

Senyawa Flavonoid Dari Bunga *Hibiscus sabdariffa* dalam Menghambat Protein Biofilm *Klebsiella pneumoniae luxS* Dan *MrkH* : Studi *In Silico*

Fathnin Luthfia Hanifah, Yoyon Arif Martino, Rio Risandiansyah*
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan : Infeksi nosokomial *Klebsiella pneumoniae* diperantarai kemampuannya dalam membentuk biofilm. Pembentukan biofilm pada bakteri ini dapat menyebabkan resistensi antibiotik diperantarai oleh protein biofilm MrkH dan luxS. Senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa* dapat berpotensi sebagai antibiofilm, namun mekanisme efek antibiofilm tersebut terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* belum diketahui.

Infeksi nosokomial *Klebsiella pneumoniae* dalam kemampuannya membentuk biofilm dipengaruhi protein biofilm MrkH dan LuxS. Senyawa flavonoid dari bunga *Hibiscus sabdariffa* berpotensi sebagai agen antibiofilm, namun, mekanisme efek antibiofilm tersebut terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* belum diketahui.

Metode : Penelitian komputasi penambatan molekuler dengan perangkat lunak *pyRx* pada protein MrkH (5EJL) dengan C2E sebagai kontrol dan LuxS (5E68) dengan SRH sebagai kontrol. Penambatan dengan 7 Senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa*, kemudian Analisa hasil afinitas ikatan dibanding kontrol dilihat dari nilai energi ikatan bebas dan residu asam amino.

Hasil : Energi ikatan bebas dan kesamaan residu asam amino dengan kontrol didapatkan senyawa yang berpotensi sebagai antibiofilm terhadap protein target MrkH yaitu Tiliroside (ΔG -9,6 kkal/mol, 22%), quercetin-3-rutinoside (ΔG -9,0 kkal/mol, 33%), dan kaempferol-3-O-sambubioside (ΔG -9,0 kkal/mol, 33%), sedangkan pada protein LuxS yaitu Myricetin (ΔG -8,8 kkal/mol, 30%), Quercetin (ΔG -8,5 kkal/mol, 20%). Hal ini menunjukkan senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa* dapat berpotensi sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.

Kesimpulan : Senyawa flavonoid pada bunga *Hibiscus sabdariffa* berpotensi sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*. Dalam penelitian ini senyawa menunjukkan aktivitas potensinya yaitu, Tiliroside, quercetin-3-rutinoside, dan kaempferol-3-O-sambubioside melalui pengikatan langsung ke protein MrkH, sedangkan senyawa Myricetin dan Quercetin menunjukkan aktivitas potensinya pada protein LuxS.

Kata Kunci : Flavonoid; Antibiofilm; *Klebsiella pneumoniae*; *Hibiscus sabdariffa*; *In Silico*

*Korespondensi :

Rio Risandiansyah S.Ked. MP. Ph.D

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Alamat : Jl MT Haryono 193 Kota Malang, Jawa Timur, 65145

e-mail : riot123@yahoo.com

Potential of Flavonoid Compounds from *Hibiscus Sabdariffa* Flowers as Antibiofilm *Klebsiella pneumoniae* Protein LuxS And MrkH : Studi *In Silico*

Fathnin Luthfia Hanifah, Yoyon Arif Martino, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction : Nosocomial infection by *Klebsiella pneumoniae* is mediated by its ability to form biofilms. Biofilm formation can lead to antibiotic resistance, mediated by biofilm-related proteins MrkH and LuxS. Flavonoid from *Hibiscus sabdariffa* have potential as antibiofilm agents. However, the mechanism of their antibiofilm effect against *Klebsiella pneumoniae* remains unknown..

Method : Study computational molecular docking (using *pyRx*) was conducted on mrkH (5EJL) protein with native ligand C2E as control and LuxS (5E68) proteins with SRH as the control. A total of 7 flavanoid from *Hibiscus sabdariffa* flowers were docked and their binding affinity was evaluated in comparison to the control by assessing the binding free energy (ΔG) and amino acid residues involved.

Results: The binding free energy values and similarity of amino acid residue interactions with the control, flavonoid with potential antibiofilm activity against the MrkH target protein include Tiliroside (ΔG -9,6 kkal/mol, 22%), quercetin-3-rutinoside (ΔG -9,0 kkal/mol, 33%), dan kaempferol-3-O-sambubioside (ΔG -9,0 kkal/mol, 33%), while those showing potential activity against the luxS target protein include Myricetin (ΔG -8,8 kkal/mol, 30%), Quercetin (ΔG -8,5 kkal/mol, 20%). These findings indicate that flavonoid from *Hibiscus sabdariffa* flowers have potential as antibiofilm agents against *Klebsiella pneumoniae*,

Conclusion: Flavonoid in *Hibiscus sabdariffa* flower have high potential as antibiofilm. In this study, Tiliroside, quercetin-3-rutinoside, dan kaempferol-3-O-sambubioside showed potential antibiofilm activity against *Klebsiella pneumoniae* through direct binding to MrkH, while Myricetin and Quercetin showing potential through binding to LuxS.

Keywords : Flavonoid; Antibiofilm; *Klebsiella pneumoniae*; *Hibiscus sabdariffa*; *In Silico*

*Corresponding author :

Rio Risandiansyah, S.Ked. MP. Ph.D

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Address : Jl MT Haryono 193 Malang City, East Java Indonesia, 65145

e-mail : riot123@yahoo.com

PENDAHULUAN

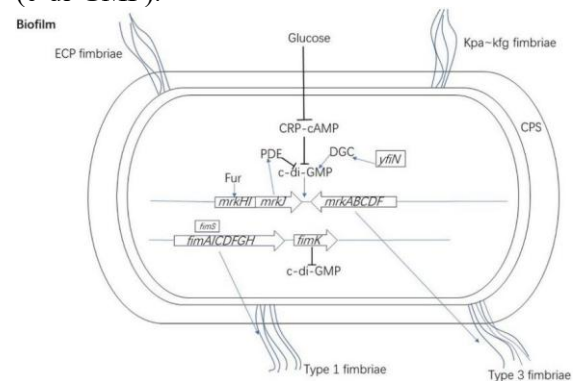
Klebsiella pneumoniae merupakan golongan bakteri gram negative, penyebab penyakit infeksi seperti infeksi saluran pernapasan bawah berupa pneumonia, infeksi saluran kemih (ISK), bakteremia, dan abses hati.^{1,2} *K. pneumoniae* merupakan salah satu spesies ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan spesies *Enterobacter*) yaitu patogen nosokomial dengan *multidrug resistant* (MDR) dengan virulensi yang semakin meningkat. Resistensi antibiotik pada bakteri *K. pneumoniae* semakin diperkuat oleh kemampuan pembentukan biofilm.³

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme melekat pada permukaan hidup atau tidak hidup, dapat ditemukan pada kulit, mukosa, dan gigi manusia.⁴ Struktur biofilm terdiri dari bakteri terbungkus matriks ekstraseluler yang terbuat dari protein, karbohidrat, dan materi genetik yang berasal dari bakteri itu sendiri serta dari inang.² Biofilm dapat melindungi patogen dari respons imun inang serta efek antipatogenik antibiotik sehingga dapat meningkatkan resistensi terhadap antibiotik, daya tahan bakteri, dan kesulitan penanganan pengobatan infeksi.⁵

Resistensi antibiotik adalah isu serius yang mengancam efektivitas pengobatan terhadap penyakit infeksi. Fenomena ini terjadi ketika bakteri atau mikroorganisme lainnya mengembangkan ketahanan terhadap efek antibiotik, sehingga hal ini dapat menyebabkan peningkatan durasi perawatan, risiko komplikasi yang lebih tinggi, serta biaya kesehatan yang meningkat.⁶ Diperkirakan bahwa *K. pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotik bertanggung jawab atas lebih dari 600.000 kematian di seluruh dunia pada tahun 2019.⁷ Penyebaran global strain *K. pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotik telah menjadi perhatian kritis, beberapa penelitian menyebutkan bahwa bakteri *Klebsiella pneumoniae* resisten terhadap antibiotik ceftriaxone, ampicilin dan gentamisin.¹

Gen yang terlibat dalam pembentukan biofilm *K. pneumoniae* meliputi fimbriae, polisakarida, sistem *Quorum Sensing* (QS), dan pompa efluks.³ Gen fimbriae pada pembentukan biofilm *K. pneumoniae* yaitu fimbriae tipe 3.⁸ Pengaktifan MrkH kemudian mendorong ekspresi *mrkABCDF* mengarah ke biosintesis fimbriae tipe 3.³ Fimbriae tipe 3 penting untuk keterikatan bakteri dalam

pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae*.⁸ Molekul sinyal sekunder 3',5'-cyclic diguanylic acid atau disebut juga *c-di-GMP* berikatan dengan C-terminal PilZ domain yang ada pada MrkH. Pengikatan ini menyebabkan perubahan konformasi MrkH dari tidak aktif menjadi aktif. MrkH yang aktif menyebabkan N-terminal DNA binding domain pada MrkH terbuka.⁹ Protein aktivator transkripsi MrkH berikatan dengan DNA pada promoter operon *mrkHI* dan promoter operon *mrkABCDF*. MrkH merekrut RNA polimerase untuk memulai transkripsi pada promoter *mrkHI* untuk secara otomatis mengaktifkan ekspresi *mrkH* dan operon *mrkABCDF* menghasilkan ekspresi protein penyusun fimbria tipe 3.³ Ekspresi komponen fimbriae tipe 3 terbukti diaktifkan dengan meningkatkan konsentrasi intraseluler dari second messenger, 3',5'-cyclic diguanylic acid (*c-di-GMP*).¹⁰

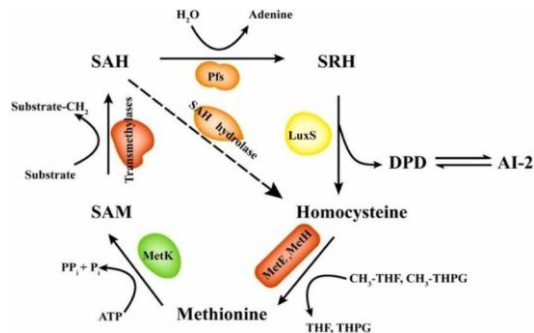


Gambar 1. Fimbriae Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae*

Pada sistem QS terdapat LuxS (S-ribosylhomocysteinase) berfungsi menghasilkan AI-2 (furanosil borat diester) pada *K. pneumoniae* terlibat dalam komunikasi bakteri.¹¹ *luxS* adalah komponen kunci dari jalur metabolisme *S-adenosyl-L-methionine* (SAM). *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) terjadi reaksi metilasi menghasilkan *S-adenosyl-L-homocysteine* (SAH), enzim Pfs menghidrolisis SAH menjadi adenin dan *S-ribosyl-homocysteine* (SRH), LuxS memecah SRH menjadi 4,5-dihydroxy-2,3-pentadione (DPD) dan homosistein. DPD mengalami reaksi isomerisasi menghasilkan bentuk struktural AI-2 yang aktif.¹²

LuxS meningkatkan biosintesis AI-2, AI-2 *transpor system* (*tqsA* dan *lsrCD*) yang mengatur ekspresi *wbbM* dan *wzm*. Peningkatan ekspresi protein *wbbM* dan *wzm* berhubungan dengan sintesis LPS, menunjukkan bahwa QS mempengaruhi pembentukan biofilm melalui LPS pada

Klebsiella pneumoniae. LPS dapat berinteraksi dengan komponen EPS dan LPS yang dilepaskan melalui outer membran vesicles (OMV) dapat memperkuat struktur biofilm sehubungan dengan sintesis LPS yang berperan dalam komposisi pembentukan biofilm.³



Gambar 2. Jalur Sintesis AI-2¹²

luxS adalah komponen kunci dari jalur metabolisme *S-adenosyl-L-methionine* (SAM). *S-adenosyl-L-methionine* (SAM) terjadi reaksi metilasi menghasilkan *S-adenosyl-L-homocysteine* (SAH), enzim Pfs menghidrolisis SAH menjadi adenin dan *S-ribosyl-homocysteine* (SRH), LuxS memecah SRH menjadi 4,5-dihydroxy-2,3-pentadione (DPD) dan homosistein. DPD mengalami reaksi isomerisasi menghasilkan bentuk struktural AI-2 yang aktif.¹²

Tanaman bunga *Hibiscus sabdariffa* L. memiliki beberapa manfaat diantaranya antioksidan, antidiabetes, antilipidemic, antihipertensi, imunomodulator, hepatoprotektif, diuretik, antimikroba, antiparasit, dan anti kanker.¹³ Senyawa aktif pada bunga ini yaitu tokoferol, asam fenolik, flavonoid dan asam malat.¹⁴ Senyawa flavonoid memiliki manfaat sebagai antimikroba, ada beberapa mekanismenya seperti penghambatan sintesis asam nukleat, penghambatan fungsi membran sel, dan penghambatan metabolisme energi.¹⁵ Flavonoid dapat menyebabkan kerusakan pada permeabilitas dinding sel bakteri serta komponen pada membran bakteri yang merupakan hasil dari interaksi yang terjadi antara flavonoid dan DNA bakteri.¹⁶

Penelitian oleh Mochsen (2022) secara *in silico* menunjukkan kandungan senyawa aktif bunga *Hibiscus Sabdariffa* berpotensi sebagai antibiofilm terhadap LasR didapatkan pada senyawa *Kaempferol-3-O-sambubioside* *P. aeruginosa*, tetapi efek anti biofilm terhadap bakteri *K. pneumoniae* belum diketahui.¹⁷

Penelitian ini dilakukan secara *insilico molecular docking* dengan menambatkan ligan dengan protein target biofilm MrkH dan LuxS

bakteri *K. pneumoniae*. Kemudian diamati bioaktivitas ligan senyawa aktif turunan flavonoid bunga *Hibiscuss sabdariffa* dengan protein melalui parameter jumlah energi ikatan bebas serta residu asam amino yang berinteraksi untuk menemukan apakah ada potensi sebagai antibiofilm terhadap bakteri *K. pneumoniae* dari senyawa aktif kelopak bunga *Hibiscus sabdariffa*.

METODE PENELITIAN

Desain dan Waktu Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode komputasi *In Silico* dengan penambatan molekuler terhadap protein biofilm target MrkH dan LuxS yang dilakukan pada bulan Desember 2024 sampai Januari 2025 di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Alat dan Bahan

Perangkat yang digunakan pada penelitian ini berupa laptop dengan spesifikasi RAM 12,00 GB, Intel® core™ i5, CPU @2.40 GHz, sistem operasi Microsoft Windows 10 Pro 64-bit yang tersambung dengan internet. Perangkat lunak yang digunakan yaitu PyRx, Pymol, dan BIOVIA Discovery Studio. Situs web Swiss-model, NCBI BLAST.

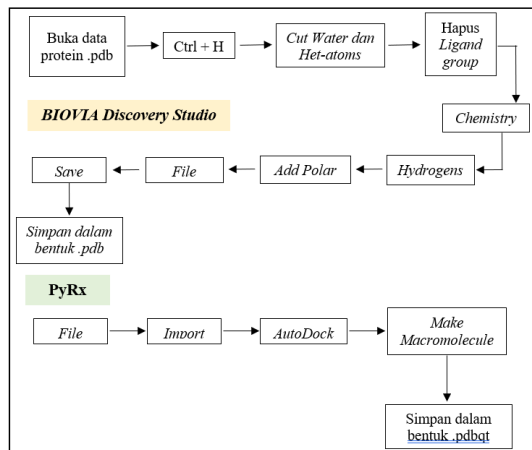
Bahan yang digunakan meliputi struktur tiga dimensi protein MrkH (5EJL) dan ligan alami C-di-GMP (C2E), Kode FASTA protein biofilm LuxS *K. pneumoniae* diunduh pada NCBI Genbank XKS93893.1, homologi protein dari template LuxS (5E68) dan ligan alami SRH serta senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa*.

Preparasi Protein MrkH dan LuxS

Pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang dipilih sebagai protein biofilm yaitu MrkH (5EJL) dan LuxS (5E68). Tahap preparasi protein diawali dengan mencari struktur protein target yaitu MrkH dan LuxS bakteri *Klebsiella pneumoniae*, struktur MrkH diperoleh dari situs web Protein Data Bank RCSB dalam bentuk PDB. Sedangkan untuk LuxS pada situs web NCBI, data sekuen LuxS dalam bentuk FASTA dimasukkan pada situs web SWISS-MODEL dan unduh dalam format .pdb.

Kemudian pada perangkat lunak BIOVIA Discovery Studio data protein dalam format .pdb dibuka dan dilakukan penghapusan komponen yang tidak dibutuhkan seperti molekul air, ligan grup, serta *het-atom* karena dapat mengganggu proses penambatan. Selanjutnya ditambahkan atom hidrogen polar yang memiliki fungsi dalam memperbaiki

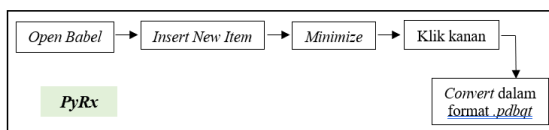
struktur protein dan mempersiapkannya untuk interaksi dengan ligan. Pada PyRx terdapat menu *Autodock* kemudian dipilih *make macromolekul* dan simpan dalam format *pdbqt*.¹⁸



Gambar 3. Alur Preparasi Protein

Preparasi Ligan

Buka situs web Pubchem unduh dengan format *.sdf*. Pada menu Open Babel yang terintegrasi dengan PyRx dan masukkan file ligan yang telah diunduh dengan format *.sdf*, minimasi energi pada struktur ligan dengan menekan minimize untuk mendapatkan konformasi yang stabil dan *Convert* menjadi format *pdbqt*.¹⁹



Gambar 4. Alur Preparasi ligan

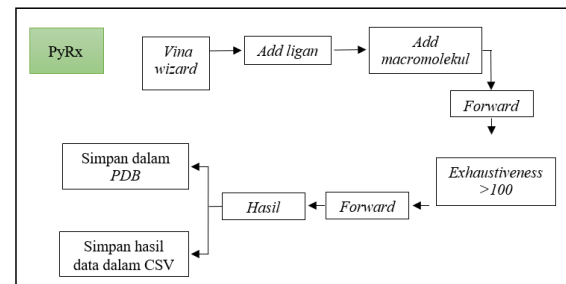
Penentuan Validasi

Validasi dilakukan dengan melakukan penambatan ulang pada ligan alami terhadap protein target dengan perangkat lunak PyRx. Parameter validasi penambatan molekuler ditentukan oleh nilai $\text{RMSD} \leq 3,0 \text{ \AA}$. Nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) memiliki tiga klasifikasi dalam penambatan molekuler. Klasifikasi terbaik adalah nilai $\text{RMSD} \leq 2 \text{ \AA}$, klasifikasi yang dapat diterima berada dalam rentang $2 \text{ \AA}$ hingga $3 \text{ \AA}$, sedangkan klasifikasi yang dianggap buruk adalah nilai $\text{RMSD} \geq 3 \text{ \AA}$.²⁰

Penambatan Molekuler Senyawa flavonoid Bunga *Hibiscus sabdariffa*

Penambatan molekuler menggunakan perangkat lunak PyRx. Buka menu *vina wizard* yang berintegrasi dengan PyRx, kemudian tambahkan ligan serta protein target lalu tekan

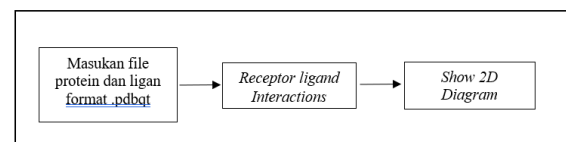
Forward. Pengulangan *exhaustiveness* sebanyak lebih dari 100 kali untuk hasil yang baik. Tunggu hingga hasil didapatkan dan simpan hasil dalam bentuk PDB dan nilai energi ikatan bebas dalam file.CSV.¹⁸



Gambar 5. Penambatan Molekuler

Visualisasi Hasil Penambatan

Hasil penambatan molekuler dapat divisualisasikan dengan menggunakan BIOVIA Discovery Studio dalam bentuk 3D atau 2D untuk melihat interaksi ligan dan residu asam amino yang berinteraksi beserta ikatannya pada active site protein.¹⁸



Gambar 6. Penambatan Molekuler

Analisa Hasil

Hasil dari penambatan molekuler dianalisa berdasarkan energi ikatan bebas (ΔG) serta residu asam amino. Nilai ΔG yang lebih rendah menunjukkan bahwa ikatan yang terbentuk semakin stabil dan bersifat spontan. Adanya residu asam amino antara ligan dan reseptor mengindikasikan bahwa ligan tersebut dapat menghambat aktivitas protein target. Sebuah senyawa dapat dianggap memiliki kemampuan yang sebanding dengan kontrol jika terdapat kesamaan pada residu asam amino di dalam protein reseptor.²¹

HASIL PENELITIAN

Hasil penambatan molekuler disajikan dalam energi ikatan bebas dan residu asam amino (Tabel 1).

Berdasarkan hasil penelitian penambatan molekuler diketahui hasil kontrol C2E dengan protein target MrkH memiliki energi ikatan bebas dengan nilai $-9,0 \text{ kkal/mol}$ dan jumlah residu asam amino sebanyak 9 residu yang terdiri dari interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik.

Tabel 1. Hasil Docking Molekular Antara Ligan (*Kaemferol-3-O-sambubioside*, *Kaemferol-3-O-rutinoside*, *Quercetin-3-rutinoside*, *Quercetin-3-glucoside* dan *Ciprofloxacin*)

Ligand	Protein	Energi ikatan bebas (kkal/mol)	Interaksi residu asam amino	Persamaan residu asam amino (%)
Kaemferol sambubioside	LuxS	-6,9	Hidrogen konvensional: ASP141, VAL47, GLU148 Hidrogen karbon: PRO49, ASP141 Elektrostatik pi cation: ARG144 Elektrostatik pi anion; ASP141	0%
	MrkH	-9,0	Hidrogen konvensional: ARG107, SER1, LYS72, HIS67 Hidrogen karbon: ARG111 Hidrofobik pi-pi T-shaped: HIS67 Hidrofobik pi-alkil: LYS72 Elektrostatik pi kation: ARG107 Elektrostatik pi anion: GLU26	33%
Kaemferol rutinoside	LuxS	-7,0	Hidrogen karbon: GLU46 Hidrofobik pi alkil: ILE142, MET48, PRO49 Hidrofobik pi-pi Tshaped: HIS145	0%
	MrkH	-9,1	Hidrogen konvensional: SER203, ARG107, VAL104, ARG106, GLN205 Hidrogen karbon: SER203 Hidrofobik alkil: LYS182 Hidrofobik pi-alkil: LYS72 Elektrostatik pi kation: ARG111 Unfavorable donor-donor: ASN183	0%
Quercetin-3-rutinoside	LuxS	-6,3	Hidrogen konvensional: GLU148, ARG144, HIS145, PHE40, CYS41 Hidrofobik pi alkil: PRO49, ILE142 Hidrofobik pi-pi stacked: HIS145	0%
	MrkH	-9,0	Hidrogen konvensional: ARG107, ARG113, LYS72, GLN105 , SER1, SER68 Hidrofobik pi alkil: ARG111, ARG113 Elektrostatik pi-kation: ARG107	33%
Quercetin-3-glucoside	LuxS	-8,4	Hidrogen konvensional: PRO121, ALA22 Hidrogen karbon: GLU57, CYS128 Hidrofobik pi alkil: ALA22 Hidrofobik pi-pi stacked: TYR88 Elektrostatik pi anion: GLU122	0%
	MrkH	-7,9	Hidrogen konvensional: VAL104, ARG106, SER68 Hidrogen karbon: GLN105 Hidrofobik pi-alkil: LYS72 Hidrofobik amide-pi stacked: HIS67 Elektrostatik pi anion: GLU26 Elektrostatik pi kation: ARG107	22%
Myricetin	LuxS	-8,8	Hidrogen konvensional: LYS23, ALA22, SER6, TYR88 , GLU57 , HIS58 Hidrofobik pi-pi Tshaped: TYR88 Unfavorable donor-donor: ARG65, CYS83	30%
	MrkH	-7,2	Hidrogen konvensional: ARG111, SER140, ARG108, GLN205, GLY142 Hidrofobik pi-alkil: ARG106 Elektrostatik pi kation: ARG111	05
Tiliroside	LuxS	-7,0	Hidrogen konvensional: ILE142, GLU148, ARG144, ASP141 Hidrofobik pi alkil: MET48, ILE142 Hidrofobik Pi-pi Tshaped: HIS145 Elektrostatik pi anion: GLU46 Lain-lainnya: CYS41	0%

Quercetin	MrkH	-9,6	Hidrogen konvensional: HIS67 , LYS137, ARG113, ARG111, ARG106	22%
			Hidrofobik pi-sigma: ILE187	
			Hidrofobik pi-alkil: LYS72	
			Elektrostatik pi anion: GLU26	
			Elektrostatik pi kation: ARG107	
Quercetin	LuxS	-8,5	Unfavorable acceptor-acceptor: ASP138	20%
			Hidrogen konvensional : CYS83, GLU57 , TYR88 , ALA22	
			Hidrofobik pi alkil: LYS23	
			Hidrofobik pi-pi Tshaped: TYR88	
			Unfavorable donor-donor: GLY82	
Quercetin	MrkH	-7,6	Hidrogen konvensional: LYS72, ARG107, ARG113, SER68 , GLN105 , SER1	33%
			Hidrofobik pi-alkil: ARG113, ARG111	
			Elektrostatik pi kation: ARG107	
			Unfavorable donor-donor: ARG115	
			Hidrogen konvensional: HIS67, SER68, GLN105, ASP69	
C2E	MrkH	-9	Hidrogen karbon: ARG111	
			Hidrogen Pi-donor: SER1	
			Hidrofobik pi-pi T shaped: HIS67	
			Elektrostatik pi kation: ARG107, ARG115, ARG113	
			Hidrogen: GLU122, HIS54, LEU3, CYS128, HIS58, TYR88, GLU57, GLN127	
SRH	LuxS	-7,8	Hidrogen karbon: CYS128	
			Hidrofobik pi alkil; HIS58	
			Unfavorable donor-donor: HIS11, ARG39	

Keterangan : Tabel 1 Menunjukkan hasil penambatan molekul senyawa flavonoid terhadap protein LuxS dan MrkH. Penelitian menggunakan pendekatan kontrol pembandingan (C2E dan SRH), sehingga residu asam amino senyawa aktif (**teks bold**) dianggap memiliki kesamaan residu dengan kontrol. Persentase residu didapat dari Kesamaan interaksi residu asam amino dengan kontrol.

Terdapat 6 residu ikatan hidrogen yang terdiri dari tiga jenis ikatan hidrogen, yaitu Ikatan hidrogen karbon residu ARG111, Ikatan pi-donor hidrogen residu SER1, serta Ikatan hidrogen konvensional pada HIS67, SER68, ASP69 dan GLN105. Selain itu, terdapat interaksi ikatan pi-pi T-shaped pada residu HIS67 dan ikatan pi cation pada ARG107, ARG115, ARG113. Residu asam amino HIS67 terlibat dalam dua jenis interaksi ikatan, yaitu ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrofobik pi-pi T-shaped.

Hasil penambatan kontrol SRH terhadap protein target LuxS memiliki energi ikatan bebas sebesar -7,8 kkal/mol dan jumlah residu asam amino sebanyak 10 residu yang terdiri dari interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan lainnya. Terjadi 2 jenis interaksi ikatan hidrogen, yaitu ikatan hidrogen konvensional pada GLU122, HIS54, LEU3, CYS128, HIS58, TYR88, GLU57, GLN127 dan Ikatan hidrogen karbon pada residu CYS128. Selain itu terdapat ikatan hidrofobik pi alkil pada HIS58 serta unfavorable donor-donor pada HIS11 dan ARG39. Residu HIS58 dan CYS128 terlibat dalam dua jenis interaksi,

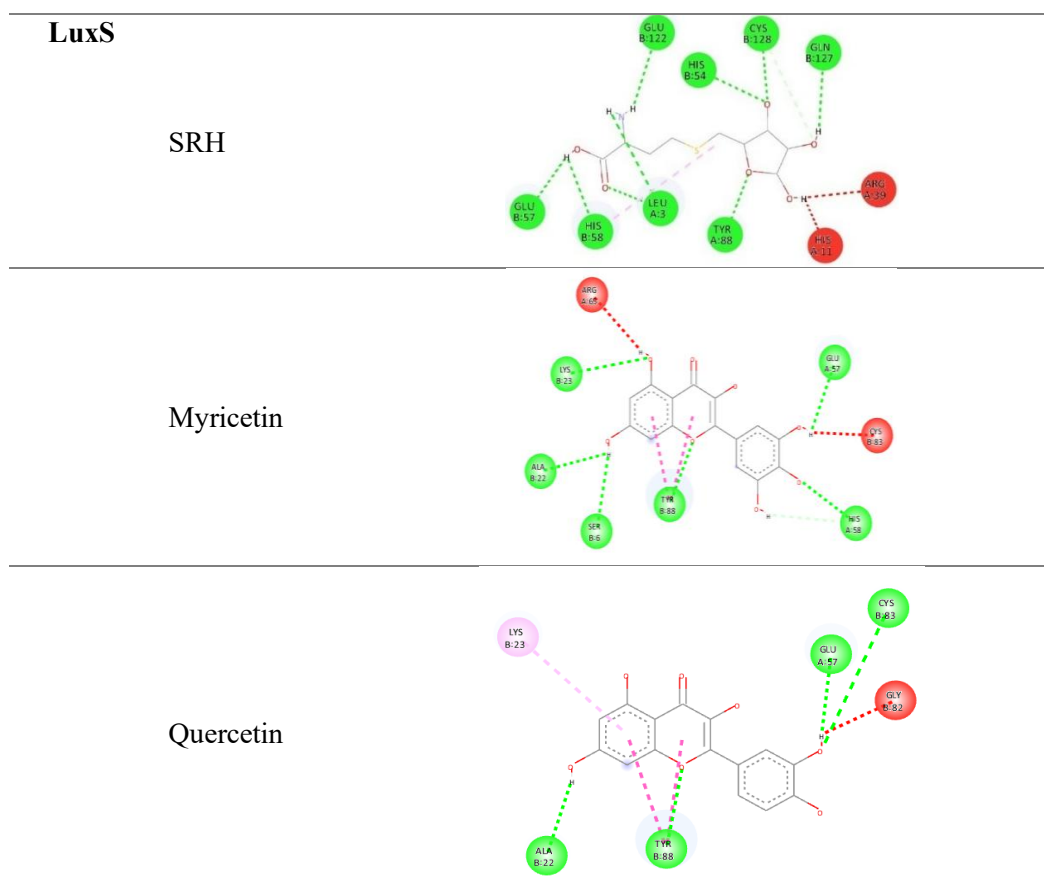
yaitu pada residu HIS58 ada ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrofobik Pi-alkil. Sedangkan pada CYS128 ada ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrogen karbon.

Hasil uji validasi ligan C2E menunjukkan nilai rata-rata RMSD sebesar 2,690 Å, telah memenuhi syarat valid dan dapat diterima karena berada dalam rentang 2 Å hingga 3 Å. Sedangkan hasil uji validasi ligan alami SRH dengan protein target LuxS menunjukkan nilai rata-rata RMSD sebesar 1,887 Å, dapat dinyatakan valid dan termasuk dalam klasifikasi terbaik dengan nilai RMSD $\leq$.²⁰

Parameter penentuan hasil penambatan molekuler melalui afinitas berdasarkan dari energi ikatan bebas dan residu asam amino. Semakin kecil nilai energi bebas yang dihasilkan maka semakin kuat ikatannya. Energi ikatan bebas menunjukkan kemampuan untuk mengikat dengan kuat. Sedangkan keberadaan residu asam amino dalam interaksi antara ligan dan reseptor menunjukkan bahwa ligan tersebut memiliki aktifitas pada sisi aktif protein target.²¹

Tabel 2. Visualisasi 2D Hasil Penambatan Senyawa Flavonoid Terbaik dengan Protein Target

Protein MrkH	Ligan	Visualisasi 2D
C2E		
Tiliroside		
quercetin-3-rutinoside		
kaempferol-3-O-sambubioside		



PEMBAHASAN

Validasi ligan alami terhadap Protein MrkH dan LuxS

Validasi dengan redocking ligan alami pada penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 8 kali dan didapatkan rata-rata nilai RMSD. Diperoleh hasil validasi ligan alami C2E atau yang disebut juga c-di-GMP menunjukkan nilai rata-rata RMSD sebesar 2,690 Å terhadap protein MrkH dan ligan alami SRH menunjukkan nilai RMSD sebesar 1,887 Å terhadap protein LuxS, keduanya menunjukkan nilai RMSD $\leq 3,0$ Å yang masih berada dalam batas valid.²⁰

Afinitas Senyawa Flavonoid Tiliroside, Quercetin-o-rutinoside, dan Kaempferol-3-O-sambubioside. terhadap protein target MrkH

Berdasarkan hasil penambatan molekuler dari 7 senyawa flavonoid, didapatkan 3 senyawa terbaik yaitu Tiliroside, Quercetin-o-rutinoside, dan Kaempferol-3-O-sambubioside.

Tiliroside memiliki afinitas ikatan yang tinggi terhadap protein target MrkH bakteri *Klebsiella pneumoniae*, dengan nilai energi ikatan bebas sebesar -9,6 kkal/mol dan persamaan residu asam amino dengan kontrol sebesar 22%. Nilai energi ikatan bebas lebih

kecil dibandingkan dengan kontrol ligan alami C2E menunjukkan adanya ikatan yang lebih kuat dan lebih stabil antara ligan tiliroside dan protein MrkH. Residu asam amino yang memiliki kesamaan dengan kontrol C2E sebanyak 2 residu, terdapat pada residu HIS67 dan ARG107. Pada residu HIS67 interaksi ikatan hidrogen terbentuk akibat adanya donor atom O yang mengikat pada residu HIS67. Residu ARG107 menunjukkan interaksi ikatan pi-kation yang merupakan jenis interaksi non-kovalen yang terjadi antara muatan positif pada gugus guanidium arginin. Ditemukannya kesamaan pada residu asam amino jika dibandingkan dengan kontrol, menunjukkan bahwa ligan berikatan pada sisi aktif yang sama seperti kontrol.²¹ Pada penelitian sebelumnya secara *in silico* ditemukan kandungan senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa* yang memiliki potensi sebagai antibiofilm terhadap protein target DisA pada bakteri *Enterococcus faecalis* yaitu senyawa flavonoid tiliroside yang dibanding kontrol memiliki afinitas lebih baik.²²

Quercetin-3-rutinoside memiliki nilai energi ikatan bebas yang sama dengan kontrol C2E yaitu sebesar -9,0 kkal/mol dan persamaan residu asam amino sebesar 33% dibandingkan dengan kontrol C2E. Pada quercetin-3-

rutinoside terdapat residu asam amino yang memiliki kesamaan dengan kontrol C2E yaitu sejumlah 3 residu asam amino, kesamaan ditemukan pada residu SER68, GLN105, dan ARG107.

kaempferol-3-O-sambubioside, senyawa ini memiliki nilai energi ikatan bebas sebesar -9,0 kkal/mol dan persamaan residu asam amino sebesar 33% dibandingkan dengan kontrol C2E. Hal ini menunjukkan afinitas sama kuat dan memiliki kesamaan sejumlah 3 residu pada pengikatan sisi aktif dengan kontrol C2E. Pada kesamaan residu senyawa kaempferol-3-O-sambubioside dengan kontrol C2E menunjukkan interaksi ikatan hidrogen, ikatan hidrofobik, dan ikatan elektrostatik pi cation. Residu HIS67 terlibat dalam dua jenis interaksi ikatan, yaitu ikatan hidrogen konvensional dan ikatan hidrofobik pi-pi T-shaped. Ikatan hidrogen karbon yang sama dengan kontrol ada pada residu ARG111. Ikatan pi cation didapatkan pada ARG107, interaksi yang terjadi merupakan ikatan non-kovalen antara muatan positif pada gugus guanidium arginin.

Pada penelitian sebelumnya secara *in silico* ditemukan kandungan senyawa flavonoid bunga *Hibiscus sabdariffa* yang memiliki potensi sebagai anti-biofilm terhadap protein target *LasR* yang ada pada sistem *quorum sensing* dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan pada senyawa flavonoid Quercetin-3-rutinoside dan Kaempferol-3-O-sambubioside.²³

Afinitas Senyawa Myricetin dan Quercetin terhadap LuxS

Senyawa myricetin memiliki afinitas ikatan yang kuat terhadap protein target LuxS pada *Klebsiella pneumoniae*, dengan energi ikatan bebas sebesar -8,8 kkal/mol. Nilai ini lebih rendah dan lebih stabil dibandingkan dengan kontrol SRH, sekaligus memiliki 30% kesamaan ikatan residu asam amino di TYR88, GLU57, dan HIS58 dibandingkan dengan kontrol. Senyawa flavonoid menunjukkan aktivitas dalam merusak biofilm. Mekanisme kerja flavonoid sebagai agen perusak biofilm adalah melalui interaksi gugus hidroksil pada struktur flavonoid yang berikatan dengan protein yang terdapat dalam biofilm, sehingga membentuk senyawa kompleks yang menyebabkan denaturasi biofilm.²⁴ Namun, belum ada jurnal yang membahas senyawa ini secara spesifik perannya sebagai antibiofilm.

Quercetin yang menunjukkan afinitas ikatan yang tinggi terhadap protein target LuxS pada *Klebsiella pneumoniae*, nilai energi ikatan

bebas sebesar -8,5 kkal/mol dan persamaan residu asam amino 20% dengan kontrol SRH, yang menunjukkan kestabilan kompleks ligan-protein yang baik. Senyawa ini menunjukkan interaksi sama dengan kontrol SRH pada residu asam amino interaksi ikatan hidrogen konvensional residu GLU57 dan TYR88, yang mengindikasikan bahwa senyawa ini menempati atau berinteraksi di sisi aktif yang sama. Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa senyawa quercetin bermanfaat sebagai senyawa flavonoid antibiofilm terhadap *Streptococcus mutans* dalam pencegahan karies gigi. Efektivitas suatu senyawa sebagai antibiofilm dapat diukur menggunakan parameter MBIC (*Minimum Biofilm Inhibition Concentration*) pada konsentrasi 8 mg/ml.²⁵

Berdasarkan hasil afinitas ikatan yang kuat pada senyawa serta terdapat residu asam amino yang sama dengan ligan alami yang digunakan sebagai kontrol, menunjukkan senyawa Tiliroside, quercetin-3-rutinoside, dan kaempferol-3-O-sambubioside, Myricetin dan Quercetin beraktivitas dengan sisi aktif protein target dan menunjukkan potensinya sebagai senyawa antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.

Kekurangan Dan Kelebihan Penelitian

Kelebihan Penelitian didapatkan hasil bahwa terdapat senyawa flavonoid yang ada pada bunga *Hibiscus sabdariffa* memiliki potensi sebagai senyawa antibiofilm terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara penambatan molekuler didapatkan dari hasil potensi afinitas dan aktivitas pada sisi aktif protein target, penelitian ini dapat menjadi dasar pondasi pengembangan referensi senyawa flavonoid sebagai tanaman antibiofilm. Kekurangan penelitian yaitu penggunaan hanya 2 parameter pada penelitian mengakibatkan sulit untuk menganalisa lebih mendalam terhadap senyawa uji, sehingga untuk penelitian selanjutnya disarankan menambahkan parameter lain seperti konstanta inhibisi dan interaksi permukaan.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Senyawa flavonoid pada bunga *Hibiscus sabdariffa* berpotensi sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*. Dalam penelitian ini senyawa menunjukkan aktivitas potensinya yaitu, Tiliroside, quercetin-3-rutinoside, dan kaempferol-3-O-sambubioside melalui pengikatan langsung ke protein MrkH, sedangkan senyawa Myricetin dan Quercetin

menunjukkan aktivitas potensinya pada protein LuxS.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dikerjakan, mampu diusulkan saran melakukan penelitian penambatan molekuler lanjutan dengan menambahkan parameter konstanta inhibisi (ki) dan luas permukaan

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah mendanai penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- Rosiana PDI, Widyantara AB, Ulfah IA. Gambaran Uji kepekaan Antibiotik Ceftriaxone dan Gentamycin terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada Pasien Dewasa. 2024;5(September):8492–8.
- Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP, et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022;12(May):1–13.
- Li Y, Ni M. Regulation of Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*. 2023;14(September):1–12.
- Varma A, Warghane A, Dhiman NK, Paserkar N, Upadhye V, Modi A, et al. The Role of Nanocomposites Against Biofilm Infections in Humans. *Front Cell Infect Microbiol*. 2023;13(February):1–16.
- Núñez P, Misic C, Cutroneo L, Capello M, Medina R, Besio G. Biofilm-induced Bffect on the buoyancy of Plastic Debris: An Experimental Study. *Mar Pollut Bull*. 2023;193(May).
- Kemenkes RI. Kenapa Bisa Resistensi Antibiotik? Kemenkes Direktorat Jenderal Pelayanan Kesehatan. 2023.
- World Health Organisation. Antimicrobial Resistance. *World Health Organ*. 2021;2030(October):1–7.
- Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of Type 1 and Type 3 Fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation. *BMC Microbiol*. 2010;10(June).
- Wilksch JJ, Yang J, Clements A, Gabbe JL, Short KR, Cao H, et al. MrKH, a Novel c-di-GMP-Dependent Transcriptional Activator, Controls *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Formation by Regulating Type 3 Fimbriae Expression. *PLoS Pathog*. 2011;7(8).
- Schumachera MA, Zenga W. Structures of the Activator of *K. pneumonia* Biofilm Formation, *MrkH*, Indicates *PilZ* Domains Involved in c-di-GMP and DNA Binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(36):10067–72.
- Santajit S, Sookrung N, Indrawattana N. Quorum Sensing in ESKAPE Bugs: A Target for Combating Antimicrobial Resistance and Bacterial Virulence. *Biology (Basel)*. 2022;11(10).
- Meng F, Zhang F, Chen Q, Yang M, Yang Y, Li X, et al. Virtual Screening and in vitro Experimental Verification of LuxS Inhibitors from Natural Products for *Lactobacillus reuteri*. *Biomed Pharmacother*. 2022;147:112521.
- Islami AB, Yahya A, Hakim R. Studi In Silico: Potensi Antiadhesi Senyawa Flavonoid Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) dalam Berikatan dengan Protein Adhesin GbpA *Vibrio cholerae*. *J Kedokt Komunitas*. 2021;9:1–8.
- Abdallah EM. Antibacterial Efficiency of the Sudanese Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.), A Famous Beverage from Sudanese Folk Medicine. *J Intercult Ethnopharmacol*. 2016;5(2):186–90.
- Hendra, R. ‘Flavonoid Analyses And Antimicrobial Activity Of Various Parts Of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit’, *International Journal of Molecular Sciences*, 2022.3422–3431
- Cushnie, T.P.T. and Lamb, A.J. ‘Antimicrobial Activity Of Flavonoids’, *International Journal Of Antimicrobial Agents*. Elsevier, 2005 343–356,
- Tinggi S, Muhammadiyah F. Studi Homologi Medeling Enzim Tironase (*Homo Sapiens*) dengan Menggunakan Swiss-Model. 2019;VI(1):1–7.
- Ayodele, P. F., et al. Illustrated Procedure To Perform Molecular Docking Using PyRx And Biovia Discovery Studio Visualizer: A Case Study Of 10kt With Atropine. *Progress In Drug Discovery & Biomedical Science* 2020
- Soudani, W., Haddadj-Aoul, F. Z., Bouachrine, M., & Zaki, H. Molecular Docking Of Potential Cytotoxic Alkylating Carmustine derivatives 2-chloroethylnitrososulfamides Analogues Of 2-chloroethylnitrosoureas 2020 (1):1–

- 7.
20. Ramírez, D., & Caballero, J. Is It Reliable to Take the Molecular Docking Top Scoring Position as the Best Solution without Considering Available Structural Data Molecules, 2020.23(5), 1038
21. Arfi, A.S., Lestari, R.D. and Damayanti, D.S. Studi In Silico Senyawa Aktif Rimpang Kunyit (*Curcuma Domestica*) Terhadap Penghambatan *Acetylcholinesterase*, *Microtubulin* (Beta Tubulin), Dan Aktivasi Calcium Channel Sebagai Terapi Antelmintik', *Universitas Islam Malang*, 2020 pp. 36–47
22. Akmalia, R.D., Reza hakim and Rio RisandiansyahPotensi Senyawa Aktif Bunga Rosela (*Hibiscus Sabdariffa*) Sebagai Penghambat Protein Adhesi Prgb Dan Protein Biofilm DisA Dari Bakteri *Enterococcus faecalis*', 2022
23. Mochsen II, Bintari YR, Risandiansyah R. *Kaempferol-3-O-Sambubioside* dari Bunga *Hibiscus sabdariffa* Mampu Menghambat Protein Binding Galactose(*LecA*) dan Transcriptional Activator (*LasR*) *Pseudomonas aeruginosa* : Studi In *Kaempferol-3-O-Sambubioside* from *Hibiscus sabdariffa* Flower Can Inhibit. **J Kedokt Komunitas**. 2022;10(2).
24. Winarsih, S., Khasanah, U. and Alfatah, A.H.'Aktivitas Antibiofilm Fraksi Etik Asetat Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) Pada Bakteri *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) Secara *In Vitro*', **Jurnal Majalah Kesehatan**, 2019.6(2), pp. 76–85.
25. Zeng Y. (in vitro biofilm) Activity of Quercetin And Kaemferol Against *Streptococcus mutans* Biofilm. *Arch Oral Biol*. 2019,