudian mencari struktur protein CDD-1 β -Lactamase dan CD0873 pada database protein <http://www.rcsb.org/>. Hasil pencarian dapat diunduh dalam bentuk file *pdb*. Penambatan molekul menggunakan software berbasis web *docking server* (<http://www.dockingserver.com>). Validasi pada penelitian ini dilakukan dengan cara membandingkan dengan ligan kontrol yaitu Cefotaxime dan Tyrosine.

Teknik Analisa Data

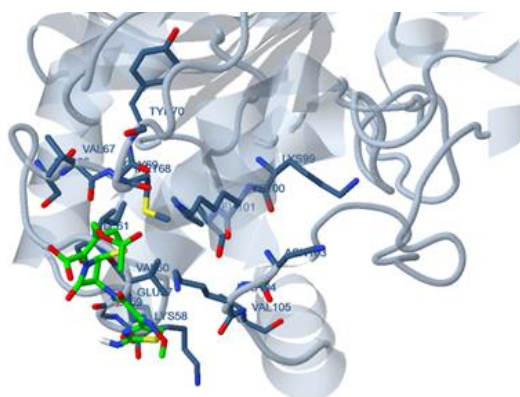
Analisa hasil penambatan molekul diamati dengan metode deskriptif analitik. Analisa dilakukan dengan menguji parameter yaitu energi ikatan bebas dengan interpretasi hasil semakin negatif nilai maka pembentukan ikatan antara senyawa aktif dan ligan semakin stabil dan terjadi secara spontan. Analisa kedua dilakukan dengan menguji parameter konstanta inhibisi dengan interpretasi hasil semakin rendah nilai maka semakin kecil energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan antara senyawa aktif dan ligan. Analisa ketiga dilakukan dengan menguji parameter interaksi permukaan dengan interpretasi hasil semakin besar nilai maka semakin luas permukaan ikatan yang terjadi antara senyawa aktif dan ligan. Analisa data keempat dilakukan dengan menguji parameter residu asam amino yaitu dengan interpretasi hasil semakin

banyak ikatan yang terjadi antara senyawa aktif dan ligan menandakan semakin banyak ikatan sisi aktif dan efek yang sama dengan kontrol yang diujikan.⁹

HASIL PENELITIAN

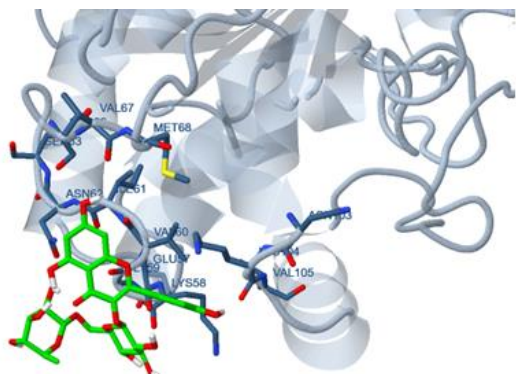
Hasil Data Uji Validitas dan Penambatan Molekul.

Hasil *molecular docking* senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* didapatkan hasil 3 senyawa terbaik terhadap protein CDD-1 β -Lactamase dengan kontrol Cefotaxime dalam bentuk tabel dapat dilihat pada **Tabel 1**. Dengan hasil *Cefotaxime* (Energi Ikatan Bebas: -4.78, Konstanta Inhibisi: 311.68 μ M, Luas Permukaan: 525.916 $\text{\AA}$, Residu Asam Amino: Hidrogen: ALA89, SER93, Hidrofobik: VAL95, TYR98, TRP142, LEU143, Polar: SER45, SER93, TYR98, LYS135, TRP142, Kation-Pi: TYR98, Lain-Lain: SER45, TRP80, SER93, CYS94, VAL95, TYR98, LYS135, TRP142, LEU143, LYS194).



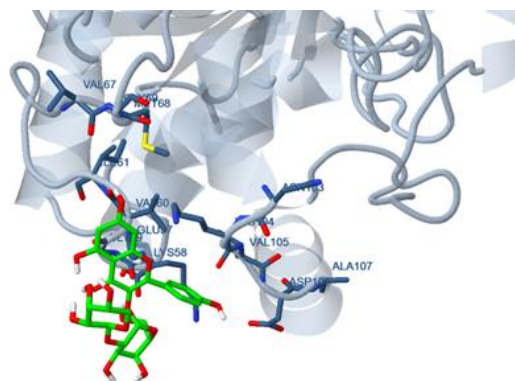
Gambar 1. Penambatan Cefotaxime terhadap CDD-1 β -Lactamase

Quercetin-3-Rutinoside (Energi ikatan bebas: -9.83, Konstanta Inhibisi: 61.89 nM, Luas Permukaan : 529.054 $\text{\AA}$, Residu Asam Amino: Hidrogen: ASN62, Polar: ASN62, Hidrofobik: VAL60, Lain-lain: VAL60, ASN62, LYS104).



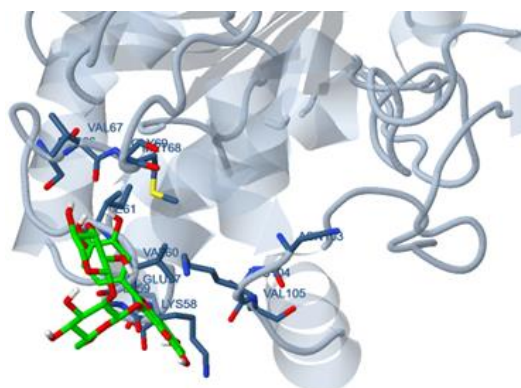
Gambar 2. Penambatan Quercetin-3-Rutinoside Terhadap Protein CDD-1 β -Lactamase.

Leucoside(Kaempferol-3-O-sambubioside) (Energi Ikatan Bebas: -9.45, Konstanta Inhibisi: 199.15 nM, Luas Permukaan: 476.393 $\text{\AA}$, Residu Asam Amino: Hidrogen: ASP106, Hidrofobik: VAL60, Lain-lain: LYS58, LYS104, MET68, VAL60).



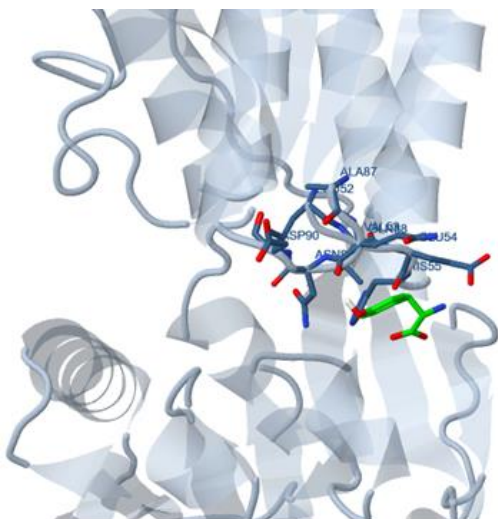
Gambar 3. Penambatan Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside) Terhadap Protein CDD-1 β -Lactamase.

Quercetin-3-Sambioside (Energi Ikatan Bebas: -9.16, Konstanta Inhibisi: 194.15 nM, Luas Permukaan: 529.761 $\text{\AA}$, Residu Asam Amino: Polar: LYS104, Hidrofobik: VAL60, Lain-lain: MET68, LYS58, VAL60, LYS104).



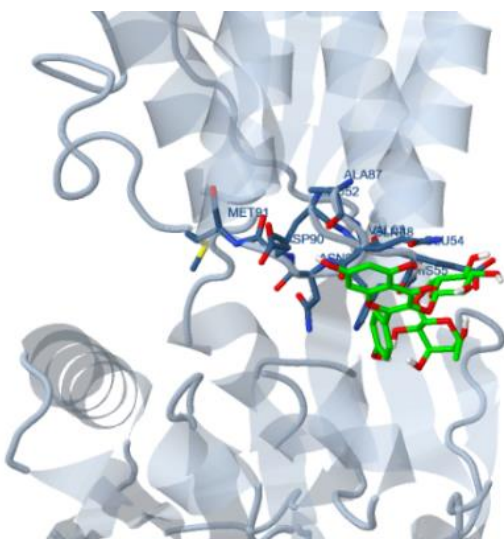
Gambar 4. Penambatan Quercetin-3-Sambioside pada CDD-1 β -Lactamase.

Sedangkan hasil *molecular docking* senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* terhadap CD0873 dengan kontrol Tyrosine didapatkan 3 senyawa terbaik yang disajikan dalam bentuk tabel dapat dilihat pada **Tabel 2**. Dengan hasil Tyrosine (Energi Ikatan Bebas: -3.53, Konstanta Inhibisi: 2.61mM, Luas Permukaan: 320.827 $\text{\AA}$, Residu Asam Amino: Hidrogen: GLU54, Polar: GLU54, Hidrofobik: VAL53, Lain-lain: ASN89, GLN88, GLU54).



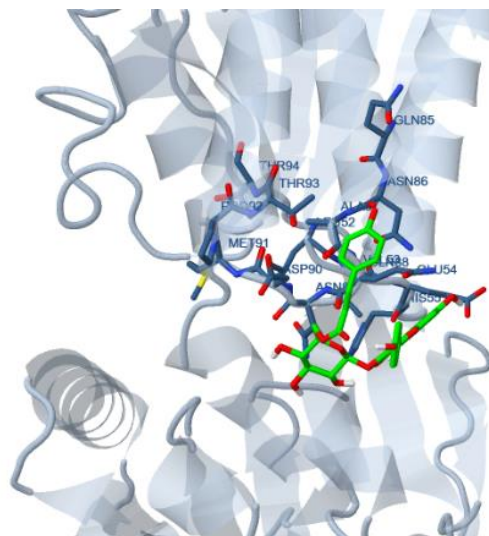
Gambar 5. Penambatan Tyrosine Terhadap Protein CD0873.

Kaempferol-3-O-Rutinoside (Nicotiflorin) (Energi Ikatan Bebas: -8.17, Konstanta Inhibisi: 1.03uM, Luas Permukaan: 496.556 Å, Residu Asam Amino: Polar: GLN88, GLU54, ASP90, Hidrofobik: VAL53, Lain-lain: ASN89, VAL53, GLU54, GLN88, ASP90).



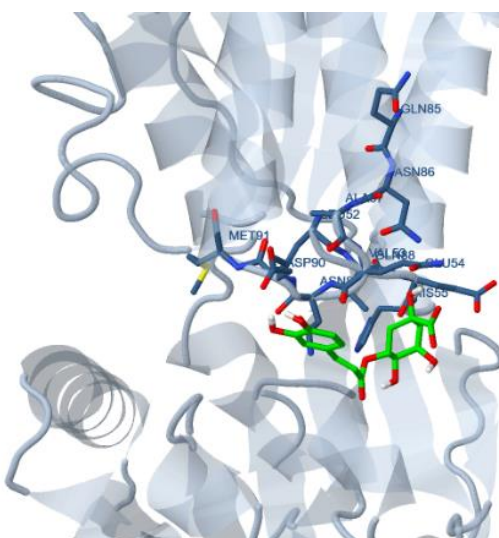
Gambar 6. Penambatan *Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin)* Terhadap Protein CD0873.

Tiliroside (Energi ikatan bebas: -6.89, Konstanta Inhibisi: 8.94 uM, Luas Permukaan: 619.948 Å, Residu Asam Amino: Polar: GLN88, ASN89, GLU54, Hidrofobik : VAL53, Lain-lain: VAL53, GLU54, GLN88, ASN89, ASP90, THR93).



Gambar 7. Penambatan *Tiliroside* Terhadap Protein CD0873

5-Caffeoylquinic Acid (Energi Ikatan Bebas: -5.79, Konstanta Inhibisi: 57.29 uM, Luas Permukaan: 444.864 Å, Residu Asam Amino: Hidrogen: ASN86, GLN88, Polar: GLN88, ASN89, ASP90, Hidrofobik: VAL53, Lain-lain: GLU54, VAL53, GLN88, ASN89, ASP90).



Gambar 8. Penambatan *Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin)* Terhadap Protein CD0873

Nilai terbaik didapatkan berdasarkan Senyawa yang memiliki enegi ikatan bebas, luas permukaan yang lebih besar dibandingkan kontrol. Konstanta inhibisi yang lebih rendah dibandingkan kontrol dan kemiripan residu asam amino dibandingkan dengan kontrol.

Tabel 1. Data Penambatan Senyawa Aktif Flavonoid Kelopak Bunga osella dan Cefotaxime pada protein CDD-1 β -Lactamase (6EDM)

Ligan	Energi ikatan bebas (kcal/mol)	Konstanta Inhibisi (uM)	Interaksi Permukaan (Å)	Residu Asam Amino	Jumlah persamaan residu asam amino
Cefotaxime	-4.78	311.68 uM	525.916	Hidrogen: ALA89, SER93 Hidrofobik: VAL95, TYR98, TRP142, LEU143 Polar: SER45, SER93, TYR98, LYS135, TRP142 Kation-Pi: TYR98 Lain-Lain: SER45, TRP80, SER93, CYS94, VAL95, TYR98, LYS135, TRP142, LEU143, LYS194	100%
Quercetin-3-rutinoside	-9.83	61.89 nM	529.054	Hidrogen: ASN62 Polar: ASN62 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: VAL60, ASN62, LYS104	0%
Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside)	-9.45	199.15 nM	476.393	Hidrogen: ASP106 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: LYS58, LYS104, MET68, VAL60	0%
Quercetin-3-sambioside	-9.16	194.15 nM	529.761	Polar: LYS104 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, LYS58, VAL60, LYS104	0%
Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin)	-8.67	444.81 nM	456.387	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS104 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: LYS58, VAL60, LYS104	0%
Quercetin-3-glucoside	-8.55	542.11 nM	486.143	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS104 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: LYS104	0%
5-Caffeoylquinic acid	-7.43	3.57 uM	486.924	Polar: LYS104, ASN62 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, VAL60, LYS104,	0%
Cyclohexanecarboxylic acid, 4-((3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2opropenyl)oxy)-1,3,5-trihydroxy	-7.40	3.74uM	498.667	Hidrogen: LYS100 Polar: LYS104 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, VAL60, LYS100, LYS104	0%
Chlorgenic acid	-7.26	4.81 uM	529.119	Polar: LYS104 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, VAL67, LYS104	0%
4-Caffeoylquinic acid (Cryptochlorogenic acid)	-7.19	5.32 uM	538.48	Polar: LYS104, LYS100 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, LYS100, LYS104	0%
Tiliroside	-7.08	6.46 uM	516.959	Hidrofobik : VAL60 Lain-lain: LYS104, MET68, VAL60	0%
5-O-Caffeoylshikimic acid	-6.98	7,60 uM	535.005	Polar: LYS104, ASN62 Lain-lain: MET68, LYS104	0%
Myricetin	-6.89	8.84 uM	475.845	Hidrogen: LYS104 Polar: ASN62 Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: MET68, LYS58, VAL60, LYS104	0%
Caffeoylquinic acid isomer (Isochlorogenic acid)	-6.84	9.69 uM	533.203	Polar: LYS104, ASN62 Hidrofobik: MET68, VAL60 Lain-lain: ILE61, VAL67, SER66, LYS58, LYS104	0%
Protocatechuic acid glucoside	-6.81	10.26 uM	420.474	Polar: LYS100, LYS104, ASN62	0%

				Lain-lain: VAL60, LYS100, LYS104	
<i>Quercetin derivative</i>	-6.66	13.17 uM	461.69	Hidrogen: LYS104 Hidrofobik: VAL60	0%
				Lain-lain: LYS58, MET68, VAL60, LYS104	
<i>Coumaroylquinic acid</i>	-6.48	17.77 uM	490.644	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS100, LYS104 Hidrofobik: VAL60, MET68	0%
				Lain-lain: VAL60, MET68, LYS100, LYS104	
<i>Feruloyl quinic acid derivative (4-O-Feruloyl-D-quinic acid)</i>	-6.39	20.63 uM	525.631	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS100 Hidrofobik: VAL60	0%
				Lain-lain: MET68, LYS104	
<i>Kaempferol-3-glucoside</i>	-6.29	24.34 uM	500.71	Polar: ASP106 Hidrofobik: VAL60	0%
				Lain-lain: LYS104, LYS58, MET68, VAL60	
<i>Galloyl ester (Epicatechin-3-O-gallate)</i>	-6.17	29.94 uM	616.908	Hidrogen: SER66, ASN62 Polar: LYS104, LYS100, ASN62 Hidrofobik: VAL60, MET68	0%
				Lain-lain: VAL60, ASN62, MET68, LYS100, LYS104	
<i>2-O-trans-Caffeoyl-hydroxicitric acid</i>	-6.13	32.07 uM	469.847	Polar: LYS100, LYS104 Hidrofobik: VAL60	0%
				Lain-lain: MET68, LYS100, LYS104	
<i>Quercetin</i>	-5.66	13.09 uM	461.376	Hidrogen: LYS104 Hidrofobik: VAL60	0%
				Lain-lain: LYS58, MET68, VAL60, LYS104	
<i>Feruloyl derivative (1-O-Feruloyl-beta-D-glucose)</i>	-5.50	93.50 uM	501.649	Hidrofobik: VAL60 Lain-lain: LYS104, MET68	0%
<i>Gallic Acid</i>	-5.30	131.41 uM	335.771	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS100 Hidrofobik: MET68	0%
				Lain-lain: VAL60, VAL67, MET68, LYS100, LYS104	
<i>Caffeic acid</i>	-5.17	161.98 uM	381.684	Hidrogen: LYS104 Polar: ASN62, LYS100	0%
				Lain-lain: LYS100, LYS104	
<i>Protocatechuic acid</i>	-5.00	216.64 uM	325.615	Hidrogen: LYS104 Polar: LYS100 Hidrofobik: MET68	0%
				Lain-lain: VAL60, MET68, LYS100, LYS104	
<i>Methyl gallate</i>	-3.98	1.21 mM	360.042	Polar: ASN62 Hidrofobik : VAL60	0%
				Lain-lain: LYS104, MET68, VAL60	
<i>5-Hydroxymethylfurfural</i>	-2.89	7.60 mM	302.954	Polar: LYS104 Hidrofobik: MET68	0%
				Lain-lain: LYS100, MET68, LYS104	

Tabel 2. Data Penambatan Senyawa Aktif Flavonoid Kelopak Bunga Rosella dan Tyrosine pada protein CD0873

Ligan	Energi ikatan bebas (kcal/mol)	Konstanta Inhibisi (uM)	Interaksi Permukaan (Å)	Residu Asam Amino	Jumlah persamaan residu asam amino
Tyrosine	-3.53	2.61 mM	320.827	Hidrogen: GLU54 Polar: GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: ASN89, GLN88, GLU54	100%
Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin)	-8.17	1.03 uM	496.556	Polar: GLN88, GLU54, ASP90 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: ASN89, VAL53, GLU54, GLN88, ASP90	100%
Tiliroside	-6.89	8.94 uM	619.948	Polar: GLN88, ASN89, GLU54 Hidrofobik : VAL53 Lain-lain: VAL53, GLU54, GLN88, ASN89, ASP90, THR93	100%
5-Caffeoylquinic acid	-5.79	57.29 uM	444.864	Hidrogen: ASN86, GLN88 Polar: GLN88, ASN89, ASP90 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLU54, VAL53, GLN88, ASN89, ASP90	100%
Cyclohexane carboxylic acid, 4-((3,4-dihydroxyphenyl)-1-oxo-2opropenyl oxy)-1,3,5-trihydroxy	-5.43	105.39 uM	427.816	Hidrogen bonds: GLU54, ASN86, VAL53 Polar: ASP90, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLN88, ASN89, VAL53, GLU54, ASP90	100%
Caffeoylquinic acid isomer (Isochlorogenic acid)	-5.43	105.20 uM	414.867	Polar: ASP90, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain : ASN89, GLN88, GLU54, ASP90	100%
5-O-Caffeoylshikimic acid	-5.17	161.97 uM	413.949	Polar: ASN89, GLN88, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLU54, GLN88, ASN89	100%
Myricetin	-5.15	168.53 uM	400.211	Polar: ASN89, GLU54, GLN88 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: VAL53, GLU54, GLN88, ASN89	100%
Quercetin	-4.86	275.32 uM	393.179	Polar: ASN89, GLN88, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLU54, GLN88, ASN89	100%
Chlorogenic acid	-4.83	288.12 uM	419.584	Polar: ASN89, ASP90, GLN88, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain : VAL53, GLU54, ASN89, ASP90	100%
Quercetin derivative	-4.81	297.12 uM	398.976	Hidrogen bonds: ASN89 Polar: GLN88, GLU54 Hidrofobik: VAL53	100%

				Lain-lain: GLU54, GLN88, ASN89	
<i>Coumaroylquinic acid</i>	-4.30	700.90 uM	417.725	Hydrogen bonds: ASN89 Polar: GLN88, GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: ASP90, GLU54, GLN88, ASN89	100%
<i>Methyl gallate</i>	-3.63	2.17 mM	315.727	Polar: GLU54 Hidrofobik : VAL53 Lain-lain: GLN88, ASN89, GLU54, VAL53	100%
<i>Caffeic acid</i>	-3.60	2.32 mM	328.402	Hydrogen bonds: ASN89 Polar: GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLN88, ASN89, GLU54	100%
<i>Gallic Acid</i>	-3.41	3.19 mM	291.008	Polar: GLU54 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: VAL53, GLU54, GLN88, ASN89	100%
<i>Protocatechuic acid</i>	-3.40	3.25 mM	297.013	Polar: GLU54, ASN89 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: VAL53, GLU54, GLN88, ASN89	100%
<i>Quercetin-3-glucoside</i>	-6.92	8.40 uM	530.911	Polar: GLN88, ASN89 Lain-lain: ASP90, THR93, VAL53, GLN88, ASN89	75%
<i>Kaempferol-3-glucoside</i>	-5.84	52.63 uM	454.751	Polar: ASP90, GLU54, GLN88 Lain-lain: ASN89, GLU54, GLN88, ASP90	75%
<i>4-Caffeoylquinic acid (Cryptochlorogenic acid)</i>	-5.34	121.55 uM	428.053	Polar: ASP90, GLU54 Lain-lain: ASN89, GLN88, GLU54, ASP90	75%
<i>Protocatechuic acid glucoside</i>	-5.31	128.95 uM	412.268	Hydrogen: ASN86 Polar: GLN88, ASN89, ASP90 Hidrofobik: VAL53 Lain-lain: GLN88, ASN89, ASP90	75%
<i>Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside)</i>	-9.08	220.28 nM	405.516	Polar: ASP90, ASN89, GLN88 Lain-lain: PRO92, ASP90, ASN89, GLN88	50%
<i>Quercetin-3-rutinoside</i>	-8.83	335.37 nM	432.893	Polar: ASP90, GLN88, GLU54 Lain-lain: GLU54, GLN88, ASP90	50%
<i>Galloyl ester (Epicatechin-3-O-gallate)</i>	-5.88	49.17 uM	389.202	Polar: GLU54 Lain-lain: ASN89, ASP90, GLU54	50%
<i>Feruloyl derivative (1-O-Feruloyl-beta-D-glucose)</i>	-5.45	100.00 uM	452.857	Polar: THR93, ASN89 Lain-lain: ASP90, GLN88, ASN89, THR93	50%
<i>Feruloyl quinic acid derivative (4-O-Feruloyl-D-quinic acid)</i>	-4.68	373.60 uM	445.972	Polar: GLN88 Hidrofobik: PRO92 Lain-lainya: ASP90, ASN89, THR93, GLN88	50%

2-O-trans-Caffeoyl-hydroxycitric acid	-3.54	2.52 mM	321.422	Polar: ASN89, GLN88 Lain-lain: ASP90, GLN88, ASN89	50%
5-Hydroxymethylfurfural	-2.69	10.75 mM	250.117	Polar: GLN88 Lain-lain: ASP90, THR93, GLN88	50%
Quercetin-3-sambioside	-8.03	1.31 uM	391.426	Polar: ASP90, GLN88 Lain-lain: THR93, GLN88, ASP90	25%

PEMBAHASAN

Senyawa Aktif Flavonoid Bunga *H.sabdariffa* Menghambat Protein Target CDD-1 β -Lactamase

CDD-1 β -Lactamase adalah struktur protein yang dapat menghasilkan enzim β -Lactamase sehingga memiliki kemampuan untuk menghidrolisis obat antibiotik golongan β -lactam sehingga obat antibiotik menjadi inaktif.¹² β -lactamase adalah protein yang disekresikan bakteri resisten antibiotik golongan β -Lactam.⁶ Struktur CDD-1 β -Lactamase terdiri dari 2 domain yaitu domain β sheet dan domain α heliks. Sisi aktif dari CDD-1 β -Lactamase ini terletak diantara 2 domain tersebut. Kemampuan katalitik dari β -Lactamase terletak pada N-terminus heliks α 3 dan diperankan oleh residu SER102 dan LYS105. Kemampuan katalitik dari protein CDD-1 β -Lactamase diperankan oleh binding site yang terletak diantara kedua domain pada residu 100-115.¹⁰ Pada struktur apo CDD-1 β -Lactamase residu LYS105 terkarboksilasi dan tertahan oleh ikatan hidrogen dari TRP199 dan hidrogen tambahan dari residu SER102 bersama 2 molekul air.

Pada penelitian ini hasil penambatan molekul yang dilakukan, didapatkan nilai energi ikatan bebas dari Cefotaxime dengan protein CDD-1 β -Lactamase didapatkan nilai ΔG -4,78 kkal/mol, jumlah residu asam amino yang terbentuk dari ikatan tersebut ada 11 ikatan diantaranya VAL95, TYR98, TRP142, LEU143, ALA89, SER93, SER45, LYS135, TRP80, CYS94, LYS194 yang nantinya akan dibandingkan dengan senyawa aktif yang diteliti.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Borrás-Linares *et al.* pada tahun 2015 menunjukkan hasil bahwa ekstrak ethanol dari bunga *H.sabdariffa* dapat melawan bakteri Gram positif dan Gram negatif, ekstrak ethanol bunga *H.sabdariffa* lebih efektif pada bakteri Gram positif.¹⁴ Sehingga bunga *H.sabdariffa* berpotensi untuk dicari senyawa obat antibiotik terutama pada anti resistensi.

Penelitian ini menggunakan 26 senyawa aktif flavonoid bunga *H.sabdariffa* dengan didapatkan 3 senyawa aktif terbaik dari hasil *molecular docking*

dengan analisa afinitasnya terhadap protein target CDD-1 β -Lactamase. Senyawa aktif terbaik yang didapat dari *molecular docking* diantaranya adalah *Quercetin-3-Rutinoside*, *Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside)*, *Quercetin-3-Sambioside*.

Afinitas dari senyawa aktif flavonoid bunga *H.sabdariffa* yang diteliti menunjukkan hasil yang baik dibandingkan dengan cefotaxime sebagai kontrol karena 24 dari 26 senyawa flavonoid yang diteliti menunjukkan hasil energi ikatan bebas yang baik. Hasil tersebut menunjukkan 24 senyawa aktif flavonoid dapat membentuk ikatan dengan protein target CDD-1 β -Lactamase secara spontan. Residu asam amino dari keseluruhan 26 senyawa aktif flavonoid yang diuji membentuk ikatan pada active site protein target CDD-1 β -Lactamase yaitu pada residu 100-115.

Senyawa aktif flavonoid bunga *H.sabdariffa* memiliki afinitas tinggi dalam berikatan dengan protein CDD-1 β -Lactamase. Hasil *molecular docking* tersebut menandakan adanya potensi senyawa aktif flavonoid kelopak bunga *H.sabdariffa* sebagai calon obat herbal terapi adjuvant infeksi *Clostridium difficile*. Namun, perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengkonfirmasi hasil prediksi di penelitian ini secara *in vitro*.

Senyawa Aktif Flavonoid Bunga *H.sabdariffa* Menghambat Protein Target CD0873

Novel lipoprotein CD0873 adalah protein yang berperan dalam mekanisme adhesi pada bakteri *Clostridium difficile*.⁵ Struktur dari CD0873 terbagi dalam 3 kondisi yaitu struktur terbuka, struktur semi-terbuka dan struktur tertutup. Protein ini terdiri dari dua domain yang masing-masing terdiri dari lapisan α - β - α yang terhubung oleh tiga *loop* yang membentuk engsel. Lokasi penempelan ligan terjadi diantara dua domain dengan tyrosine yang mendasari peran penting untuk mengaktivasi protein CD0873 sebagai molekul adhesin bagi bakteri *C.difficile*.⁵

Pemelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Abdallah pada tahun 2016 dengan mengevaluasi ekstrak methanol 80% kelopak bunga *H.sabdariffa* dengan bakteri Multi Drug Resistance (MDR) *Acinetobacter*

baumanni menggunakan media agar menunjukkan hasil bahwa ekstrak kelopak bunga *H.sabdariffa* lebih efektif menghambat aktivitas bakteri dibandingkan dengan gentamisin.¹ Penelitian lain juga dilakukan oleh Al-Hashimi pada tahun 2012 yang menyatakan bahwa bunga *H.sabdariffa* mengandung senyawa aktif proanthocyanidin yang dapat mengubah struktur p-fimbriae pada bakteri dan menghambat mekanisme adhesi pada uroepitelium dan pembentukan biofilm yang diuji secara *in vitro*.¹⁵

Penelitian ini menggunakan 26 senyawa aktif flavonoid bunga *H.sabdariffa* dengan didapatkan 3 senyawa aktif terbaik dari hasil *molecular docking* dengan analisa afinitasnya terhadap protein target CD0873. Senyawa aktif terbaik yang didapat dari *molecular docking* diantaranya adalah Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin), Tiliroside, 5-Caffeoylquinic acid.

Afinitas dari senyawa aktif flavonoid bunga *H.sabdariffa* yang diteliti menunjukkan hasil yang baik dibandingkan dengan tyrosine sebagai kontrol, hal ini dapat diketahui dari hasil uji *molecular docking* yang telah dilakukan. Dari hasil uji yang dilakukan pada penelitian ini 16 dari 26 senyawa aktif flavonoid memiliki kesamaan residu asam amino dengan kontrol sebesar 100% yang diprediksikan bahwa senyawa aktif tersebut dapat menginhibisi adhesi bakteri *C.difficile* dengan cara melekat pada ikatan tyrosine sehingga bakteri tidak dapat melakukan adhesi yang menjadi permulaan infeksi, sehingga tidak didapatkan adanya invasi dan kolonisasi bakteri *C.difficile*.

Senyawa flavonoid bunga *H.sabdariffa* memiliki afinitas baik dalam membentuk ikatan dengan protein CD0873, hal ini dibuktikan dengan meninjau energi ikatan bebas. Afinitas senyawa flavonoid bunga *H.sabdariffa* ditinjau dari energi ikatan bebas terbukti 23 dari 26 senyawa aktif flavonoid memiliki energi ikatan bebas yang baik sehingga diprediksi dapat membentuk ikatan dengan protein target secara spontan dan menggantikan ikatan tyrosine pada active site protein CD0873. Sehingga tyrosine tidak dapat melekat pada struktur CD0873 dan tidak dapat mengaktivasi terjadinya proses adhesi bakteri *C.difficile*.

Senyawa aktif flavonoid kelopak bunga *H.sabdariffa* memiliki afinitas tinggi dalam berikatan dengan protein CD0873. Hasil *molecular docking* tersebut menandakan adanya potensi 3 senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* sebagai calon obat herbal terapi adjuvant infeksi *Clostridium difficile* sebagai anti-adhesi. Namun, perlu adanya penelitian lanjutan untuk mengkonfirmasi hasil prediksi di penelitian ini yang dilakukan secara *in vivo*.

KESIMPULAN

1. Senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* yaitu Quercetin-3-Rutinoside, Leucoside(kaempferol-3-O-sambubioside), Quercetin-3-Sambioside mampu

berikatan dengan CDD-1 β -Lactamase namun tidak pada residu yang sama dengan Cefotaxime sebagai kontrol.

2. Senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* mampu berikatan dengan CD0873 dengan Kaempferol-3-O-rutinoside (Nicotiflorin), Tiliroside, 5-Caffeoylquinic acid.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* dan *in vitro* potensi senyawa aktif kelopak bunga *H.sabdariffa* sebagai terapi adjuvant infeksi *Clostridium difficile* untuk lebih mengembangkan penelitian ini dikarenakan penelitian yang dilakukan mempunyai kelemahan yaitu memprediksi aktivitas senyawa aktif kelopak bunga Rosella dalam menghambat infeksi *Clostridium difficile* melalui inhibisi adhesi dan inhibisi enzim β -Lactamase.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada IOM (Ikatan Orangtua Mahasiswa) FK Unisma untuk pembiayaan insentif dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Abdallah E.M. 2016. Antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant Acinetobacter baumannii, J. Acute Dis. 5 (6) (2016) 512–516.
2. Damayanti D S, Nurdiana Kusuma M C, and Soeadmadji D W. 2019. The Potency Of Soursop Leaf Water Extract On Activating Glp-1r, Inhibiting Dpp4 And Foxo1 Protein Based On In Silico Analysis, International Journal Of Applied Pharmaceutics. 72–79.
3. Gateau C., Couturier J., Coia J., Barbut F. 2018. How to: diagnose infection caused by Clostridium difficile. Clin Microbiol Infect. 2018;24(5):463–468.
4. Gerding D.N., & Johnson S, eds. 2018. Clostridium difficile infection, including pseudomembranous colitis. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. 20th ed. New York, N.Y.: The McGraw-Hill Companies.
5. Kovacs-Simon A., Leuzzi R., Kasendra M., Minton N., Titball R.W., Michell S.L. 2014. Lipoprotein CD0873 is a novel adhesin of Clostridium difficile. J Infect Dis. 2014 Jul 15;210(2):274-84.

6. Neu HC (June 1969). "Effect of beta-lactamase location in *Escherichia coli* on penicillin synergy". *Applied Microbiology*. 17 (6): 783–6.
7. Riaz G, Chopra R.. 2018. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomed Pharmacother*. 102:575–586.
8. Saleh M.M., Frisbee A.L., Leslie J.L., Buonomo E.L., Cowardin C.A., Ma J.Z. 2019. Colitis-induced Th17 cells increase the risk for severe subsequent *Clostridium difficile* infection. *Cell Host Microbe* 25 756–765.e5.
9. Sauer EL, Sperry JH, Rohr JR. An efficient and inexpensive method for measuring long-term thermoregulatory behavior. *J Therm Biol* [Internet]. 2016;60:231–6.
10. Stewart N.K., Smith C.A., Toth M., Stasyuk A., Vakulenko S.B. 2019. The crystal structures of CDD-1, the intrinsic class D β -lactamase from the pathogenic Gram-positive bacterium *Clostridioides difficile*, and its complex with cefotaxime. *J Struct Biol*. 2019 Dec 1;208(3):107391.
11. Stewart N.K., Smith C.A., Toth M., Stasyuk A., Vakulenko S.B. 2019. The crystal structures of CDD-1, the intrinsic class D β -lactamase from the pathogenic Gram-positive bacterium *Clostridioides difficile*, and its complex with cefotaxime. *J Struct Biol*. 2019 Dec 1;208(3):107391.
12. Toth M., Antunes N.T., Stewart N.K., Frase H., Bhattacharya M., Smith C.A., Vakulenko S.B. 2016. Class D -lactamases do exist in Gram-positive bacteria. *Nat Chem Biol* 12:9–14
13. Toth M., Stewart N.K., Smith C., Vakulenko S.B. 2018. Intrinsic class D-lactamases of *Clostridium difficile*. *mBio* 9:e01803-18.
14. I. Borrás-Linares, S. Fernández-Arroyo, D. Arraez-Roman, P.A. Palmeros-Suarez, D.R Val-Díaz, I. Andrade-Gonzales, A. Fernández-Gutiérrez, J.F. Gómez-Leyva, A. Segura-Carretero, Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*), *Ind. Crop Prod.*69 (2015) 385-394.
15. A.G. Al-Hashimi, Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts, *Afr. J. Food Sci.* 6 (21) (2012) 506-511.