

Aktivitas Antibakteri Sponge Agelas Nakamurai Terhadap Bakteri Gram Negative: Study *In Vitro* dan *In Silico*

Antibacterial Activity of Sponge Agelas Nakamurai Against Gram Negative Bacteria: In Vitro and In Silico Study

Walter Balansa^{1*}, Lis C. Lukas¹, Frets J. Rieuwpassa², Aprelia M. Tomaso¹

¹Program Studi Teknologi Budidaya Ikan, Politeknik Negeri Nusa Utara

²Program Studi Pengolahan dan Penyimpanan Hasil Perikanan, Politeknik Negeri Nusa Utara.

Korespondensi : email : walterbalansa@polnustar.ac.id

(Diterima November 2022 /Disetujui April 2023)

ABSTRACT

Gram negative bacteria remain a serious threat to aquaculture, the economy and human health. Ironically, while effective antibiotics have not yet been discovered, the resistance of these bacteria to various antibiotics is increasing at alarming pace. This indicates the urgency of discovering new antibiotics, especially antibiotics that can inhibit the replication of enzymes such as topoisomerase IV. The purpose of this research was to investigate antibacterial potential of Agelas nakamurai against *A. hydrophila*, *A. salmonicida* and *E. tarda* using the sponge's extracts (1, 10, and 100 mg/mL) and tetracycline (1 mg/mL) and to predict antibacterial potential of agelasine A-F (1-6) and agelasidine A (7) from Sangihe's Agelas sponge against topoisomerase IV protein through molecular docking. The *in vitro* test was carried out using the Kirby Bauer method with slight modifications and *in silico* study using CB-dock 2 and Protein Ligand Interaction Profiler. Although the extract showed weaker antibacterial activity against *A. hydrophila*, *A. salmonicida* and *E. tarda* than tetracycline, molecular docking with CB-dock 2 showed that agelasine A-F (1-6) and agelasidine A (7) had stronger binding affinity (-7.1 to -8.6 kJ/mol) than tetracyclines (10), ciprofloxacin (11) or levofloxacin (12) (-6.6 to -8.3 kJ/mol). Molecular docking on agelasidine C (9) and D (10) also showed strong binding affinities (-8.3 and -8.8 kJ/mol) to the 1S16 target protein mainly due to hydrogen bonding and hydrophobic interactions. Collectively, the result showed the potential for agelasidine A, C and D as modulators of the emerging antibacterial target, the topoisomerase IV enzyme.

Keywords: antibacterial, Gram negative bacteria, Agelas nakamurai, docking moleculer.

ABSTRAK

Bakteri gram negatif tetap menjadi ancaman serius bagi akuakultur, ekonomi, dan kesehatan manusia. Ironisnya, sementara antibiotik yang efektif belum ditemukan, resistensi bakteri ini terhadap berbagai antibiotik meningkat dengan kecepatan yang mengkhawatirkan. Hal ini menunjukkan urgensi penemuan antibiotik baru, terutama antibiotik yang dapat menghambat replikasi enzim seperti DNA gyrase atau topoisomerase IV, yang saat ini menjadi target baru penemuan antibiotik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibakteri Agelas nakamurai terhadap *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda* menggunakan ekstrak spons (1, 10, dan 100) mg/mL dan tetrasiklin (1 mg/mL) sebagai kontrol positif dan memprediksi potensi antibakteri dari agelasine A-F (1-6) dan agelasidine A (7) dari *A. nakamurai* dari Kepulauan Sangihe terhadap protein topoisomerase IV melalui docking molekuler. Uji *in vitro* dilakukan dengan menggunakan metode Kirby Bauer dengan sedikit modifikasi dan studi *in silico* menggunakan CB-dock 2 dan Protein Ligand Interaction Profiler. Meskipun ekstrak menunjukkan aktivitas antibakteri yang lebih lemah terhadap *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda* dibandingkan tetrasiklin, molekul docking dengan CB-dock 2 menunjukkan bahwa agelasine A-F

(1-6) dan agelasidin A (7) memiliki afinitas pengikatan yang lebih kuat (-7.1). hingga -8,6 kJ/mol) daripada tetrasiklin (10), ciprofloksasin (11) atau levofloksasin (12) (-6,6 hingga -8,3 kJ/mol). Docking molekul pada agelasidin C (9) dan D (10) juga menunjukkan afinitas pengikatan yang kuat (-8,3 dan -8,8 kJ/mol) ke protein target 1S16 terutama akibat ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Secara kolektif, hasil ini menunjukkan potensi agelasidin A, C dan D sebagai modulator dari target antibiotik baru, enzim topoisomerase IV.

Kata kunci: antibakteri, bakteri Gram negatif, *Agelas nakamura*, docking moleculer

PENDAHULUAN

Bakteri-bakteri Gram negatif seperti *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Edwardsiella tarda* adalah tiga patogenik ikan utama (Pridgeon & Klesius, 2012). Gejala-gejala infeksi oleh ketiga jenis bakteri ini termasuk pembengkakan pada bagian perut, luka di bagian sirip dan ekor pada ikan lele dan mas dan penyakit edwardsiellosis pada ikan lele yang terinfeksi *E. tarda* (Meidiza et al., 2017), penyakit MAS (Motil *Aeromonas Septicemia*) pada ikan nila terinfeksi *A. hydrophila* (Triyaningsih et al., 2014) dan frunculosis pada ikan mas terinfeksi *A. salmonicida* (Wintoko et al., 2013). Menurut perkiraan, infeksi tiga bakteri ini dan 11 genus bakteri patogen ikan lainnya adalah penyebab kerugian ratusan juta dolar Amerika di bidang budidaya ikan di seluruh dunia setiap tahunnya (Pridgeon & Klesius, 2012).

Ironisnya, ancaman menakutkan dari infeksi bakteri-bakteri patogen belum disertai dengan penemuan antibiotik baru (Rogers et al., 2012). Dalam 5 dekade terakhir, para ilmuwan hanya berhasil mengembangkan 3 jenis antibiotik baru (Abad et al., 2011). Alasannya, para peneliti lebih memilih mengembangkan obat melalui sintesa molekul di laboratorium daripada isolasi molekul dari bahan alam. Hasilnya ialah hanya 1 obat yang berhasil dikembangkan dalam 25 tahun, sangat mencolok jika dibandingkan dengan bahan alam yang menyumbang 80% obat antikanker dan antibiotik (Newman & Cragg, 2004).

Akibatnya, belakangan ini peneliti-peneliti kembali mengkaji bahan alam sebagai sumber obat secara intensif dengan invertebrata laut sebagai salah satu target utama. Hingga tahun 2010, sebanyak ~15.000 molekul telah ditemukan dari sponge (Mehubub et al., 2014) saja dan >300 molekul dari teripang laut (Mondol et al., 2017). Banyak dari molekul itu termasuk dari sponge *A. nakamura* menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri-bakteri Gram positif, jamur dan virus (Indraningrat et al., 2016). Tetapi informasi ilmiah serupa masih sangat terbatas untuk bakteri-bakteri patogenik ikan Gram negatif, penyebab kerugian ekonomi sangat besar di bidang budidaya ikan seperti *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda*. Terlebih penting lagi, pengujian antibakteri yang kami lakukan sebelumnya membuktikan bahwa *A. nakamura* dari perairan Kabupaten Sangihe mengandung 7 molekul terpena alkaloid disebut agelasine A-F (1-6) dan agelasidine A (7). Beberapa jenis molekul agelasine telah dilaporkan sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif (Balansa et al., 2020; Riyanti et al., 2020). Meskipun begitu, hingga sekarang belum ada penelitian tentang aktivitas agelasines terhadap topoisomerase IV, target antimikroba yang sedang banyak menarik perhatian peneliti. Padahal, akses untuk target protein maupun studi *in silico* sangat memungkinkan untuk penelitian sedemikian.

Jadi, penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas ekstrak kasar dari sponge *A. nakamura* terhadap tiga bakteri ikan Gram negatif *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda*. Selain itu, penelitian ini juga berfokus pada pengujian secara *in silico* kandungan molekul *A. nakamura* dari perairan Kabupaten Sangihe yaitu Agelasine A-F (1-6) dan agelasidine C (7) terhadap target protein *E. coli* topoisomerase IV (1S16). Melalui kombinasi pendekatan ini diharapkan dapat menyingkap pengetahuan tentang aktivitas ekstrak kasar *A. nakamura* terhadap tiga jenis bakteri ikan Gram negatif maupun potensi metabolit dari sponge ini atau derivatnya sebagai modulator topoisomerase IV, salah satu target menjanjikan untuk penemuan antibiotik baru.

MATERI DAN METODE

Penyiapan ekstrak kasar sponge. Ekstrak kasar sponge disiapkan dengan memotong kecil-kecil sponge, lalu dikeringkan selama 24 jam dengan suhu 45°C. Setelah kering, sponge ditimbang dan sebanyak 30-gram dan dilarutkan dalam metanol 300 mL dan didiamkan selama 24 jam. Tahap berikutnya ialah menyiapkan ekstrak dengan konsentrasi 1, 10 dan 100 (mg/mL).

To Cite this Paper: Walter Balansa, W., Lukas, L. C., Rieuwpassa, F. J., Tomaso, A. M. 2023. Aktivitas Antibakteri Sponge *Agelas Nakamura* Terhadap Bakteri Gram Negative: *Study In Vitro dan In Silico*. Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan, 14 (1) : 76-85.

Journal Homepage: <https://journal.ibrahimy.ac.id/index.php/JSAPI>

<http://dx.doi.org/10.35316/jsapi.v14i1.3012>

Isolasi Dan Kultur Bakteri

Bakteri yang dipakai dalam pengujian diperoleh dari Badan Karantina Ikan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan Tahun kemudian di kultur lagi pada media Tryptic Soy Agar (TSA) untuk memperbanyak kultur bakteri *E. tarda*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dilakukan inokulasi dengan menggoreskan 3 kultur bakteri tersebut pada 3 cawan petri yang sudah berisi media TSA lalu di inkubasi selama 24 jam.

Tahapan Uji Antibakteri

Ekstrak kasar sponge diencerkan dengan menggunakan pelarut metanol dengan konsentrasi 1, 10, dan 100 (mg/mL) dilakukan dengan menggunakan kawat ose steril dengan mengambil inokulum bakteri *E. tarda*, *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan menggores miring pada media TSA. Kertas saring berbentuk cakram (6 mm) yang sudah steril diletakan dengan posisi segi tiga. Setelah itu, sebanyak 20 µL ekstrak dengan konsentrasi berbeda maupun antibiotik diteteskan pada masing-masing kertas cakram dengan menggunakan pipet.

Penyiapan Larutan Antibiotik

Menyiapkan 0.1 larutan tetrasiklin, sebanyak 1.0 mg serbuk antibiotik perbandingan ini ditambahkan pada tabung reaksi berisi 10 mL aquades. Selanjutnya kedua bahan tersebut dicampur hingga homogen menggunakan vortex sebelum digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri.

Studi Docking Molekuler

Persiapan protein target. Docking semua ligan (agelasines, tetracycline, ciprofloxacin dll) di dalam protein target (1) dilakukan dengan menggunakan CB-dock 2 (Liu et al., 2022). File pdf untuk struktur kristal target protein diambil dari situs web bank data protein (<http://www.rcsb.org/pdb>) PDB ID: resolusi 1S16 2.10 Å. Sebelum docking, semua molekul air dan heteroatom akan dihapus dari protein yang akan diunggah yang blind dockingnya dijalankan secara default pada CB-dock 2.

Penyiapan ligan. Struktur dari semua ligan digambar menggunakan ChemiDraw Ultra 12.0 untuk mendapatkan struktur 2D. cdx dari semua ligan. Selanjutnya, struktur 2D dari tiap molekul dimimalisasi energinya menggunakan Chem3D Pro dan disimpan sebagai format tipe Mol2.

Docking molekul. Kantung yang dipilih untuk semua docking adalah tempat pengikatan untuk enzim topoisomerase (1S16). Docking dijalankan dengan nilai RMDS <2.0 (Liu et al., 2019) untuk topoisomerase IV.

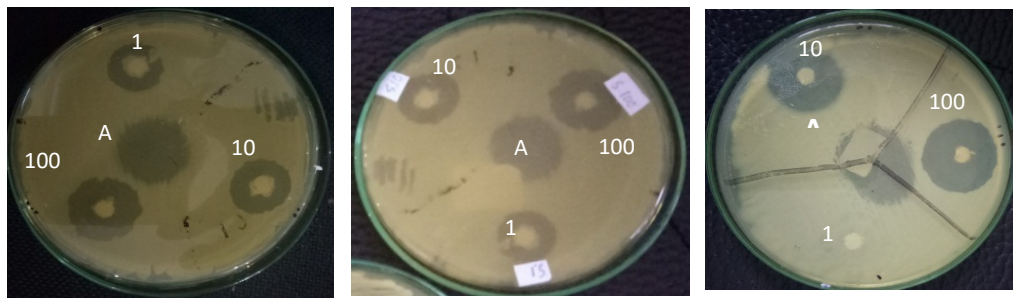
Protein Ligand Interaction Profiler. PLIP focuses on one-click processing of protein structures for the detection of interaction patterns. There are other tools, web pages and databases. Protein ligand complex obtained from the docking through CB-2 dock (Liu et al., 2022) was uploaded to PLIP web server and analyzed using the tool on PLIP. <https://plip-tool.biotec.tu-dresden.de/plip-web/plip/index>.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengujian antibakteri ekstrak kasar sponge *Agelas nakamura* terhadap *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Edwardsiella tarda* membuktikan bahwa ekstrak kedua invertebrata laut itu aktif atau mampu menghambat pertumbuhan terhadap hampir semua bakteri uji. Sementara ekstrak *A. nakamura* terbukti aktif terhadap ketiga bakteri Gram negatif itu. Aktivitas antibakteri juga bervariasi berdasarkan jenis ekstrak kasar (sponge *A. nakamura*), konsentrasi ekstrak kasar (1, 10 dan 100) mg/mL dan jenis bakteri uji (*A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda*) (Tabel 1, Gambar 1 dan 2).

Tabel 1. Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak sponge *Agelas nakamurai* terhadap tiga bakteri patogen *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda*.

Jenis Bakteri ikan	Konsentrasi	Sponge (mm)			Rata-rata (mm)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1 mg/mL	15	16	15	15.33
	10 mg/mL	18	19	19	18.67
	100 mg/mL	23	23	23	23.00
	Tetrasiklin	25	25	25	25.00
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1 mg/mL	12	13	12	12.33
	10 mg/mL	19	22	20	20.33
	100 mg/mL	30	27	30	29.00
	Tetrasiklin	30	30	30	30.00
<i>Edwarsiella tarda</i>	1 mg/mL	0	0	0	00.0
	10 mg/mL	22	23	23	22.67
	100 mg/mL	27	3	26	27.67
	Tetrasiklin	27	25	28	26.67



Gambar 1. Zona hambat ekstrak sponge *Agelas nakamurai* terhadap bakteri (a) *A. hydrophila*, (b) *A. salmonicida*, (c) *E. tarda* pada konsentrasi 1, 10 dan 100 mg/mol.

Meskipun daya hambat ekstrak bervariasi terhadap tiga jenis bakteri uji, ukuran zona bening itu konsisten berdasarkan konsentrasi yakni makin besar dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi 1 mg/mL, ekstrak kasar *A. nakamurai* menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* dengan zona hambat rata-rata sebesar ± 15.3 mm. Zona hambat meningkat menjadi 18.7 mm pada konsentrasi 10 mg/mL dan mencapai nilai tertinggi (23.0 mm) pada konsentrasi 100 mg/mL.

Hasil serupa juga terlihat pada pengujian terhadap *A. salmonicida* meskipun dengan zona hambat lebih kecil (12.33 mm) pada konsentrasi 1 mg/mL tetapi lebih tinggi pada konsentrasi 10 mg/mL (20.33 mm) dan 100 mg/mL (29.0 mm) dibandingkan hasil pengujian pada *A. hydrophila*. Berbeda dengan dua hasil pengujian sebelumnya, hasil uji terhadap *E. tarda* tidak memperlihatkan aktivitas antibakteri pada konsentrasi 1 mg/mL, tetapi menunjukkan zona hambat terbesar pada konsentrasi 10 mg/mL (22.7 mm), lebih besar dari zona hambat *A. hydrophila* meskipun dengan zona hambat lebih kecil lebih kecil (27.67 mm) daripada *A. salmonicida* (29 mm) pada konsentrasi 100 mg/mL (Gambar 1 dan Tabel 1).

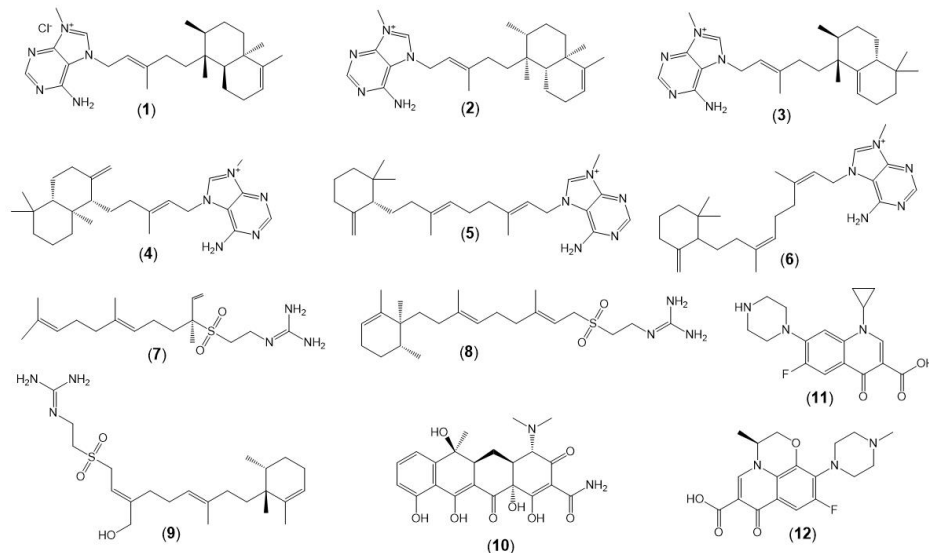
Hasil pengujian ini mengindikasikan bahwa *A. nakamurai* mampu menghambat ketiga bakteri uji dengan besar daya hambat bergantung pada konsentrasi ekstrak *A. nakamurai*. Sementara daya hambat terbesar pada konsentrasi 1 mg/mL teramati pada *A. hydrophila*, pada konsentrasi 10 mg/ml terhadap *E. tarda* sedangkan pada konsentrasi 100 mg/ml terhadap *A. salmonicida* (Tabel 1).

Jika dibandingkan dengan kontrol positif, kemampuan daya hambat ekstrak *A. nakamurai* masih lebih rendah bahkan hingga pengujian pada konsentrasi ekstrak 100 mg/mL (Gambar 2) walaupun pada konsentrasi 100 mg/mL, zona hambat ekstrak *A. nakamurai* terhadap bakteri *A. salmonicida*

(29.0 mm) dan terhadap *A. salmonicida* (20.00 mm) hampir menyamai daya hambat tetrasiklin 30 dan 21.7 (mm) berturut-turut (Tabel 1) dan aktivitas *A. nakamurai* terhadap *E. tarda* (27.7 mm) pada konsentrasi 100 mg/mL sedikit lebih tinggi dari tetrasiklin (26.7).

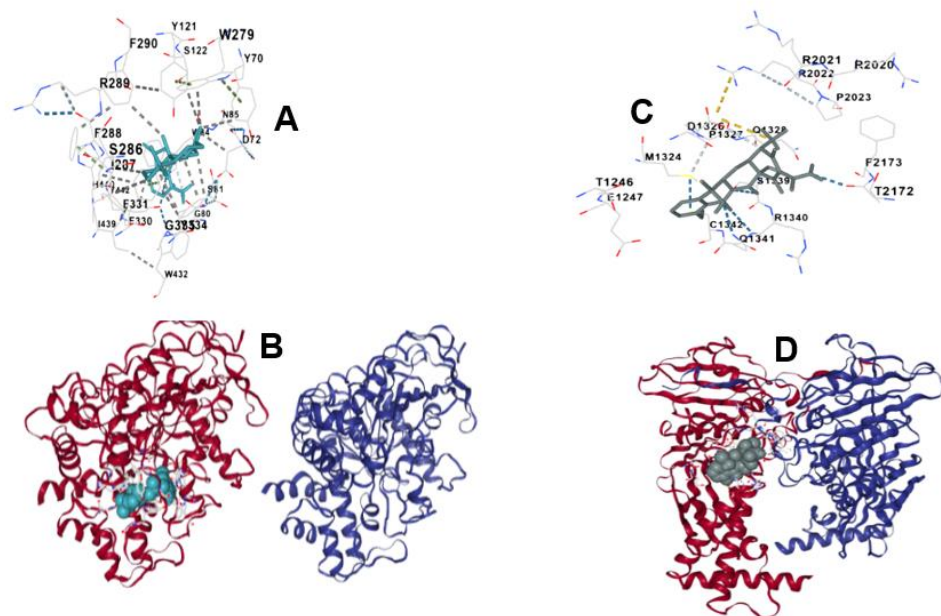
Studi Docking Molekuler

Docking molekuler dilakukan pada agelasine A-F (**1-6**) and agelasidine A (**7**) yang diisolasi dari sponge *A. nakamurai* dari perairan Kabupaten Sangihe (Balansa et al., 2020; Riyanti et al., 2020), agelasidine C (**8**), D (**9**) tetrasiklin (**10**) dan antibiotik ciprofloxacin and levofloxacin (**10-11**) (Gambar 2).



Gambar 2. Struktur agelasines A-F (**1-6**), agelasidine A, C-D (**7-9**), tetrasiklin (**10**), ciprofloxacin (**11**), levofloxacin (**12**)

Docking molekuler menggunakan CB-dock 2 (Liu et al., 2022) memperlihatkan bahwa dari 7 molekul yang diisolasi dari sponge *A. nakamurai* dari Kabupaten Sangihe, agelasidine A memiliki afinitas ikatan tertinggi (-8.6 kJ/mol). Hasil ini mengindikasikan bahwa agelasidine A sebagai molekul dengan afinitas pengikatan atau sebagai modulator paling potensial untuk enzim topoisomerase IV (Gambar 3). Afinitas ikatan ini lebih tinggi daripada afinitas ikatan antibiotik tetrasiklin (-8.1 kJ/mol), ciprofloxacin (-6.6 kJ/mol) maupun levofloxacin (-7.7 kJ/mol). Afinitas ikatan dari agelasines tergolong lebih lemah (-7.1-7.3 kJ/mol) daripada tetrasiklin, hampir menyamai aktivitas antibiotik quinolone agelasine E (-7.7 kJ/mol) dan masih lebih kuat daripada aktivitas antibiotik ciprofloxacin. Hasil ini mengindikasikan dari senyawa agelasine khususnya potensi dari agelasidine A sebagai senyawa sebagai senyawa antibiotik. Perbedaan struktur tampaknya berperan penting pada perbedaan ikatan afinitas dari struktur dari agelasine (gabungan diterpene halimene, claderone atau labdane dan gugus fungsi methyladenine) dan agelasidine (diterpene bercabang dan gugus fungsi hypotaurocyamine). Dugaan ini didukung dengan hasil docking pada dua molekul agelasidine lainnya yang memperlihatkan afinitas ikatan agelasidine C (-8.3 kJ/mol) dan agelasidine D (-8.8 kJ/mol).



Gambar 3: Gambar 3D pengikatan agelasidine C (A, B) dan tetraksiklin pada kantung 1S16 (C, D)

Table 2. Hasil docking menggunakan CB-dock 2 pada protein target topoisomerase IV (1S16)

Ligands	Binding affinity (kJ/mol)	Asam Amino
Agelazine A (1)	-7.7	Chain A: Phe1100 Asp1326 Gln1328 Ser1338 Ser1339 Arg1340 Gln1341 Chain B: Arg2020 Arg2021 Arg2022 Pro2023 Thr2172 Phe2173 Phe2174 Asp2175\
Agelazine B (2)	-7.4	Chain B: Leu2048 Ala2049 Gln2106 Phe2107 Val2193 Leu2194 Pro2196 Gln2216 Asp2217 Leu2219 Ala2243 Gly2244 Ala2248 Val2249 Asp2250 Leu2270 Ser2321 Val2322 Lys2323
Agelazine C (3)	-7.3	Chain B: Leu2048 Ala2049 Gln2106 Phe2107 Val2193 Leu2194 Cys2195 Pro2196 Asp2217 Leu2219 Ala243 Gly2244 Ala2248 Asp2250 Leu2270 Ser2321 Lys2323
Agelazine D (4)	-7.1	Chain A: Glu1038 Val1039 Ile1040 Asn1042 Ser1043 Glu1046 Val1067 Asp1069 Gly1073 Mer1074 Ile1090 Ala1096 Gly1097 Gly1098 Lys1099 Tyr1105 Gly1110 Leu1111 His1112 Gly1113 Val1114 Gly1115 Ile1116 Ser1117 Thr1163 Ser1164 Val1165 Lys1334. Chain B: Tyr2005 Ile2010
Agelazine F (6)	-7.8	Asn85, Ser122, Trp84, Gly123, Glu199, Gly119, Gly118, Ser200, GLy441, Tyr70, Aps72, Tyr121, Ser81
Agelasidine A (7)	-8.6	Chain A: Tyr1005 Iel1010 Chain B: Glu2038 Val2039 Asn2042 Ser2043 Asp2045 Glu2046 Val2067 Asp2069 Gly2073 Met2074 Pro2075 Ile2090 Ala2096 Gly2097 Gly2098 Lys2099 Tyr2105 Gly2109 Gly2110 Leu2111 His112 Gly2113 Val2114 Gly2115 Ile2116 Thr2163 Val2165 Gln2332 Lys23340
Agelasidine _C (8)	-8.3	Chain A: Gln1037 Glu1038 Val1039 Asp1041 Asl1042 SER1043 ASP1045 Glu1046 Asp1069 Met1074 Pro1075 Ile1090 Arg1093 Ala1096 Gly1097 Gly1098 Lys1099 Tyr1105 Gly1109 Gly1110 Leu1111 His1112 Gly1113 Val1114 Gly1115 Ile1116 Ser1117 Thr1163 Val1165 Ile1271 Gln1332 Lye1334

To Cite this Paper: Walter Balansa, W., Lukas, L. C., Rieuwpassa, F. J., Tomaso, A. M. 2023. Aktivitas Antibakteri Sponge *Agelas Nakamura* Terhadap Bakteri Gram Negative: *Study In Vitro dan In Silico*. Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan, 14 (1) : 76-85.

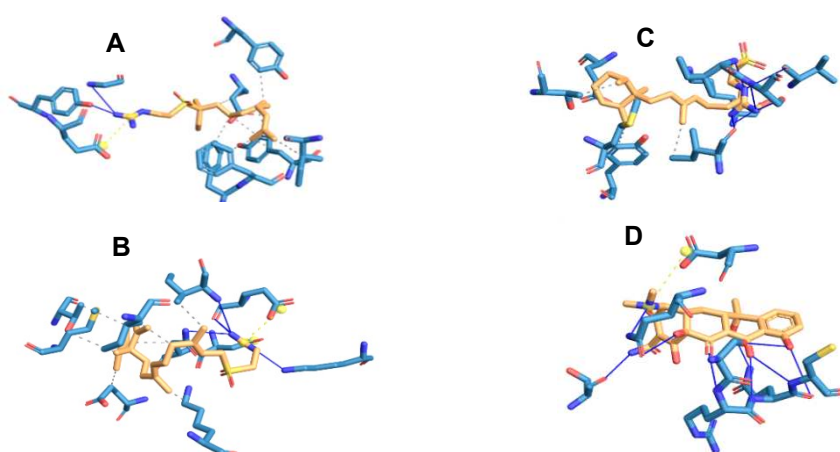
Journal Homepage: <https://journal.ibrahimy.ac.id/index.php/JSAPI>

<http://dx.doi.org/10.35316/isapi.v14i1.3012>

		Chain B: Tyr2005 Ile2010
Agelasidine _D (9)	-8.8	Chain A: Gln1037 Glu1038 Val1039 Asp1041 Asn1042 Ser1043 Asp1045 Glu1046 Asp1069 Met1074 Pro1075 Leu1089 Ile1090 Leu1091 Arg1093 Ala1096 Gly1097 Gly1098 Lys1099 Tyr1105 Gly1109 Gly1110 Leu1111 His1112 Gly1113 Val1114 Gly1115 Ile1116 Ser1117 Thr1163 Val1165 Ile1271 Gln1332 Lys1334 Chain B: Tyr2005 Ile2010
Tetracycline (10)	-8.3	Chain A: Thr1246 Glu1247 Met1324 ASP1326 Pro1327 Gln1328 Ser1339 Arg1340 Gln1341 Cys1342 Chain B: Arg2021 Arg2022 Pro2023 Thr2172 Phe2173
Ciproflaxin (11)	-6.6	Chain B: Peh2107 Ala2192 Val2193 Leu2194 Pro2196 Tyr2215 Gln2216 Asp217 Gly2218 Leu2219 Ala2243 Ala2248 Asp2250 Ser2321 Lys2323
Levofloxacin (12)	-7.7	Chain B: Phe2107 Ala2192 Val2193 Leu2194 Cys2195 Pro2196 Tyr2215 Gln2216 Asp2217 Gly2218 Leu2219 Asn2241 Ala2243 Ala2248 Asp2250 Ser2321 Lys2323

Table 2. Hasil analisa protein ligan interaksi menggunakan PLIP dari agelasidine A, C-D (1-3) atau tetrasiklin dan stuktur kristal dari topoisomerase IV (PDB ID: 1S16)

Ligands	Ikatan Hidrogen (Kcal/mol)	Ikatan Hidrofobik	Salt bridge
Tetracycline	Gln132, Gln132, Ser1339, Arg1340, Gln1341, Gln1341, Cys1342, Thr217		Asp1326
Agelasidine A	Gly117, Tyr130	Tyr70, Asp72, Ile287, Phe330, Phe331, Tyr334, Tyr334,	
Agelasidine C	Glu1038, Gly1038, Asn104, Ile1116,	Tyr334 Asn104, Glu104, Met107, Ile116, Thr116	Glu103, Asp104
Agelasidine D	Lys1334, Lys1334 Ile2090, Lys2099, Val2114, Ile2116, Ser2117, Ser2117	Tyr1005, Gly2046, Met2074, Ile2090, Lys2099m Tgr2163	



Gambar 4. Interaksi Protein Ligand antara agelasidien A (1) agelasidine C (2), Agelasidine D (3) tetrasiklin (4) dan topoisomerase enzim (PDB ID: 1S16); garis biru menunjukkan ikatan hidrogen, garis coklat putus-putus mewakili ikatan hidrofobik.

Hasil profiling menggunakan protein ligand interaction profiler (PLIP) menunjukkan sementara interaksi tetrasiklin dengan protein target melibatkan ikatan hidrogen saja (Gambar 4D, Tabel 2), pada ketiga molekul agelasine A, C dan D, interaksi itu melibatkan bukan saja ikatan hidrogen tetapi juga ikatan hidrofobik (Gambar 4A-C). Interaksi ikatan yang lebih banyak antara senyawa-senyawa agelasidine A, C dan D dan protein target 1S16 dibandingkan dengan interaksi antara tetrasiklin dan 1S16 kemungkinan bisa menjadi penyebab afinitas ikatan lebih kuat pada agelasidine A, C dan B dibandingkan dengan tetrasiklin. Muley et al. (2010) juga melaporkan peningkatan afinitas ikatan akibat gabungan antara interaksi hidrofobik dan ikatan hidrogen.

Secara *in vitro* aktivitas antibakteri ekstrak sponge *A. nakamurai* memperlihatkan daya hambat lebih kecil daripada tetrasiklin atau kontrol positif dalam penelitian ini. Hal ini kemungkinan besar berhubungan karakteristik bahan alami dari sponge *A. nakamurai* dalam studi ini yang masih berupa ekstrak kasar. Salah satu penjelasan ialah ekstrak kasar masih merupakan campuran kompleks berbagai molekul yang aktivitas antibakteri teramati saat ini bisa saja akibat aktivitas sinergetik (aktivitas antibakteri gabungan dua atau lebih molekul lebih kuat daripada aktivitas molekul-molekul itu secara individu) atau antagonistik (aktivitas molekul-molekul secara individu lebih kuat dari aktivitas gabungan dari dua atau lebih senyawa). Alternatifnya, ketidakmurnian pada ekstrak kasar kemungkinan besar mempengaruhi kandungan bahan aktif atau fitokimia dari ekstrak *A. nakamurai* dan berdampak pada rendahnya aktivitas antimikroba *A. nakamurai* dibandingkan dengan kontrol positif atau tetrasiklin dalam penelitian ini. Angeloni et al. (2021) juga membuktikan adanya korelasi positif antara kandungan total fenolik dan penurunan aktivitas *radical scavenging* pada ekstrak kasar *Leonorus cardiaca*. Menurut kelompok peneliti ini, perbandingan kandungan fitokimia pada senyawa murni jauh lebih tinggi daripada ekstrak kasar, salah satu penyebab senyawa murni memiliki bioaktivitas yang cenderung lebih kuat daripada ekstrak kasar.

Menariknya, docking molekuler justru memperlihatkan afinitas pengikatan lebih kecil atau bioaktivitas lebih kuat pada senyawa-senyawa agelasines (-7.1 sampai -8.6 kJ/mol) dibandingkan dengan beberapa antibiotik seperti tetrasiklin dan antibiotik quinolone seperti ciprofloxacin dan levofloxacin dengan afinitas ikatan dengan nilai lebih besar atau bioaktivitas lebih lemah yaitu antara -6.6 dan -8.3 kJ/mol (Tabel 2). Hasil docking ini juga mendukung asumsi sebelumnya bahwa aktivitas ekstrak kasar cenderung lebih lemah dibandingkan dengan senyawa murni. Selain itu, hasil ini juga memperlihatkan bahwa agelasidine C memiliki afinitas ikatan terkuat terhadap protein target, topoisomerasi *E. coli* (1S16) dibandingkan dengan agelasine A-F karena perbedaan mendasar pada struktur kimia agelasine (gabungan gugus fungsi diterpene halimene, claderone atau labdane dan methyladenine) dan agelasidine (diterpen bercabang dan hypotaurocyamine). Seperti telah disentil sebelumnya, asumsi ini juga telah didukung dengan hasil docking molekuler pada dua analog dari agelasidine A yaitu agelasidine C dan D yang juga memperlihatkan afinitas pengikatan yang kuat. Bahkan agelasidine D memiliki afinitas ikatan (-8.8 kJ/mol) sedikit lebih kuat dari agelasidine C (-8.5 kJ/mol). Secara kolektif, hasil ini menunjukkan potensi dari senyawa terkandung pada sponge genus *Agelas* secara khusus agelasidine sebagai senyawa dengan potensi menjadi modulator enzim topoisomerase IV salah satu target antibakteri menjanjikan.

Selanjutnya, sulitnya penemuan antibiotik khususnya untuk bakteri Gram negatif (1000 kali lebih rendah daripada penemuan antibiotik untuk bakteri Gram positif) (Silver, 2011) menjadikan pengujian lebih lanjut untuk agelasidine A, C maupun D sebagai modulator topoisomerase IV relevan. Selain itu, peningkatan resistensi bakteri yang sangat menguatirkan memperingatkan kita tentang pentingnya studi kombinasi antibiotik dan ekstrak kasar untuk mengetahui dampak sinergetik dari kombinasi itu untuk peningkatan aktivitas antibiotik misalnya dengan menggunakan ekstrak *A. nakamurai*. Berbagai hasil penelitian antibiotik seperti itu makin banyak dipublikasikan (Nascimento et al., 2000; Hübsch et al., 2014) dan membuka peluang untuk penemuan antibiotik atau kombinasi antibiotik untuk pengobatan infeksi bakteri patogen pada ikan maupun manusia.

KESIMPULAN

Ekstrak kasar sponge *A. nakamurai* dari Kabupaten Kepulauan Sangihe mampu menghambat pertumbuhan tiga jenis bakteri ikan *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *E. tarda*. Aktivitas penghambatan ekstrak *A. nakamurai* masih jauh lebih lemah daripada antibiotik tetrasiklin tetapi hasil docking molekuler pada agelasine A-F dan agelasidine memperlihatkan bahwa molekul-molekul ini memiliki aktivitas antimikroba lebih kuat terhadap protein topoisomerase IV daripada

tetrasiklin, ciprofloxacin maupun levofloxacin. Pengujian lanjut agelasidine A, C dan D maupun pengujian kombinasi ekstrak dan antibiotik komersial bisa menjadi pendekatan-pendekatan relevan dalam mengatasi resistensi bakteri seekaligus sebagai upaya penemuan antibiotik baru untuk bakteri penginfeksi ikan maupun manusia .

DAFTAR PUSTAKA

- Abad, M., Bedoya, L., & Bermejo, P. (2011). Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86(3), 231–240. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2010.03.009>
- Angeloni, S., Spinozzi, E., Maggi, F., Sagratini, G., Caprioli, G., Borsetta, G., Ak, G., Sinan, K. I., Zengin, G., Arpini, S., Mombelli, G., & Ricciutelli, M. (2021). Phytochemical profile and biological activities of crude and purified leonurus cardiaca extracts. *Plants*, 10(2), 1–15. <https://doi.org/10.3390/plants10020195>
- Balansa, W., Wodi, S. I. M., Rieuwpassa, F. J., & Ijong, F. G. (2020). Agelasines B, D and antimicrobial extract of a marine sponge Agelas sp. From Tahuna Bay, Sangihe Islands, Indonesia. *Biodiversitas*, 21(2), 699–706. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210236>
- Hübsch, Z., Van Zyl, R. L., Cock, I. E., & Van Vuuren, S. F. (2014). Interactive antimicrobial and toxicity profiles of conventional antimicrobials with Southern african medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 93, 185–197. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2014.04.005>
- Indraningrat, A. A. G., Smidt, H., & Sipkema, D. (2016). Bioprospecting sponge-associated microbes for antimicrobial compounds. *Marine Drugs*, 14(5), 1–66. <https://doi.org/10.3390/md14050087>
- Liu, Y., Grimm, M., Dai, W. tao, Hou, M. chun, Xiao, Z. X., & Cao, Y. (2019). CB-Dock: a web server for cavity detection-guided protein–ligand blind docking. *Acta Pharmacologica Sinica*, 41(1), 138–144. <https://doi.org/10.1038/s41401-019-0228-6>
- Liu, Y., Yang, X., Gan, J., Chen, S., Xiao, Z. X., & Cao, Y. (2022). CB-Dock2: improved protein–ligand blind docking by integrating cavity detection, docking and homologous template fitting. *Nucleic Acids Research*, 50(W1), W159–W164. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac394>
- Mehub, M. F., Lei, J., Franco, C., & Zhang, W. (2014). Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: Trends and opportunities for discovery of bioactives. *Marine Drugs*, 12(8), 4539–4577. <https://doi.org/10.3390/md12084539>
- Meidiza, R., Arimbi, A., & Hastutiek2, P. (2017). Gambaran Patologi Hepar Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang Diinfeksi Bakteri Edwardsiella tarda. *Jurnal Ilmiah Perikanan Dan Kelautan*, 9(1), 47. <https://doi.org/10.20473/jipk.v9i1.7632>
- Mondol, M. R., Hossen, M. A., & Nahar, D. A. (2017). Length–weight relationships of three fish species from the Bay of Bengal, Bangladesh. *Journal of Applied Ichthyology*, 33(3), 604–606. <https://doi.org/10.1111/jai.13268>
- Muley, L., Baum, B., Smolinski, M., Freindorf, M., Heine, A., Klebe, G., & Hangauer, D. G. (2010). Enhancement of hydrophobic interactions and hydrogen bond strength by cooperativity: Synthesis, modeling, and molecular dynamics simulations of a congeneric series of thrombin inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53(5), 2126–2135. <https://doi.org/10.1021/jm9016416>
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., & Silva, G. L. (2000). Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), 247–256. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822000000400003>

- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2004). Marine natural products and related compounds in clinical and advanced preclinical trials. *Journal of Natural Products*, 67(8), 1216–1238. <https://doi.org/10.1021/np040031y>
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 7(048), 1–16. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20127048>
- Riyanti, Marner, M., Hartwig, C., Patras, M. A., Wodi, S. I. M., Rieuwpassa, F. J., Ijong, F. G., Balansa, W., & Schäberle, T. F. (2020). Sustainable Low-Volume Analysis of Environmental Samples by Semi-Automated Prioritization of Extracts for Natural Product Research (SeaPEPR). *Marine Drugs*, 18(649), 1–15.
- Rogers, G. B., Carroll, M. P., & Bruce, K. D. (2012). Enhancing the utility of existing antibiotics by targeting bacterial behaviour? *British Journal of Pharmacology*, 165(4), 845–857. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01643.x>
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 71–109. <https://doi.org/10.1128/CMR.00030-10>
- Triyaningsih, Sarjito, & Prayitno, S. B. (2014). Patogenisitas *Aeromonas hydrophila* yang diisolasi dari lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang berasal dari boyolali. *Journal of Aquaculture Management and Technology*, 3(2), 11–17. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/jfpik>
- Wintoko, F., Setyawan, A., Hudaidah, S., & Ali, M. (2013). Immunogenisitas heat killed vaksin inaktif *Aeromonas salmonicida* pada ikan mas (*Cyprinus carpio*). *E-Jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perairan*, 11(1), 205–210. <http://jurnal.fp.unila.ac.id/index.php/bdpi/article/view/228>