

BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

II.1. *Mycobacterium Tuberculosis*

Mikobakteri merupakan marga bakteri yang sudah lama karena mereka telah ada disekitar lingkungan makhluk hidup selama jutaan tahun dan telah beradaptasi dengan hampir keseluruhan lingkungan seperti air, tanah, debu dan udara. *Mycobacteria* termasuk dalam famili *Mycobacteriaceae* dan *ordo Actinomycetales*. Genus mikobakteri terkait erat dengan anggota *Actinomycetales* lainnya seperti *Corynebacterium*, *Nocardia* dan *Rhodococcus*. Berikut merupakan klasifikasi mikobakteri (Irianti dkk., 2016) :

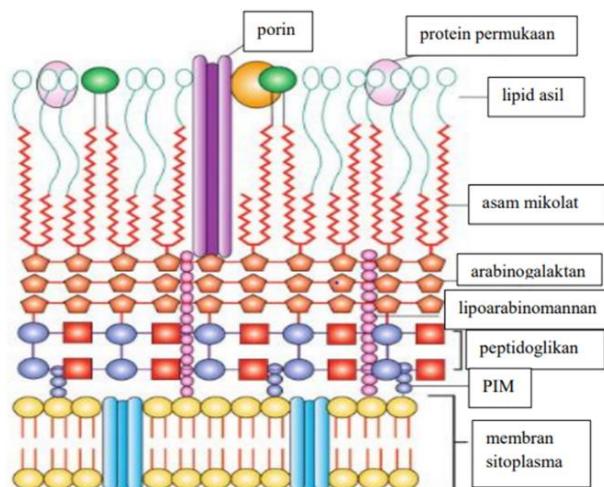
<i>Kingdom</i>	: <i>Monera</i>
<i>Ordo</i>	: <i>Actinomycetales</i>
<i>Subordo</i>	: <i>Corynebacterineae</i>
<i>Family</i>	: <i>Mycobacteriaceae</i>
<i>Genus</i>	: <i>Mycobacterium</i>
<i>Spesies</i>	: <i>Mycobacterium Tuberculosis</i>

Secara fisik penampakan dari pewarnaan dan morfologi mikobakteri yang ditumbuhkan pada media kultur padat merupakan ciri utama mikroorganisme tersebut. Sebagian besar spesies berwarna keputihan atau koloni berwarna putih tetapi terutama pada spesies yang tumbuh cepat memiliki warna kuning cerah atau spesies oranye karena kandungan pigmen karotenoid. Jenis warna dan kemampuannya untuk menghasilkan warna tersebut dalam gelap (*spesies skotokromogenik*) atau kepekaan respons adanya cahaya (*spesies fotokromogenik*) dipergunakan sebagai cara klasifikasi untuk mikobakteri yang besar potensinya sebagai patogen. Morfologi koloni mikobakteri pada media padat menjadi salah satu karakter strain yang stabil, meskipun variasi sering terlihat karena mutasi yang cepat. Jenis koloni mikobakteri terlihat bertekstur dan tersebar.

Mikobakteri yang tidak bergerak, dengan bentuk memanjang dan sedikit melengkung, tahan terhadap asam dan alkohol setelah diwarnai dengan metode pewarnaan *phenicated fuchsin* (*Ziehl-Neelsen*). Tahan asam adalah karakteristik yang paling penting dari mikobakteri. Tahan asam adalah kemampuan sel mikobakteri untuk tidak mengalami dekolorisasi (penghancuran warna buatan) dalam penggunaan asam. Sifat ini disebabkan

kandungan lipid yang tinggi pada dinding sel sehingga mikobakteri bersifat tidak suka air dan sukar diwarnai.

Dinding sel mikobakteri terdiri dari susunan struktur dinding sel, molekul penyusun dinding sel, *lipid* dan polipeptida. Bagian dinding sel terdapat kandungan senyawa kimia berupa peptidoglikan, arabinogalaktan dan asam mikolat. Asam mikolat adalah alkil, asam lemak hidroksi dengan rantai yang sangat panjang (C30-C90). Sekitar 40% dari berat kering mikobakteri adalah asam mikolat. Selain bertanggung jawab kepada bakteri yang tahan asam, asam mikolat juga berperan penting dalam impermeabilitas dinding sel termasuk impermeabilitas terhadap antituberkulosis. Isi dan jumlah asam mikolat mempengaruhi virulensi atau tingkat keganasan suatu bakteri, laju perkembangan, morfologi koloni dan permeabilitas *Mycobacterium Tuberculosis*. Mikobakteri lebih menyerupai dengan Gram negatif dari pada Gram positif karena sitoplasmanya diisi dan dipenuhi oleh membran plasma dan peptidoglikan lebih padat. Gambar berikut mengambarkan struktur dinding sel mikobakteri (gambar 2.1.) (Wahdaningsih dkk., 2016).



Gambar II.1. Gambaran skema dinding sel mikobakteri. Porin diperlukan sebagai transportasi molekuler sel hidrofilik melalui membran terluar PIM (*phosphatidylinositolmannoside*) (Irianti dkk., 2016).

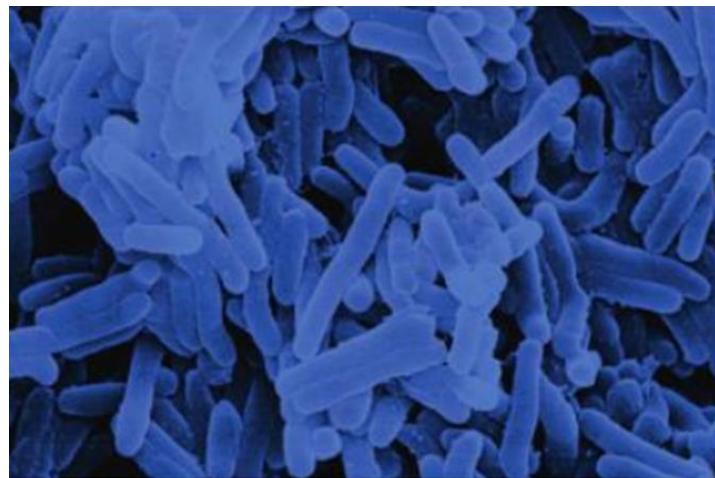
Mikobakteri mempunyai susunan dinding sel yang terdiri dari kandungan senyawa asam mikolat yang padat. Karena struktur ini, *Mycobacterium Tuberculosis* mempunyai daya tahan yang efisien dan kekuatan yang sangat baik untuk menahan berbagai tekanan eksternal. Selain itu, dinding sel mikobakteri menunjukkan struktur yang dinamis.

Struktur ini dapat diperbarui selama pertumbuhan bakteri di lingkungan yang berbeda. Namun, pada kondisi lingkungan yang tidak disukai oleh mikobakteri, misalnya ketika terpapar mekanisme pertahanan inang, mikobakteri menghasilkan bentuk dinding sel yang kurang atau dikenal sebagai *Lform* yang kemudian membuat Mikobakteri bertahan lama dalam dahak kering. Kemampuan mikobakteri dalam pembentukan *L-form* berhasil ditunjukkan oleh Markova. Perubahan morfologi *Mycobacterium Tuberculosis* dari tahan asam menjadi tidak tahan asam dan bentuk coccoid dalam berbagai ukuran berhasil diamati. *Mycobacterium Tuberculosis* berbentuk batang lurus atau agak melengkung berwarna merah dengan metode *Ziehl-Neelsen*. Tetapi, *Lform* menunjukkan polimorfisme dan variabilitas hasil pewarnaan. *Lform* menunjukkan kehilangan karakteristik bentuk L dan seperti morfologi bakteri lain. Bakteri yang berbentuk *L-form* memiliki daya tahan di kondisi dorman di dalam makroorganisme (M. I. T. Siregar, 2015).

Dalam perkembangannya terdapat lebih dari 150 spesies yang termasuk kedalam *genus Mycobacterium*. Spesies ini biasanya dikelompokkan menjadi dua divisi utama, yaitu pertumbuhan lambat dan juga pertumbuhan dengan cepat. Dasar yang digunakan adalah waktu yang diperlukan supaya koloni bakteri yang terlihat muncul pada media padat setelah dilakukan suspensi bakteri ditanam. Munculnya koloni membutuhkan waktu kurang dari 1 minggu dalam pertumbuhan cepat dan lebih dari 1 minggu untuk pertumbuhan lambat. Pewarnaan *Ziehl-Neelsen* atau disebut juga pewarnaan tahan asam adalah metode paling jelas untuk mendeteksi basil tahan asam (BTA) untuk identifikasi cepat mikobakteri (Irianti dkk., 2016).

Mycobacterium Tuberculosis merupakan mikobakteri utama penyebab tuberkulosis pada manusia. MTB kadang-kadang disebut juga sebagai basil tuberkel. Bakteri berbentuk batang ini bersifat nonmotil atau tidak dapat bergerak sendiri dan memiliki panjang 1-4 m dan lebar 0,3-0,56 m. *Mycobacterium Tuberculosis* merupakan organisme *aerob obligat* yang berarti membutuhkan oksigen untuk tumbuh. Oleh karena itu, kompleks MTB banyak ditemukan di lobus atas paru-paru yang berventilasi baik. Bakteri TBC ini merupakan parasit intraseluler fakultatif, yaitu patogen yang dapat hidup dan berkembang menjadi lebih banyak di dalam sel inang dan di luar sel inang (sel fagosit), terutama makrofag dan monosit. Kemampuan *Mycobacterium Tuberculosis* untuk bertahan hidup

dalam makrofag inang dikendalikan oleh proses yang cukup panjang, kompleks dan terkoordinasi (Soutter et al., 2016).



Gambar II.2. *Mycobacterium Tuberculosis* berbentuk seperti batang dengan panjang sekitar 1-4 m dan lebar 0,3-0,56 m dilihat menggunakan mikroskop elektron transmisi (TEM) (Irianti dkk., 2016)

Mycobacterium Tuberculosis tidak termasuk kedalam klasifikasikan sebagai bakteri Gram positif atau Gram negatif dikarenakan dinding sel bakteri ini tidak memiliki karakteristik membran luar bakteri Gram negatif. Namun, *Mycobacterium Tuberculosis* memiliki susunan asam peptidoglikan arabinogalactan mikolat dalam menghambat permeabilitas eksternal. *Mycobacterium Tuberculosis* diklasifikasikan sebagai bakteri tahan asam. Ketika dilakukan pewarnaan Gram pada *Mycobacterium Tuberculosis*, warna Gram positif yang muncul sangat lemah atau tidak memberikan hasil warna apapun. Namun, ketika diwarnai sebagai bakteri tahan asam, *Mycobacterium Tuberculosis* mempertahankan pewarna ketika dipanaskan dan ditambahkan dengan komponen asam organik. Saat menggunakan pewarnaan dengan menggunakan metode *Ziehl-Neelsen* terhadap *Mycobacterium Tuberculosis*, memperlihatkan warna merah muda atau pink.

Mycobacterium Tuberculosis tumbuh lebih lambat dengan laju pembelahan 12 jam hingga 24 jam dan waktu kultur hingga 3 minggu di media tumbuh. Isolasi di media kultur *Lowenstein-Jensen* atau *Middlebrook* memerlukan waktu sekitar 21 hari sampai 6 minggu. Yang menyebakan menurunnya pertumbuhan *Mycobacterium Tuberculosis* belum diketahui. Namun, keterbatasan penyerapan nutrisi karena dinding sel yang kedap dan sintesis RNA yang lambat diduga menjadi penyebab lambatnya pertumbuhan *Mycobacterium Tuberculosis* yang tidak mengandung lemak atau *fosfolipid* pada bagian

membran luar. Dinding sel *Mycobacterium Tuberculosis* mengandung sejumlah besar *glikolipid*, khususnya asam mikolat, peptidoglikan, *LAM* (*lipoarabinomannan*), *phosphatidyl inositol mannoside (PIM)*, *phthiocerol dimycocerate*, *sulfolipids* dan *wax-D* (Sudigdoadi, 2016).

II.2. Patogenesis Penyakit Tuberkulosis

Pada saat infeksi pertama kali sel pertahanan tubuh atau yang disebut makrofag dapat berpindah ke tempat infeksi dan mematikan basil. Tetapi basil tuberkel memiliki daya tahan yang kuat karena struktur dinding selnya. Usaha perlindungan seperti ini memungkinkan basil tuberkel untuk bertahan hidup bahkan jika makrofag memakannya. Setelah makrofag menelan basil tuberkel, basil akan mulai menginfeksi makrofag. Basil yang bertahan hidup di dalam makrofag dapat bertumbuh kembali seperti sediakala. Setelah makrofag berhasil diserang oleh basil tuberkel, kekebalan tubuh melakukan strategi pertahanan lain. Sejumlah sel pertahanan mencapai kelenjar getah bening dan mengelilingi area infeksi. Sel-sel ini membentuk gumpalan sel keras yang disebut tuberkel. Sel-sel ini membantu membunuh basil dengan membentuk dinding yang mencegah penyebaran infeksi lebih lanjut. Dalam beberapa kasus, sel pertahanan secara permanen dapat merusak semua basil tuberkel. Dalam beberapa kasus, sel pertahanan tidak mampu menghancurkan semua basil tuberkel. Basil tuberkel yang berhasil bertahan hidup masuk ke dalam keadaan dorman dan dapat bertahan dalam waktu yang cukup panjang. Selama proses tersebut, bakteri yang mati dan tidak aktif lagi tidak akan menampakan gejala dan tidak dapat menularkannya kepada orang sekitarnya. Kondisi ini dikenal sebagai Tuberkulosis laten. Bakteri yang tidak aktif dapat mengaktifkan kembali dan merusak pertahanan dinding sel dalam suatu proses. Proses ini disebut dengan sebutan infeksi Tuberkulosis Sekunder (Hansen, 2017).

Infeksi Tuberkulosis sekunder terjadi pada saat sistem kekebalan tubuh dalam keadaan yang lemah dan tidak sanggup dalam menyerang bakteri yang aktif, atau ketika bakteri mulai berkembang menjadi lebih banyak dan menginfeksi. Infeksi Tuberkulosis sekunder biasanya terjadi dalam waktu 5 tahun setelah infeksi primer. Infeksi Tuberkulosis sekunder sering dianggap sebagai permulaan penyakit Tuberkulosis yang aktif (suatu kondisi ketika bakteri mulai memenangkan perlawanan terhadap sistem pertahanan tubuh dan mulai menimbulkan gejala) (WHO Global, 2021). *Droplet nuclei* yang mengandung basil tuberkel dihirup, masuk ke paru-paru dan berjalan ke alveoli. Basil tuberkel

berkembang menjadi lebih banyak di alveolus. Sejumlah kecil basil tuberkel masuk ke aliran darah dan kemudian menyebar ke seluruh tubuh. Basil tuberkel dapat mencapai bagian tubuh mana pun, termasuk otak, laring, sistem limfatik, paru-paru, tulang, atau ginjal. Makrofag mengelilingi dan memakan basil tuberkel dalam 2 sampai 8 minggu. Makrofag akan membentuk lapisan pelindung (*granuloma*) sebagai *reservoir* dan *control* *tubercle bacilli*. Jika sistem kekebalan tidak dapat mengendalikan basil tuberkel, basil mulai berkembang menjadi lebih banyak dengan cepat sehingga menjadi penyakit Tuberkulosis. Proses ini terjadi di berbagai organ pada tubuh manusia seperti paru-paru, otak, atau tulang.

Pada beberapa kondisi pasien basil tuberkel dapat mengalahkan sistem kekebalan tubuh dan berkembang lebih banyak, mengakibatkan perkembangan dari LTBI menjadi penyakit Tuberkulosis atau TB aktif. Seseorang dengan penyakit TBC atau Tuberkulosis aktif biasanya menular dan dapat menyebarkan bakteri TBC ke orang lain. Perkembangan *LTBI* menjadi penyakit TB dapat terjadi kapan saja, baik segera maupun beberapa tahun kemudian. Cairan tubuh atau jaringan dari daerah sumber penyakit harus dikumpulkan untuk uji BTA dan kultur. Kultur positif *Mycobacterium Tuberculosis* memastikan diagnosis penyakit Tuberkulosis (WHO Global, 2021).

Latent Tuberculosis Infection (LTBI)

Seorang pasien yang dinyatakan dengan diagnosa *LTBI* jika didapati *Mycobacterium Tuberculosis* dalam tubuhnya. Tetapi, tidak lagi dikatakan mengidap TBC dan tidak aktif dalam menularkan kepada orang lain. Keadaan seperti itu dikenal juga sebagai TB laten. Proses *LTBI* diawali basil ekstraseluler dimakan oleh makrofag dan dimasukkan ke dalam sel darah putih. Hal ini memicu respon imun tubuh. Sel darah putih membunuh atau merangkum sebagian besar basil. Kemudian terbentuk granuloma. Pada kondisi ini telah terjadi *LTBI*. *LTBI* dapat dideteksi menggunakan uji kulit tuberkulin (TST) atau uji pelepasan gamma interferon. Kekuatan sistem kekebalan membutuhkan waktu 2 sampai kurang lebih 8 minggu setelah terinfeksi. Tuberkulosis akan bereaksi terhadap tuberkulin, sehingga *LTBI* masih dapat dideteksi oleh *TST* atau *IGRA*. Satu minggu setelah infeksi, sistem kekebalan biasanya mampu menghentikan proliferasi basil tuberkel, sehingga penurunan infeksi penyakit tuberkulosis dilakukan usaha secara preventif (S. R. Siregar, 2019).

Perbedaan Antara *LTBI* dan Tuberkulosis

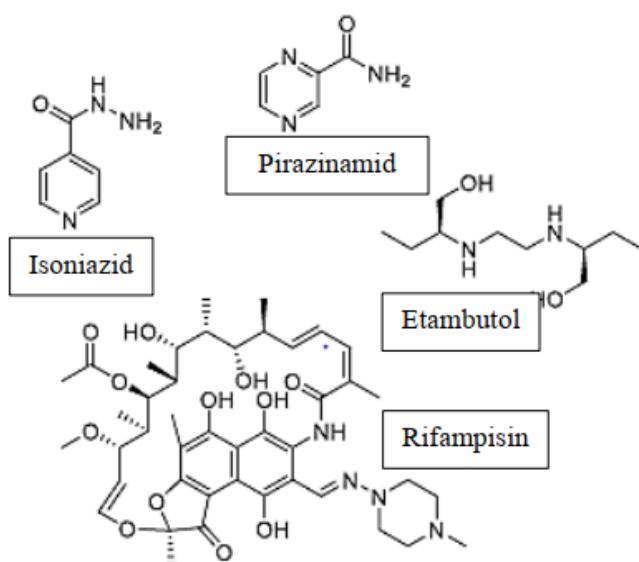
Infeksi *LTBI* atau infeksi TB laten merupakan stadium atau kondisi dimana terdapat sejumlah kecil *Mycobacterium Tuberculosis* di dalam tubuh. Bakteri ini tidak bertumbuh dikarenakan kontrol sistem kekebalan tubuh. Bakteri menjadi tidak aktif berkembangbiak, tetapi masih hidup di dalam tubuh dan nantinya bisa menjadi aktif kembali. Kondisi ini disebut sebagai infeksi TB laten (*LTBI*) atau TB laten. TB laten tidak menimbulkan seseorang merasa sakit, tidak ada gejala atau tanda yang terdeteksi pada evaluasi medis. Tes kulit tuberkulin adalah metode utama untuk mendiagnosis jenis TB ini. Hasil positif biasanya menunjukkan adanya infeksi TB. Tetapi pada pasien yang mengidap imunosupresi terkait HIV dan penerima vaksin BCG dapat memberikan hasil negatif palsu pada tes kulit. Hanya 1 dari 10 orang dengan Tuberkulosis laten dan sistem kekebalan yang normal akan mengembangkan penyakit TB dalam tubuh. Sedangkan seseorang dengan infeksi *Human Immunodeficiency Virus* dan Tuberkulosis, setiap tahun 1 dari 10 orang yang mengalami perkembangan penyakit Tuberkulosis. Pengobatan TB laten menggunakan obat antituberkulosis isoniazid dapat mengurangi risiko perkembangan penyakit TB, meskipun manfaat perlindungan yang hanya bertahan sekitar 24 bulan lamanya (S. R. Siregar, 2019).

II.3. Terapi Tuberkulosis

Pada terapi pengobatan penyakit Tuberkulosis aktif menggunakan regimen terapi kombinasi OAT yang terdiri dari lebih dari 3 macam obat. Pada saat pasien Tuberkulosis aktif biasanya diberikan obat isoniazid (INH), rifampisin (RIF), pirazinamid (PZA) dan etambutol (EMB) selama 14 hari yang merupakan fase intensif (Gambar II.2.1). Lalu dilakukan terapi dilanjutan dengan isoniazid dan rifampisin selama 4 bulan lagi (fase lanjutan) untuk menghancurkan sisa bakteri yang telah memasuki keadaan dorman. Tujuan awal terapi kombinasi adalah untuk meminimalkan perkembangan resistensi terhadap streptomisin setelah obat pertama kali diperkenalkan. Saat ini terapi standar untuk infeksi Tuberkulosis yang peka terhadap obat sangat efektif dalam pembersihan dari *Mycobacterium Tuberculosis* tersebut (Irianti dkk., 2016).

Berbagai pilihan terapi obat memiliki standar populasi tujuan yang berbeda untuk *Mycobacterium Tuberculosis*. Isoniazid, penghambat sintesis pada dinding sel bakteri, dengan aktif membunuh bakteri yang sedang berkembangbiak menjadi lebih banyak dan

mengambil peranan penting dalam memberantas bakteri yang bereplikasi. Rifampisin, penghambat sintesis RNA, aktif melawan bakteri yang bereplikasi dan tidak bereplikasi. Pirazinamid, dianggap sebagai penghambat kekuatan motif proton, hanya muncul dalam bentuk aktifnya dalam keadaan asam selama 2 bulan awal terapi. Obat rifampisin dan pirazinamid berperan besar dengan memperpendek durasi terapi dari lebih dari 24 bulan menjadi hanya 6 bulan. Cara kerja masing-masing dalam menentukan peran obat pada pengobatan tuberkulosis.



Gambar II.3. Obat lini pertama untuk terapi Tuberkulosis (Hoagland et al, 2016).

II.4. Obat Anti Tuberkulosis Pilihan Pertama

Obat-obatan antituberkulosis pilihan pertama yang paling efektif saat ini adalah isoniazid, rifampisin, pirazinamid, ethambutol. Sebanyak 4 jenis obat pilihan pertama telah digunakan selama bertahun-tahun oleh masyarakat di dunia, bahkan isoniazid telah digunakan sejak 1950.

Obat pilihan pertama ini dapat diberikan peroral dikarenakan bersifat lipofilik atau larut dalam lemak (Sudigdoadi, 2016).

Tabel II.1. Obat Lini Pertama dalam pengobatan Tuberkulosis

No	Nama Obat	Mekanisme Kerja	Sumber
1	Isoniazid	Menghambat atau meninhibisi biosintesis asam mikolat yang mempunyai konstituen penting dalam pembentukan dinding sel mikobakteri tuberkulosis. Bersifat bakteriostatik sebagai antibakteri.	(Irianti dkk., 2016)
2	Ethambutol	Menghambat dan menghalangi sintesis metabolit sel dan menjadikan metabolisme sel terhambat dan sel mati, dapat timbul resistensi bila digunakan sendiri, bersifat tuberkulostatik (aktif terhadap sel yang sedang berkembangbiak) dan menekan pertumbuhan bakteri TB yang resisten terhadap isoniazid juga pada obat streptomisin.	(Irianti dkk., 2016)
3	Pirazinamid	Pirazinamid masuk ke dalam sel bakteri <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> dimana enzim pirazinamid kemudian mengubah pirazina yang tidak aktif menjadi asam pirazinoid. Dalam kondisi asam, asam pirazinoid ini akan mengganggu sintesis FSA I yang dibutuhkan oleh bakteri untuk menghasilkan asam lemak baru yang diperlukan untuk membelah. Hal inilah yang menyebabkan bakteri Tuberkulosis tidak berkembang biak yang kemudian mati.	(Irianti dkk., 2016)
4	Rifampisin	Menghambat/menghalangi dalam perkembangbiakan bakteri dengan cara menghambat sintesis protein, khususnya pada tahapan transkripsi RNA. Rifampisin memblokir perlekatan pada enzim RNA polimerase dengan mengikat sisi aktif enzim.	(Irianti dkk., 2016)

Isoniazid (INH/H)

Isoniazid merupakan obat *analog thiacetazone* yang telah menjadi obat antituberkulosis yang efektif sejak tahun 1940-an. Upaya peningkatan efektivitas *thiacetazone* dilakukan dengan cara mengganti cincin fenil dengan cincin piridin karena didasari oleh berbagai penelitian, nikotinamida memiliki efek penghambatan terhadap *Mycobacterium Tuberculosis*. Isoniazid menjadi peran utama terhadap evaluasi intermediet lain dari proses sintesis yang mengarah pada penemuan *nicotinic isonicotinic hydrazide*. Isoniazid pertama kali disintesis pada tahun 1912. Aktivitas antituberkulosis didaftarkan pada tahun 1952. Isoniazid merupakan salah satu obat dari antituberkulosis yang paling banyak digunakan juga merupakan salah satu komponen kunci dalam terapi pilihan pertama untuk penyakit TBC. Terapi menggunakan INH selama 9 bulan digunakan untuk mengobati infeksi laten. Isoniazid merupakan agen bakterisida yang sangat baik dalam melawan basil replikasi aktif secara metabolik dan terutama bertanggung jawab dalam perkembangbiakan bakteri pada fase terapi pertama penyakit Tuberkulosis.

Isoniazid memasuki sel MTB dalam bentuk prodrug. Lalu INH akan bersatu dan diaktifkan oleh enzim *katalase peroksidase* (KatG) yang dikode oleh gen KatG. Spesies aktif INH mungkin merupakan radikal *acyl isonicotinic* yang kemudian membentuk prodrug dari penambahan langsung dua atau lebih molekul yang berbeda untuk membentuk produk reaksi tunggal yang mengandung semua atom dari semua komponen dengan radikal NAD. Hasil adisi yang terbentuk adalah *isonicotinic acyl-NADH* (dalam beberapa jurnal disebut sebagai bentuk aktif dari obat isoniazid). Produk tambahan ini bersifat toksik pada sel bakteri dan secara berturut-turut mempengaruhi target intraseluler seperti biosintesis asam mikolat yang merupakan komponen penting dari dinding sel bakteri (Rinanda, 2015).

Isoniazid adalah agen bakterisida aktif terhadap organisme dari genus *Mycobacterium*, khususnya *Mycobacterium Tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* dan *Mycobacterium kansasi*. Isoniazid bersifat bakterisida untuk mikobakteri yang membelah dengan cepat, tetapi bersifat bakterisida untuk mikobakteri yang tumbuh lambat. Isoniazid sangat spesifik karena menjadi aktif hanya terhadap sekelompok kecil mikobakteri dan sebagian besar tidak efektif terhadap mikroorganisme lain. Hal ini disebabkan oleh beberapa aspek metabolisme yang unik, misalnya aktivitas KatG yang sangat tinggi dan mekanisme penghabisan obat yang tidak sempurna pada *Mycobacterium Tuberculosis*. Isoniazid

memiliki aktivitas bakterisida yang cepat, oleh karena itu isoniazid mampu membunuh bakteri yang tumbuh aktif dan menyebabkan penurunan cepat kandungan basil dalam sputum setelah dua minggu pertama terapi. Kemampuan ini kemudian melambat karena populasi bakteri tidak tumbuh. Isoniazid memiliki efek samping yang baik pada kelainan enzim hati penyebab gangguan pada hati (*hepatitis*) terutama pada pasien usia lanjut (Wang, 2018).

Efek samping terkait neurologis adalah: *parestesia*, *neuritis perifer*, gangguan penglihatan, *neuritis optik*, *atrofi optik*, *tinitus*, *vertigo*, *ataksia*, mengantuk, mimpi berlebihan, *insomnia*, *amnesia*, *euforia*, *psikosis toksik*, perubahan perilaku, depresi, memperburuknya daya ingat, hiperrefleksia, memutar otot, kejang-kejang (Amalia dkk, 2016).

II.5. Kulit Buah Naga (*Hylocereus polyrhizus*)

Pada setiap buah hampir merupakan makanan yang kaya dengan sumber antioksidan. Tanaman Buah Naga merupakan contoh dari tanaman buah yang populer di masyarakat Indonesia. Buah naga yang populer di Indonesia adalah buah naga merah berdaging merah (*Hylocereus polyrhizus*). Buah naga merah memiliki kemampuan antiradikal yang lebih tinggi daripada buah naga putih. Kulit buah naga memiliki potensi antioksidan yang lebih besar dibandingkan buahnya. Kulit buah naga merah merupakan bagian yang tidak banyak dimanfaatkan atau terbuang dengan sia-sia. Di dalam kulit buah naga masih mengandung senyawa antioksidan yang sangat tinggi dan banyak manfaatnya. Senyawa antioksidan dapat melakukan perlakuan terhadap oksidasi di dalam tubuh. Jika tingkat oksidasi dalam tubuh meningkat, maka akan menyebabkan kerusakan DNA dan faktor resiko kanker akan lebih meningkat. Salah satu pemanfaatan yang dapat dilakukan pada kulit buah naga adalah dengan cara dibuat dalam bentuk ekstraknya sehingga dapat digunakan sebagai bahan dasar berbagai makanan dan sumber vitamin yang bermanfaat bagi kesehatan. Selama ini sudah cukup banyak penelitian tentang ekstraksi kulit buah naga yang dilakukan, termasuk ekstraksi dari senyawa betasianin (Wahdaningsih dkk., 2016).

Efek antibakteri ekstrak etanol kulit buah naga merah yaitu betasianin diduga karena adanya metabolit sekunder di dalamnya yang menunjukkan bahwa kandungan ekstrak etanol kulit buah naga merah adalah senyawa flavonoid, alkaloid, dan steroid.

Mekanisme kerja senyawa yang terdapat pada kulit buah naga sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk sempurna dan menyebabkan kematian sel. (Ruswanto dkk, 2019).

Kandungan Kimia Kulit Buah Naga

Buah naga merupakan jenis buah tropis populer yang memiliki kandungan fenolik tinggi yang merupakan kontributor utama potensi antioksidan dan manfaat kesehatan dari ampas dan limbah kulit buah naga. Meskipun beberapa senyawa fenolik yang terdapat pada buah naga sebelumnya telah dilaporkan, analisis komprehensif profil fenolik lengkap. Senyawa fenolik diekstraksi dari kulit dan daging buah naga putih dan merah. Kandungan fenol ditentukan oleh kandungan total fenolik (*TPC*), kandungan flavonoid total (*TFC*) dan kandungan tanin total (*TTC*), sedangkan aktivitas antioksidan diukur dengan *2,2-difenil-1-pikrilhidrazil* atau (*DPPH*), daya antioksidan pereduksi besi (*FRAP*), *2,2'-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid* (*ABTS*) dan kapasitas antioksidan total (*TAC*). Hasil penelitian menunjukkan bagian pada kulit buah naga memiliki kandungan total fenolik dan kapasitas antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan dagingnya, selain itu kulit buah naga memiliki kandungan flavonoid dan tanin yang lebih tinggi dibandingkan dengan daging buahnya. Kromatografi cair kinerja tinggi yang dilengkapi dengan *photodiode array detector* (*HPLC-PDA*) mengkuantifikasi senyawa fenolik pada bagian yang berbeda dari buah naga dan menunjukkan bahwa kulit naga memiliki konsentrasi fenolat yang lebih tinggi daripada pada bagian daging buah naga. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa baik kulit buah naga maupun pada bagian daging buah naga merupakan sumber potensial senyawa fenolik, dengan kulit buah naga khususnya merupakan sumber antioksidan fenolat yang berpotensi sebagai bahan untuk industri makanan dan farmasi (Ibrahim dkk., 2018).

Betalain

Betalain adalah kelas pigmen yang mengandung nitrogen hidrofilik, yang telah dilaporkan dari *genus Hylocereus*, terutama dari pitaya merah. Mereka dibagi menjadi *antosianin*, *betaxanthins* (pigmen kuning-oranye) dan betasanin (pigmen merah-ungu). Mereka mampu menyerap radiasi dalam rentang terlihat antara 476 dan 600 nm. Berbeda dengan antosianin, betalain memiliki gugus fungsi karboksil, bukan hidroksil gugus fungsi. Betanin memiliki berbagai aktivitas biologis sebagai antioksidan, antiinflamasi,

hipoglikemik, antiproliferatif, kardioaktif, radioprotektif, neuroprotektif, diuretik, hipolipidemik, dan nyeri *osteoarthritis*. Kandungan pada kulit buah naga berasal dari asam amino *L-tirosin* yang dianggap sebagai berasal dari asam arogenik pada tanaman (Ibrahim dkk., 2018). Ada tiga enzim utama yang terlibat dalam biosintesis betalains: *4,5-DOPAextradiol-dioxygenase*, *tirosinase*, dan *betanidin-glucosyltransferase*. Asam betalamik adalah kromofor dari semua betalain dan struktur dasarnya untuk biosintesis betalain. Jalur biosintetik betalain dimulai dengan konversi *L-tirosin* menjadi *L-DOPA* (dopamin) oleh hidroksilasi melalui enzim *tirosinase (polifenoloksidase)*. Pembelahan *ekstradiol L-DOPA* untuk menghasilkan *4,5-sco-DOPA* (perantara) dikatalisis oleh *4,5-DOPA ekstradiol-dioksigenase* (Amalia dkk., 2016).

Betalain adalah salah satu golongan alkaloid merupakan zat aktif terkandung didalam ekstrak etanol 60% dari kulit buah naga merah yang diprediksi memiliki peranan penting dalam aktivitas antimikroba. Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan mengganggu struktur dari penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, pada akhirnya lapisan dinding sel tidak terbentuk sempurna dan membuat kematian pada sel yang diserang oleh bakteri *Mycobacterium Tuberculosis* (Ruswanto dkk., 2015). Betalain adalah senyawa warna atau pigmen merah-ungu dan kuning-oranye yang ditemukan pada buah-buahan, bunga, dan jaringan vegetatif (Amalia dkk., 2016). Betalain adalah pigmen warna yang larut dalam air dari kelompok alkaloid, pigmen nitrogen, dan merupakan pengganti antosianin di sebagian besar keluarga tumbuhan dari ordo *Caryophyllales* termasuk *Amaranthaceae*, dengan pigmen antosianin (Ibrahim dkk., 2018). Kulit Buah Naga Merah (*Hylocereus polyrhizus*) adalah salah satu bahan alami yang kaya akan zat fitokimia seperti fenol, asam asetat dan asam format, selain itu juga ditemukan alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan steroid (Amalia dkk., 2016).

Dari penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa ekstrak dari kulit buah naga ini memiliki daya antibakteri pada *Mycobacterium Tuberculosis*, *Staphylococcus aureus*, *E.Coli* dan *Candida albicans*. Hal ini disebabkan zat antimikroba yang terdapat dalam ekstrak kulit buah naga yaitu fenol, asam asetat, dan asam format. Penelitian lain juga membuktikan bahwa ekstrak *n-heksana*, kloroform dan etanol kulit buah naga merah memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif (Luo dkk., 2014).

II.6. Enzim *InhA*

InhA merupakan enzim enoil reduktase dari *Mycobacterium Tuberculosis* juga merupakan bagian dari keluarga *dehidrogenase* atau *reduktase* rantai pendek, mengkatalisis reduksi yang bergantung pada *NADH* asam lemak *trans-2-enoil* rantai panjang *ACP* dalam jalur biosintesis asam lemak tipe 2 dari *Mycobacterium Tuberculosis*. Enzim *Enoil-ACP* reduktase yang bergantung pada *NADH* dikodekan oleh gen Mikobakterium. *InhA* telah divalidasi sebagai target molekuler penting dari obat Tuberkulosis yaitu Isoniazid (Amalia dkk., 2016).

InhA mengkatalisis reduksi rantai panjang *trans-2-enoil-ACP* dalam jalur biosintetik asam lemak tipe 2 *Mycobacterium Tuberculosis*. Inhibisi *InhA* mengganggu biosintesis asam mikolat, sehingga mengganggu struktur dinding sel *Mycobacterium Tuberculosis* (Siregar, 2015).

II.7. Parameter Sifat Fisikokimia

Parameter sifat fisikokimia merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi aksi suatu senyawa. Parameter ini dapat mencerminkan karakteristik suatu senyawa baik secara fisik dan kimianya. (Pranowo, 2011).

a. Koefisien partisi (LogP)

LogP merupakan parameter fisikokimia yang menunjukkan sifat lipofilisitas atau hidrofobisitas suatu senyawa agar bisa sampai pada target kerjanya. LogP menunjukkan bahwa semakin mudah senyawa tersebut larut dalam lemak atau menembus lapisan membran biologis. Namun, apabila nilai LogP terlalu besar sifatnya sangat lipofil maka kemungkinan sukar didistribusikan karena komponen terbesar tubuh adalah air. Nilai rentang LogP untuk dapat penetrasi melalui sawar darah otak adalah 1,5 – 4,6 (Vraka et al, 2017).

a. Bobot molekul (BM)

Nilai BM berkaitan dengan proses distribusi obat, distribusi obat terjadi dengan cara menembus membran biologis melalui proses difusi. Bobot molekul menjadi faktor penting untuk obat yang mengalami proses absorpsi misalnya obat dengan pemberian rute oral yang harus menembus membran tersebut terlebih dahulu sebelum berinteraksi dengan reseptor, dan BM yang besar juga sukar untuk melewati sawar darah otak (Case, 2018).

b. Ikatan hidrogen

Ikatan hidrogen merupakan yang spesifik jarak dekat, dan berinteraksi langsung. Ikatannya terjadi antara atom hidrogen terikat secara kovalen dan atom elektronegatif (F, N, S atau O). Analisis interaksi protein-ligan dalam protein data bank menunjukkan bahwa gugus karboksil memiliki dua tipe ikatan yang berbeda, interaksi dengan atom karboksil oksigen dan atom nitrogen dari muatan berbagai berbagai residu asam amino (Muchtaridi, 2018)

II.8. *Density Functional Theory (DFT)*

DFT merupakan metode yang umum digunakan dalam optimasi geometri khususnya untuk molekul yang relatif besar dan logam transisi. *DFT* merupakan pendekatan untuk perhitungan struktur elektron secara mekanika kuantum. *DFT* ini menggunakan persamaan *Kohn-Sham* yang merupakan persamaan numerik dari persamaan *Schrodinger*. *DFT* dilakukan untuk mencari keadaan dasar atom secara numerik. Energi keadaan dasar adalah energi pada kondisi atom paling baik dan stabil yang memiliki arti untuk melakukan desain material perlu diketahui energi keadaan dasar dari atom strukturnya (Ruswanto, 2019).

Metode *DFT* memerlukan fungsional yang didasari oleh pendekatan dari beberapa teori dalam perhitungan komputasi. Beberapa fungsi yang sering digunakan dalam penelitian adalah *B3LYP*, *B3PW91*, *BLYP*, *HFS*, *VWN*, *G96*, *P86*, *B96* dan *B3P86*. *B3LYP* dan *B3PW91* disebut juga sebagai fungsi *Hybrid* karena merupakan hasil kombinasi perkiraan *Hertree-Fock* dengan pertukaran energi dan perkiraan *DFT* dengan pertukaran energi, semuanya dikombinasikan dalam fungsional yang meliputi korelasi elektron (Frimayanti, 2021).

II.9. Penambatan Molekul

Penambatan molekul termasuk kedalam SBDD untuk dapat memprediksi bentuk ligan pada reseptor target bedasarkan tingkat akurasi yang tinggi (Fadhila, 2016). Penambatan Molekul ini bertujuan untuk memprediksi mode pengikatan dua atau lebih molekul yang dominan dari ligan dengan protein dari struktur tiga dimensi yang diketahui. Penambatan ini dapat digunakan dalam melakukan skrining virtual, memberi peringkat pada hasil dan mengusulkan hipotesis struktural tentang bagaimana ligan menghambat target, yang

sangat berharga dalam pengoptimalan. Penambatan molekul bergantung pada dua metode yaitu bidang gaya yang bertujuan untuk memperkirakan energi bebas dari pengikatan kompleks yang diperkirakan berdasarkan konformasi ikatan tertentu. Dan yang kedua metode pencarian untuk menjelajahi ruang konformasi yang tersedia untuk ligan dan target (Pitaloka dkk., 2021).

Pada penambatan molekul terdapat berbagai macam kegunaan dan aplikasi dalam penemuan obat, termasuk studi struktur aktivitas, menemukan prospek potensial dengan skrining virtual, memberikan hipotesis yang mengikat untuk memfasilitasi prediksi studi mutagenesis, membantu kristalografi sinar-X dalam pemasangan substrat dan penghambat kerapatan elektron, studi mekanisme kimia dan desain secara kombinatorial (Sanchez et al, 2016). Keberhasilan sering diukur dalam istilah *Root Mean Square Deviation (RMSD)* dari koordinat kartesius atom-atom ligan dalam konformasi dan kristalografi, penambatan molekul umumnya dianggap berhasil jika kurang dari 2 Å (Muttaqin, 2019).

Tahapan Penambatan Molekul

1. Algoritma pencarian, yaitu menentukan pose yang optimal yang mungkin dari suatu ligan terhadap reseptor, sehingga diperoleh pose paling stabil dari kompleks ligan reseptor yang terbentuk. Gugus fungsional ligan akan berinteraksi dengan residu asam amino reseptor sehingga akan membentuk ikatan.
2. *Scoring*, yakni bertujuan untuk menghitung dan memprediksi afinitas pengikatan antara reseptor dan ligan yang terbentuk. Skor penilaian diberikan pada masing – masing pose yang akan diurutkan dan senyawa aktif dengan skor tertinggi ditetapkan sebagai pose ligan dengan protein yang paling sesuai.

Parameter Penambatan Molekul

1. Interaksi Ikatan, ketika ligan dengan protein berinteraksi maka terbentuk kompleks. Banyak energi yang terlibat dalam intermolekul yang tergabung diantaranya: hidrofobik, *Van der Waalss*, ikatan hidrogen, dan elektrostatik. Interaksi pemodelan intermolekul dalam suatu ligan-protein kompleks sangat sulit karena terdapat banyak derajat kebebasan dan pengetahuan yang tidak cukup dari efek pelarut dalam gabungan pengikatan (Martinez et al, 2003).

2. Energi bebas Gibbs (ΔG), di definisikan sebagai energi yang timbul dari interaksi protein dengan ligan. Energi bebas Gibbs (ΔG) yang dihasilkan dalam simulasi penambatan molekul menghitung energi ikatan antara ligan dengan reseptor, makin rendah nilai ΔG mendeskripsikan bahwa makin baik afinitas yang terjadi antara ligan dengan reseptor (Kroemer, 2007).

$$\Delta G = \Delta E_{el} + \Delta E_{vdW} + \Delta G_{pol} + \Delta G_{np}$$

Dimana tiga istilah pertama merupakan standar energi MM yaitu interaksi ikatan elektrostatik dan *Van der Waalss*. Sedangkan G_{pol} dan G_{np} adalah kontribusi polar dan non-polar untuk energi bebas solvasi. G_{pol} biasanya diperoleh dengan menggunakan persamaan PB (*Poisson Boltzmann*) atau model GB (*Generalized Born*), sedangkan istilah non-polar diperkirakan dari hubungan linier dengan luas permukaan pelarut. Istilah terakhir adalah suhu absolut (T), dikalikan dengan entropi (S) (Genheden & Ryde, 2015).

3. Konstanta Inhibisi (K_i), di definisikan sebagai konstanta penghambatan suatu protein oleh ligan. Dalam simulasi penambatan molekul konstanta inhibisi sering digunakan sebagai parameter untuk menentukan penambatan ligan terhadap protein. Semakin kecil nilai konstanta inhibisi menunjukkan bahwa semakin baik suatu ligan dalam menghambat suatu protein (Kroemer, 2007). Terdapat hubungan antara energi bebas ikatan (ΔG) dan konstanta inhibisi yang ditunjukkan dalam persamaan berikut.

$$K_i = e^{-\Delta G/RT}$$

ΔG adalah energi penambatan molekul, R adalah konstanta gas dan T adalah suhu (K) (Yunta, 2016). Konstanta inhibisi (K_i) merupakan penghambatan terhadap aktivitas protein oleh suatu ligan. Nilai K_i menginterpretasikan kestabilan kompleks yang terbentuk antara ligan dengan reseptor. Semakin kecil nilai K_i maka semakin tinggi afinitas ligan pada sisi aktif reseptor sehingga aktivitas senyawa semakin baik (Kim & Skolnick, 2007).

Validasi Penambatan Molekul

Validasi penambatan molekul ialah suatu cara menilai dari parameter tertentu, didasari dengan penelitian di laboratorium dalam menunjukkan bahwa parameter tersebut masuk kedalam persyaratan didalam penggunaannya. Validasi tersebut diperuntukan agar mendapatkan bukti perangkat lunak yang di program dalam suatu komputer dapat digunakan untuk simulasi penambatan molekul. Validasi penambatan molekul dalam

aplikasi *Autodock* dengan cara penambatan ulang ligan alami terhadap protein target. Konformasi dan tempat ligan berinteraksi di tentukan dengan pengaturan *gridbox*. Dikatakan valid jika hasil penambatan ulang pada pose pengikatan paling baik mendapatkan nilai $RMSD < 2 \text{ \AA}$. Selanjutnya pengaturan *gridbox* tersebut yang digunakan dalam metode penambatan molekul senyawa uji (Muttaqin, 2019).

Dalam studi konformasi $RMSD$ digunakan untuk mengukur kesamaan koordinat dalam struktur 3D. $RMSD$ biasanya digunakan untuk ukuran kuantitatif kesamaan dua molekul atau lebih, dalam penambatan molekul $RMSD$ berguna untuk mempelajari konfigurasi vektor ligan ketika terikat pada makromolekul dengan melihat tumpang tindih hasil penambatan ulang, semakin rendah nilai $RMSD$ maka semakin baik model struktur dengan struktur aslinya. Setelah dilakukan validasi, kemudian dilakukan penambatan molekul ligan uji. Interpretasi hasil penambatan molekul ligan uji dilakukan dengan melihat poin energi bebas ikatan (ΔG), konstanta inhibisi (K_i), keduanya berkaitan dengan afinitas pengikatan, juga analisis interaksi ikatan yang terjadi antara ligan dan reseptor target (Muttaqin, 2019). Nilai ΔG negatif membuktikan bahwa senyawa uji memiliki afinitas yang baik. Nilai K_i menunjukkan banyaknya suatu ligan yang dapat menghambat atau menginhibisi suatu protein atau target. Semakin kecil nilai K_i maka akan semakin baik (Pitaloka dkk., 2021).

II.10. Dinamika Molekuler (*Molecular Dynamic*)

Dinamika molekuler (MD) adalah suatu metode simulasi menggunakan media komputer yang dapat mempresentasikan interaksi pada molekul atom dalam jangka waktu tertentu. Teknik didasari pada persamaan hukum Newton dan hukum mekanika klasik. MD memprediksi bagaimana setiap atom dalam protein atau sistem molekuler lainnya bergerak seiring waktu berdasarkan model umum fisika yang mengatur interaksi antar atom. Simulasi dinamika molekul dapat menangkap berbagai macam proses biomolekuler penting, termasuk perubahan konformasi, pengikatan ligan, dan pelipatan protein yang mengungkapkan posisi semua atom. Simulasi MD juga dapat memprediksi bagaimana biomolekul dalam merespon pada tingkat atom terhadap gangguan seperti mutasi, fosforilasi, protonasi, dan penambahan atau penghilangan ligan. Simulasi MD sering digunakan dalam kombinasi dengan berbagai teknik biologi struktural eksperimental, termasuk kristalografi sinar-X, mikroskop *cryoelektron* (*cryo-EM*), resonansi magnetik

nuklir (NMR), resonansi paramagnetik elektron (EPR), dan transfer energi resonansi forster (FRET) (Muttaqin, 2019).

Validasi penambatan molekul bertujuan untuk mendapatkan pengaturan metode yang valid. Validasi penambatan molekul dalam aplikasi Autodock dengan cara penambatan ulang ligan alami terhadap protein target. Konformasi dan tempat ligan berinteraksi di tentukan dengan pengaturan *gridbox*. Dikatakan valid jika hasil penambatan ulang pada pose pengikatan paling baik mendapatkan *Root Mean Square Devition (RMSD)* dengan nilai $< 2\text{\AA}$. Selanjutnya pengaturan *gridbox* tersebut yang digunakan dalam metode penambatan molekul senyawa uji (Camacho, 2016).

$$RMSD (v,w) = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \|v_i - w_i\|^2}$$

Dalam bioinformatika *RMSD* adalah ukuran deviasi rata - rata akar kuadrat dari posisi atom, dalam studi konformasi *RMSD* digunakan untuk mengukur kesamaan koordinat dalam struktur 3D. *RMSD* biasanya digunakan untuk ukuran kuantitatif kesamaan dua molekul atau lebih, dalam penambatan molekul *RMSD* berguna untuk mempelajari konfigurasi vektor ligan ketika terikat pada makromolekul dengan melihat tumpang tindih hasil penambatan ulang, semakin rendah nilai *RMSD* maka semakin baik model struktur dengan struktur aslinya. (Sebastian, 2016)

Tahapan Simulasi Dinamika Molekul

Simulasi dinamika molekul terdiri dari beberapa rangkaian tahap dimulai dari persiapan berkas masukan ligan dan reseptor, pembuatan topologi juga koordinat ligan dan reseptor, solvasi, minimisasi ekuilibrasi, produksi, dan interpretasi hasil dinamika molekul:

1. Persiapan file ligan dan reseptor, metode simulasi dinamika molekul yang dimulai dengan cara mempersiapkan berkas masukan yaitu masing-masing ligan dan reseptor. Ligan yang digunakan adalah senyawa dengan klaster terbaik yang didapatkan dari hasil penambatan senyawa uji.
2. Pembuatan topologi dan koordinat, dibuat melalui berkas ligan, reseptor, dan kompleks ligan-reseptor dalam kondisi vakum dan dalam pelarut air. Tahapan topologi menggambarkan susunan dari beberapa atom pada suatu molekul susunannya yang tidak mengalami perubahan baik dari awal sampai akhir simulasi namun posisinya dapat berubah. Rangkaian ini dilakukan agar susunan

atom yang tetap dan tidak menunjukkan perubahan struktur atom-atom *backbone* residu maupun ligan.

3. Solvasi menjadi peran penting dalam menderskripsikan elektrostatik stabilitas lingkungan air, dan juga interaksi antar makromolekul. Model air digunakan supaya ligan dilarutkan dalam suatu model air tujuannya mengkondisikan sesuai dengan fisiologis tubuh manusia, yang kandungan terbesarnya adalah air (Frimayanti, 2021).

Parameter Simulasi Dinamika Molekul

1. Energi potensial selama proses simulasi, relaksasi sistem yang ditandai dengan menurunnya nilai energi potensial. Semakin lama durasi ekuilibrasi yang dijalani, maka semakin rendah nilai energi potensial kompleks ligan dengan reseptor tersebut (Case dkk., 2018)
2. *Root Mean Square Deviation (RMSD)* adalah deviasi yang diamati untuk memprediksi stabilitas suatu protein. *RMSD* berperan dalam menentukan konvergensi sekaligus menjelaskan pelipatan protein. Representasi grafis dari nilai *RMSD* menjelaskan kemungkinan variasi yang terjadi selama simulasi (Frimayanti, 2021).
3. *Root Mean Square Fluctuation (RMSF)* merupakan fluktuasi yang diamati antara residu atau atom yang ada dalam makromolekul. Fluktuasi atom menjelaskan tingkat fleksibilitas suatu protein selama simulasi. *RMSF* dinyatakan pada saat energi potensial memiliki fluktuasi minimal dari 1 ns sampai selesainya simulasi. Tujuan analisis *RMSF* adalah untuk melihat fluktuasi pada masing-masing residu, yang menggambarkan fleksibilitas residu asam amino tersebut (Pinto dkk., 2019).
4. *Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area (MMGBSA)* adalah metode aksesibilitas pelarut dalam memperoleh energi bebas dari informasi struktural untuk menghindari kompleksitas komputasi simulasi energi bebas. Dengan menggunakan pendekatan metode *MMGBSA* merupakan parameter dalam perkiraan aditivitas, dimana perubahan energi bebas bersih diperlakukan dengan jumlah komponen energi individu yang komprehensif, pada tiap-tiap komponen dengan dasar fisik. Pada metode simulasi dinamika molekul untuk memperkirakan energi bebas ikatan, dan konstanta penghambat atau menginhibisi (Muttaqin, 2019).

5. Analisis Interaksi ikatan yang terbentuk Interaksi ikatan yang terbentuk diantaranya ikatan hidrogen, ikatan ionik, dan lain lainnya. Ikatan hidrogen yang dibentuk oleh simulasi dinamika molekul memberikan analisis statistik stabilitas setiap interaksi tersebut. Parameter yang dianalisis adalah persentase *occupancy*. Singkatnya semakin besar nilai numerik dari persentase *occupancy*, semakin baik. Pada simulasi dinamika molekul analisis kondisi ikatan hidrogen dilakukan ketika tercapai kestabilan pada proses simulasi yang ditandai dengan stabilnya *RMSD* dan energi potensial (Garcia dkk., 2012).

AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement)

AMBER merupakan perangkat lunak yang digunakan untuk melakukan pendekatan simulasi dinamika molekul, terutama untuk biomolekul. Perangkat lunak *AMBER* terbagi menjadi dua bagian yaitu *Amber Tools 18* kumpulan program yang tersedia sebagian besar berlisensi GPL dan *Amber 18* yang berpusat disekitar program simulasi. *Amber Tools* adalah sekumpulan program dalam melakukan simulasi dan analisis biomolekul (Huang et al., 2010).

Beberapa informasi dalam aplikasi *AMBER 18*:

1. Koordinat kartesius untuk setiap atom dalam sistem. Ini biasanya berasal dari kristalografi sinar-X, NMR spektroskopi, atau pembuatan model. Umumnya harus dalam format *Protein Data Bank (PDB)*. Program ini menyediakan platform untuk melakukan banyak tugas dalam pemodelan. Secara umum, pengeditan file-file diperlukan, dan skrip pdb4amber dapat melakukan ini.
2. Topologi, konektivitas, nama atom, jenis atom, nama residu, dan energi. Informasi ini berasal dari database. Topologi untuk asam amino standar serta asam amino bermuatan seperti N- dan C-terminal, DNA, RNA, dan gula dan lemak. Informasi topologi untuk molekul lain (tidak ditemukan dalam standar database) disimpan dalam "file residu" yang dibuat pengguna, yang umumnya dibuat menggunakan *antechamber*.
3. Medan gaya, parameter untuk semua jenis ikatan, sudut, dihedral, dan atom dalam sistem. Standar parameter untuk beberapa bidang gaya ditemukan dalam database. Medan gaya ini dapat digunakan untuk protein dan asam nukleat, atau dapat digunakan pada modifikasi medan gaya standar (Case et al, 2018).