

# Bioaktivitas Forbazol-E terhadap Kerusakan Ultrastruktur Dinding Sel *Staphylococcus aureus*

(PHORBAZOLE-E BIOACTIVITY TOWARDS  
*Staphylococcus aureus* CELL WALL ULTRASTRUCTURE DESTRUCTIONS)

Ni Putu Ristiati<sup>1</sup>, Ketut Suata<sup>2</sup>, Dewa Ngurah Suprapta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam,  
Universitas Pendidikan Ganesha, Jl.Udayana, Singaraja,  
Telp: 0362-25072, fax : 0362-25335,

<sup>2</sup>Lab Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran,

<sup>3</sup>Lab Hama dan Penyakit Tanaman Fakultas Pertanian,  
Universitas Udayana, Jl.Sudirman, Denpasar, Bali

## ABSTRACT

The bioactivity role of phorbazol-E in inhibiting bacterial protein synthesis is unknown. On the contrary, phorbazol-A, B, C, and D have been proved to inhibit the bacterial protein synthesis. The effect of forbazol-E on *Staphylococcus aureus* ATCC25922 cell wall ultrastructure destruction was observed. The study used randomized-post test-only control group design which consist of three treatment (control, treatment I and II) with 9 repetition. Treatment I: 1 ml overnight culture of *S. aureus* was cultured into a mixed of 20 ml Mueller Hinton (MH) broth and 37.5 mg/L phorbazol-E; whereas in treatment II phorbazol-E used was 75.0mg/L. The growth curve of *S. aureus* was monitored using spectrophotometer; whilst the destruction of cell wall ultrastructure was observed using Transmission Electron Microscope (TEM) at Eijkman Insitute, Jakarta. Phorbazol-E at 75.0mg/L significantly caused the destruction of the bacteria cell wall ultrastructure and inhibited the bacteria growth in comparison to phorbazol-E at 37.5 mg/L ( $p < 0.05$ ).

Key words: forbazol-E. *S. aureus*.

## PENDAHULUAN

Forbazol E disintesis dari 1-(p-tosil)pirol-2-karbonil klorida dan garam fenasil amonium klorida dengan rendemen cukup tinggi melalui empat tahap reaksi yaitu : pertama, reaksi penggabungan; kedua, siklodehidrasi; ketiga, hidrolisis; dan keempat, klorinasi (Muderawan, 2003). Sampai saat ini penelitian tentang bioaktivitas forbazol E terhadap mikroba khususnya *Staphylococcus aureus* belum ada, hanya saja forbazol A, B, C dan D yang mengandung cincin oksazol sudah diteliti (Adamceski *et al.*, 1988; Ichiba *et al.*, 1991; Lindquist *et al.*, 1991; Matsunaga *et al.*, 1991; Meyers *et al.*, 1986; Rudi *et al.*, 1994) dan sudah dibuktikan mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis protein (Walsh, 2000).

Uji pendahuluan yang telah dilakukan di Lembaga Eijkman dengan kontrol (tanpa forbazol E) dan perlakuan dengan konsentrasi forbazol E 75 mg/L dalam medium *Mueller Hinton* cair menunjukkan pada konsentrasi 75

mg/L terjadi kerusakan pada dinding sel dengan pengamatan mikroskop elektron transmisi (*TEM Jeol 1010*) pada perbesaran 25.000x (Ristiati, 2005). Hasil uji pendahuluan ini menunjukkan adanya perbedaan dengan penemuan Walsh (2000) yang mengatakan bahwa cincin oksazol menghambat sintesis protein, sedang hasil uji pendahuluan menunjukkan terjadi kerusakan pada dinding sel. Berdasarkan penemuan tersebut perlu diteliti bagaimana bioaktivitas forbazol E terhadap hambatan pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel *S. aureus* pada konsentrasi 37,5 mg/L dan 75 mg/L.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambatan forbazol E terutama terhadap hambatan pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel *S. aureus*. Manfaat penelitian ini adalah menambah wawasan tentang hambatan pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel oleh forbazol E terhadap bakteri khususnya *S. aureus*, dan mempunyai prospek untuk uji aktivitas biologi pada hewan lain.

## METODE PENELITIAN

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* ATCC 25922 hasil isolasi kultur murni dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Unud Denpasar.

Jumlah ulangan 9 kali berdasarkan (T-1)(R-1)<sup>3</sup> 15 (Rochiman, 1989) dimana T = perlakuan dan R = replikasi. Jadi, satu unit percobaan terdiri dari 9 tabung reaksi yang berisi medium kaldu *Mueller Hinton* untuk menumbuhkan *S.aureus*. Dengan demikian jumlah seluruh unit percobaan menjadi 27 unit. Sampel dipilih secara acak dengan *simple random sampling*.

### Pengukuran hambatan pertumbuhan *S.aureus*

Dituangkan sebanyak 20 ml medium MH cair pada tabung reaksi untuk kelompok kontrol (9 tabung reaksi), perlakuan I (9 tabung reaksi), perlakuan II (9 tabung reaksi). Kultur *S.aureus* yang telah ditumbuhkan dalam medium MH cair diletakkan selama 24 jam pada *incubator shaker*, diambil dengan pipet sebanyak 1 ml dan transfer pada kelompok kontrol, perlakuan I dan perlakuan II yang telah berisi 20 ml medium MH cair. Dittransfer forbazol E dengan pipet sebanyak 1 ml pada konsentrasi 37,5 mg/L pada perlakuan I dan konsentrasi 75 mg/L pada perlakuan II. Kelompok kontrol tidak diberikan forbazol E. Spektrofotometer dikalibrasi pada kerapatan cahaya (O.D) 600 nm untuk pengukuran *absorbance* (daya serap cahaya) *S.aureus*. Pengukuran pada spektrofotometer dilakukan mulai dari 0 jam, 4 jam, 8 jam, 12 jam, 16 jam, 20 jam, 24 jam, dan 28 jam (delapan kali pengukuran). Hasil pengukuran pada spektrofotometer disusun dalam bentuk grafik untuk mendapat gambaran hambatan pertumbuhan.

### Pengamatan kerusakan ultrastruktur dinding sel

Dilakukan pemeriksaan ultrastruktur sel dengan TEM sesuai dengan metode yang digunakan di Lembaga Eijkman Biologi Molekuler yang merupakan modifikasi metode Bozolla dan Russel (1999). Langkah-langkahnya sebagai berikut :

1) fiksasi : suspensi *S.aureus* disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm (*rotation per minute*) selama 15 menit. Pelet direndam ke dalam larutan campuran *glutaraldehyde*, *buffer cacodylate* 0,1 M dengan pH 7,4 dan 3% sukrosa selama 24 jam. Pencucian pelet dilakukan

dengan menggunakan *buffer cacodylate* 0,1 M dengan pH 7,4 selama 15 menit sebanyak 3 kali. Postfiksasi dilakukan dengan memasukkan pelet ke dalam larutan osmium tetraoksida 2%,  $K_3Fe(CN)_6$  2,5% selama 2 jam. Pelet kemudian dicuci kembali dengan menggunakan *buffer cacodylate* selama 15 menit sebanyak 2 kali. Semua tahapan fiksasi dilakukan pada suhu 4°C dan dalam keadaan teragitasi; 2) dehidrasi dan infiltrasi : dehidrasi dilakukan dengan menggunakan larutan etanol secara bertingkat dari konsentrasi 10% sampai dengan absolut. Waktu perendaman sampel dalam larutan etanol berkisar antara 10 menit hingga 30 menit. Proses dehidrasi berjalan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu 4°C. Proses infiltrasi menggunakan perbandingan larutan etanol absolut dan *propylene oxide* secara bertingkat hingga menggunakan larutan *propylene* murni. Infiltrasi dilakukan dalam kondisi teragitasi dan pada suhu ruang selama 30 menit untuk setiap tahapannya; 3) embedding : sebelum pelet direndam dengan menggunakan *spurr* terlebih dahulu direndam dengan campuran larutan *propylene oxide* dengan *spurr* secara bertahap selama 30 menit setiap tahapannya. Dalam proses *embedding* diupayakan agar tidak terdapat gelembung udara karena dapat mengganggu proses selanjutnya (pemotongan blok) sehingga tahap pelet direndam pada *spurr* dilakukan dalam kondisi vakum selama 24 jam. Proses polimerisasi *spurr* hingga menghasilkan blok dilakukan dalam *incubator vacuum* selama 16-18 jam pada suhu 70°C; 4) pemotongan blok sampel :

Tebal potongan agar dapat diobservasi di bawah mikroskop elektron transmisi berkisar antara 50-60 nm. Proses pemotongan menggunakan *diamond knife*. Hasil potongan dengan ukuran yang tipis tersebut di kumpulkan dan diletakkan pada permukaan *grid* yang dilapisi oleh larutan 0,5% *formvar* (*Sigma*) dalam *chloroform*. Kemudian dilakukan pewarnaan dengan menggunakan *uranyl asetat* dan *lead sitrat*. Setelah proses pewarnaan, *grid* yang telah tertempel oleh sampel siap untuk diamati di mikroskop elektron transmisi pada perbesaran 25.000x.

Persentase kerusakan dinding sel dihitung berdasarkan rumus Agrios (1988) :

$$I = \frac{\sum (n \times v)}{N \times Z} \times 100\%$$

Keterangan :

I = Tingkat kerusakan

n = Jumlah sel untuk setiap kategori kerusakan (skor 1, 3, 5)  
 v = skor kerusakan  
 Z = Nilai skor kerusakan tertinggi ( 5 )  
 N = Jumlah sel yang diamati (100 sel)

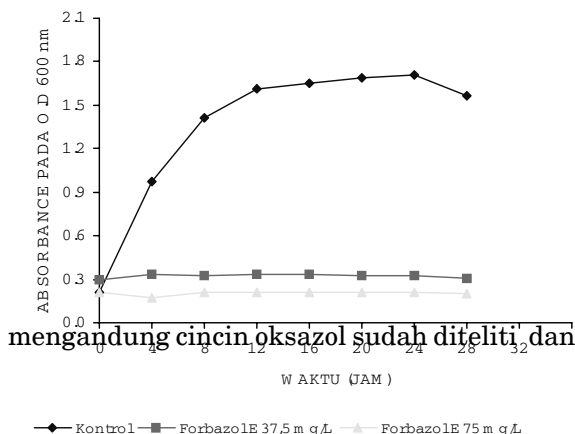
Data hambatan pertumbuhan dan persentase kerusakan dinding sel dianalisis (Zainuddin,1994) : 1) Uji Kolmogorov-Smirnov untuk menganalisis normalitas data ; 2) Uji Leven untuk menganalisis homogenitas data.; 3) Uji anava satu arah untuk menganalisis beda rerata antar kelompok; 4) Uji perbandingan ganda (*multiple comparison : Post Hock*) antar kelompok untuk menguji beda rerata kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan I, kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan II, dan kelompok perlakuan I dengan kelompok perlakuan II, dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil ( BNT ) untuk data yang variannya homogen; 5) Dalam percobaan ini digunakan tingkat kemaknaan  $\alpha = 0,05$

Rancangan Penelitian merupakan penelitian eksperimental sungguhan dengan rancangan *Randomized Posttest- Only Control Group Design* (Zaenuddin,1994). Penelitian dilakukan di Lembaga Eijkman Jakarta untuk mengetahui hambatan pertumbuhan *S.aureus* oleh forbazol E dan untuk mengetahui kerusakan ultrastruktur dinding sel diamati dengan mikroskop elektron transmisi (TEM). Waktu penelitian dari bulan November 2005 sampai dengan bulan Februari 2006.

**HASIL DAN PEMBAHASAN**

Forbazol E dalam penelitian ini menunjukkan rerata hambatan pertumbuhan pada *S. aureus* dengan nilai daya serap cahaya adalah  $1,357 \pm 0,492$  pada kelompok kontrol,  $0,325 \pm 0,002$  pada perlakuan I (forbazol E 37,5 mg/L) dan  $0,207 \pm 0,109$  pada perlakuan II (forbazol E 75 mg/L). Hasil analisis menunjukkan bahwa hambatan pertumbuhan *S. aureus* antara kelompok kontrol dan perlakuan I serta perlakuan II adalah berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

Kurva pertumbuhan *S. aureus* antara kelompok kontrol dan perlakuan I serta perlakuan II yang diukur mulai dari 0 jam sampai dengan 28 jam menunjukkan bahwa hambatan pertumbuhan pada kelompok kontrol, perlakuan I dan perlakuan II berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ). Hambatan pertumbuhan *S. aureus* terhadap forbazol E pada perlakuan II (75 mg/L) lebih tinggi dibanding dengan

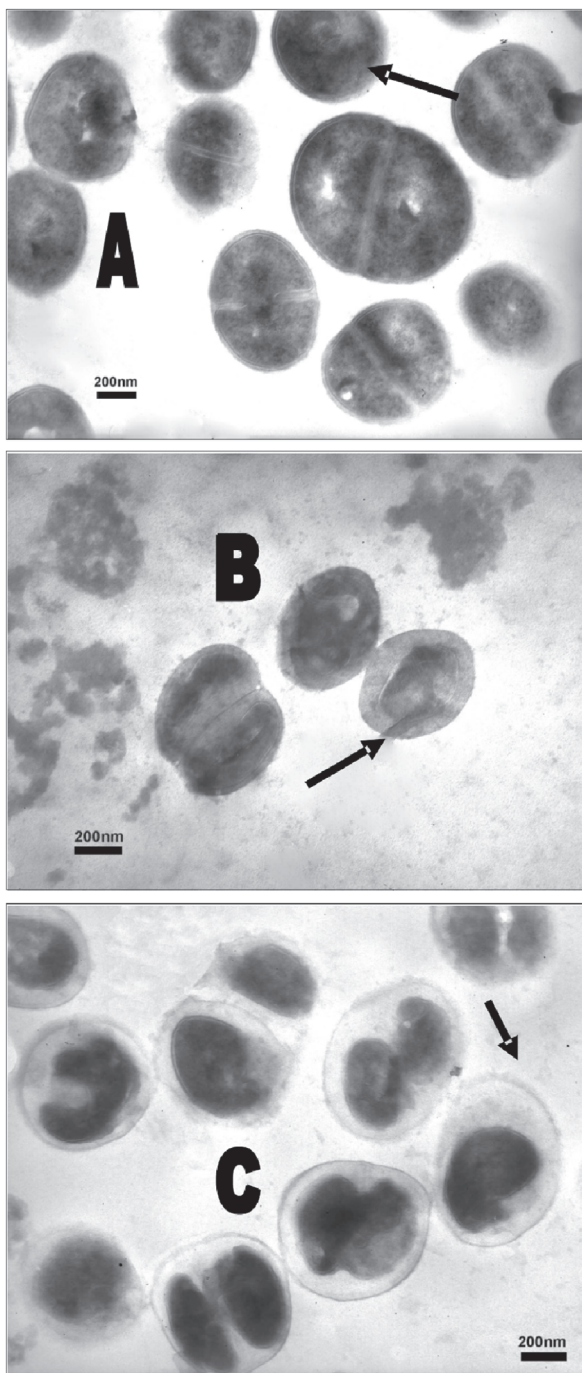


Gambar 1. Kurva Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada media *Mueller Hinton* yang diberikan perlakuan forbazol E

kelompok perlakuan I (37,5) mg/L (Gambar 1). Hasil analisis menunjukkan bahwa hambatan pertumbuhan pada perlakuan II berbeda bermakna dengan perlakuan I ( $p < 0,05$ ).

Dengan demikian dapat dikatakan bahwa perlakuan II (forbazol E 75 mg/L) menimbulkan hambatan pertumbuhan yang lebih tinggi dibandingkan dengan perlakuan I (forbazol E 37,5 mg/L). Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase rerata kerusakan dinding sel *S. aureus* oleh forbazol E yang dinyatakan dengan total skor pada kelompok kontrol (tanpa pemberian forbazol E) tidak mengalami kerusakan,  $60,755 \pm 5,536$  pada perlakuan I (forbazol E 37,5 mg/L) dan  $80,335 \pm 11,542$  pada perlakuan II (forbazol E 75 mg/L). Hasil analisis menunjukkan bahwa persentase total skor kerusakan dinding sel *S. aureus* yang disebabkan oleh forbazol E antara kelompok kontrol dan perlakuan I serta perlakuan II adalah berbeda bermakna ( $p < 0,05$ ).

Temuan penelitian ini menunjukkan bahwa forbazol E yang mengandung cincin oksazol ternyata dapat merusak struktur dinding sel *S. aureus*. Hal ini sesuai dengan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan di Lembaga Eijkman dengan kontrol (tanpa forbazol E) dan perlakuan dengan konsentrasi forbazol E 75 mg/L dalam medium *Mueller Hinton* cair menunjukkan pada konsentrasi 75 mg/L terjadi kerusakan pada dinding sel dengan pengamatan mikroskop elektron transmisi (*TEM Jeol 1010*) pada perbesaran 25.000x (Ristiati, 2005). Sampai saat ini penelitian tentang bioaktivitas forbazol E terhadap mikroba khususnya *S. aureus* belum ada, hanya saja forbazol A, B, C dan D yang



Gambar 2. Ultrastruktur sel *S.aureus* pada pembesaran 25.000x. A) kontrol; B) perlakuan I; C) perlakuan II. Pada A (kontrol) dinding sel *S. aureus* tampak utuh (tidak mengalami kerusakan) terlihat pada tanda  $\longrightarrow$ , pada B (forbazol E 37,5 mg/L) dinding sel *S. aureus* tampak mengalami kerusakan (64,755 %) terlihat pada tanda  $\longrightarrow$  dan pada C (forbazol E 75 mg/L) dinding sel *S. aureus* tampak mengalami kerusakan yang lebih besar (84,355 %) dibandingkan dengan B terlihat pada tanda  $\longrightarrow$ .

sudah dibuktikan mekanisme kerjanya melalui penghambatan sintesis protein (Walsh, 2000). Untuk mengetahui mekanisme secara fungsional terjadinya hambatan pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel *S. aureus* oleh forbazol E dengan pengamatan TEM diperlukan pembesaran lebih tinggi, misalnya dengan pembesaran 125.000x–135.000x (Bozzola dan Russel, 1999) sedang di Lembaga Eijkmann TEM pembesaran paling tinggi pada 25.000x.

Pada pengamatan dengan mikroskop elektron transmisi ternyata konsentrasi forbazol E berperan dalam tingkat kerusakan dinding sel. Pada konsentrasi 75 mg/L menimbulkan kerusakan lebih besar dibanding konsentrasi 37,5 mg/L (Gambar 2). Perlakuan I (forbazol E 37,5 mg/L) dinding sel mengalami kerusakan dan membran sel terlepas dari dinding sel sehingga tampak berongga, serta massa sitoplasmanya bergranula. Perlakuan II dinding sel mengalami kerusakan dimana membran sel terlepas dari dinding sel sehingga tampak rongga antara dinding sel dan sitoplasma, beberapa sel mengalami lisis pada dinding selnya, tampak pula granula-granula yang merupakan sisa-sisa sel yang sudah mengalami lisis di antara sel.

Ditinjau dari struktur molekulnya, forbazol E tidak mengandung gugus asil, C=O. Sebaliknya forbazol E memiliki lima pusat aktif yaitu : Cl, NH, N, O dan OH, yang dapat membentuk ikatan hidrogen dengan bagian peptida substrat (Muderawan, 2003). Hal ini memungkinkan forbazol E berinteraksi dengan bagian peptida lewat ikatan hidrogen dan menghalangi terjadinya reaksi pembentukan ikatan amida (Sulistia, 1998; Mutschler, 1991; Walsh, 2000; Wenzel, 2003) sehingga biosintesis dinding sel terhalang. Mekanisme ini, mungkin menyebabkan hambatan pertumbuhan dan kerusakan dinding sel *S. aureus* setelah pemberian forbazol E baik pada kelompok perlakuan I (37,5 mg/L) dan kelompok perlakuan II (75 mg/L), namun hal ini perlu penelitian lebih lanjut.

## SIMPULAN

Forbazol E dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan merusak ultrastruktur dinding sel dimana pemberian forbazol E pada konsentrasi 75 mg/L menimbulkan hambatan pertumbuhan lebih tinggi dibandingkan pada konsentrasi 37,5 mg/

L, sedang pemberian forbazol E pada konsentrasi 75 mg/L menimbulkan kerusakan ultrastruktur dinding sel lebih besar dibandingkan pada konsentrasi 37,5 mg/L.

### SARAN

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai mekanisme secara fungsional terjadinya hambatan pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel *Staphylococcus aureus* oleh forbazol E dengan pengamatan TEM dengan pembesaran lebih besar/tinggi, misalnya dengan pembesaran 125.000x – 135.000x.

Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi optimum forbazol E dalam menghambat pertumbuhan dan kerusakan ultrastruktur dinding sel *Staphylococcus aureus*, yang berguna dalam penelitian klinis dengan menggunakan hewan percobaan.

### UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Drs. I Wayan Muderawan, M.S., Ph.D atas ijin dan fasilitas yang diberikan kepada penulis. Ucapan terima kasih yang sedalam-dalamnya juga penulis sampaikan kepada Prof. dr. Sangkot Marzuki, Ph.D selaku Direktur Lembaga Eijkman, dr. Herawati Sudoyo, Ph.D. selaku Manager Eksekutif Lembaga Eijkman, dr. Nurjati C. Siregar, Ph.D Kepala Lab dan Analisis TEM Lembaga Eijkman, Dra. Luluk Yunaini serta Nurita Margyaningsih atas ijin dan fasilitas yang diberikan kepada penulis sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik.

### DAFTAR PUSTAKA

- Adamczeski M, Quinoa E, Crrews, P. 1988. Unusual Anthelmintic Oxazoles from a Marine Sponge. *J Am Chem Soc* 110 : 598-607.
- Agrios GN. 1988. *Plant Pathology*. New York . Academic Press.
- Bozzola JJ, Russel LD. 1999. *Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists*. 2<sup>nd</sup> ed. Boston. Jones and Barlett Publishers.
- Ichiba TY, Scheuer WY, Higa PJ, Gravalos DG. 1991. Hennoxazoles : Bioactive Bisoxazoles from Marine Sponge. *J Am Chem Soc* 113 : 3173-3178.
- Lindquist N, Fenical W, Van Duynne GD, Clardy J. 1991. Isolation and Structure Determination of Diazonamides A and B, Usual Cytotoxic metabolites from Marine Ascidian *Diazona sinensis* *J Am Chem Soc.*, 113 : 2303-2310.
- Matsunaga S, Fujiki H, Sakata D, Fusetani. 1991. Calyculins EFG. Additional Inhibitor of Protein 1 and 2A from the marine *Sponge Discodermia calyx*. *Tetrahedron* 47 : 4393-4400.
- Meyers AI, Lawson JP, Walker DG, Linderman RJ. 1986. Synthetic Studies on the Streptogramin Antibiotics. *J Org Chem* 51: 5111-5120.
- Muderawan IW. Laporan Penelitian Riset Unggulan Terpadu VIII Bidang Ilmu Kimia dan Proses. 2003. *Sintesis dan Uji Bioaktivitas Forbazol dan Turunannya*. Kementrian Riset dan Teknologi RI. Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Mutschler E. 1991. *Dinamika Obat : Buku Ajar Farmakolog dan Toksikologi*. Edisi ke 5. Bandung. Penerbit ITB.
- Ristiati NP. 2005. Laporan DIKS Bidang Penelitian Murni. *Aktivitas Bakterisida Forbazol E Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus*. Singaraja. KIP Negeri.
- Rochiman K. 1989. *Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap*. Surabaya. niversitas Airlangga.
- Rudi A, Stein Z, Green S, Gollberg I, Kashman Y, Banayahu Y, Schleyer M. 994. Phorbazoles A-D, Novel Chlorinated Phenylpyrrolyloxazoles from The Marine Sponge *Phorbac clathrata*. *Tetrahedron Letts* 35 :2589-2595.
- Sulistia GG. 1998. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi 4. Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran-Universitas Indonesia. Jakarta. Penerbit Gaya Baru.
- Walsh C. 2000. Molecular Mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 406 : 678-685.
- Wenzel RP. 2003. *Prevention and control of nosocomial infectious*. 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins.
- Zainuddin M. 1994. *Metodologi Penelitian*. Surabaya :Universitas Airlangga.