

Perbandingan Aktivitas Antibakteri Kloramfenikol Terhadap Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif Secara *In Silico* Dan *In Vitro*

Dian Islamiyati ^{1*}, Fajar Husen ²

¹ Program Studi Farmasi Klinis dan Komunitas, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bina Cipta Husada Purwokerto, Jawa Tengah

² Program Studi Sarjana Terapan Teknologi Laboratorium Medis Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bina Cipta Husada Purwokerto, Jawa Tengah

* Corresponding author e-mail: dian@stikesbch.ac.id

ABSTRAK

Kloramfenikol (Kloram) adalah antibiotik spektrum luas yang memiliki kemampuan untuk melawan bakteri gram positif dan gram negatif. studi ini mempunyai tujuan untuk membandingkan aktivitas antibakteri kloram terhadap bakteri gram positif *S.aureus* dan gram negatif *E.coli* baik secara *in silico* maupun *in vitro*. Aktivitas antibakteri kloram terhadap berbagai spesies bakteri diuji menggunakan dua pendekatan: *in silico* menggunakan metode *docking molekuler* untuk memprediksi interaksi antara kloram dan target bakteri, serta *in vitro* dengan pengujian untuk mengukur zona hambat yang terbentuk. Hasil *in silico* menunjukkan bahwa kloram memiliki nilai afinitas yang lebih rendah dengan interaksi yang lebih tinggi terhadap protein IN67 pada bakteri gram positif *S.aureus* yaitu -7,6 kkal/mol, sedangkan pada bakteri gram negatif *E.coli* yaitu -6,8 kkal/mol, interaksi ini lebih lemah karena perbedaan struktur membran sel. Percobaan *in vitro* juga menunjukkan rata-rata zona hambat terhadap *S. aureus* dan *E. coli* >25 mm, dan menunjukkan bahwa kloram tergolong ke dalam antibiotik yang sangat sensitif dalam membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif. Secara keseluruhan, penelitian ini menyimpulkan bahwa kloram memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat terhadap bakteri gram positif dibandingkan gram negatif, yang tercermin dari hasil *in silico* dan *in vitro* yang sejalan.

Kata Kunci : Kloramfenikol, Gram positif, Gram negatif, *In silico*, *In vitro*

ABSTRACT

Chloramphenicol (chloram) is a broad-spectrum antibiotic that has the ability to fight gram-positive and gram-negative bacteria. This study aims to compare the antibacterial activity of chloram against gram-positive bacteria *S.aureus* and gram-negative *E.coli* both *in silico* and *in vitro*. The antibacterial activity of chloram against various bacterial species was tested using two approaches: *in silico* using molecular docking method to predict the interaction between chloram and bacterial targets, and *in vitro* with agar media testing to measure the inhibition zone formed. *In silico* results show that chloram has a lower affinity value with a higher interaction with the IN67 protein in gram-positive bacteria *S.aureus*, namely -7.6 kcal/mol, while in gram-negative bacteria *E.coli* it is -6.8 kcal/mol, this interaction is weaker due to differences in cell membrane structure. The *in vitro* experiment also showed an average inhibition zone against *S. aureus* and *E. coli* of >25 mm, indicating that chloramphenicol is still classified as a very sensitive antibiotic in killing and inhibiting the growth of gram-positive and negative bacteria. Overall, this study concludes that chloramphenicol has stronger antibacterial activity against gram-positive bacteria than gram-negative, which is reflected by the *in silico* and *in vitro* results that are in line.

Keywords: Chloramphenicol, gram positive, gram negative, *in silico*, *in vitro*

PENDAHULUAN

Kloram merupakan antibiotik yang mempunyai spektrum luas yang digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri. Antibiotik ini memiliki mekanisme aksi kerja dengan menghambat sintesis protein bakteri, sehingga efektif terhadap berbagai jenis bakteri. Kloram dikenal memiliki kemampuan untuk melawan bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Namun, efektivitasnya dapat bervariasi tergantung pada jenis bakteri yang dihadapi, serta kondisi lingkungan dari mikroba target (Chrisnandari, 2018).

Dalam beberapa tahun terakhir, pendekatan *in silico* dan *in vitro* semakin banyak digunakan untuk menilai aktivitas antibakteri senyawa-senyawa kimia, termasuk kloram. Pendekatan *in silico* memungkinkan analisis prediktif berdasarkan struktur molekul dan interaksinya dengan target biologis dalam bakteri, sehingga memberikan gambaran awal mengenai potensi antibakteri suatu senyawa (Sutan Mulia Ananda & Gemah Nuripah, 2022). Sementara itu, uji *in vitro* memberikan bukti eksperimental mengenai efektivitas senyawa tersebut dalam kondisi laboratorium yang lebih terkontrol (Sedef Gocmen et al., 2008).

Perbandingan aktivitas antibakteri kloram terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif merupakan hal yang penting untuk dipahami. Hal ini disebabkan oleh perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri yang dapat mempengaruhi penetrasi antibiotik dan mekanisme pertahanannya. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel tebal yang mengandung peptidoglikan, sementara bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang lebih kompleks dengan lapisan luar yang mengandung lipopolisakarida (Dewitasari & Yuliasirin, 2019). Penelitian sebelumnya dengan menggunakan ekstrak *Moringa oleifera* dan antibiotik kloram menunjukkan bahwa antibiotik kloram memiliki sensitivitas yang masih tinggi (Husen & Ratnaningtyas, 2024). Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi perbandingan aktivitas antibakteri kloram terhadap bakteri Gram positif (*S. aureus*) dan Gram negatif (*E. coli*) melalui dua pendekatan, yaitu *in silico* dan *in vitro*. Pendekatan *in silico* digunakan untuk memodelkan interaksi kloram dengan target biologis dalam bakteri, sementara uji *in vitro* dilakukan untuk mengamati pengaruh kloram dalam penghambatan pertumbuhan bakteri secara langsung. Dengan demikian, penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran antara keselarasan pendekatan *in silico* dengan *in vitro*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan studi deskriptif eksperimental secara *in silico* dimana hasil pengujiannya kemudian diobservasi secara *in vitro* dengan analisis deskriptif analitik kloram satu konsentrasi yang diujicobakan melalui metode difusi cakram. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi STIKes Bina Cipta Husada Purwokerto.

Bahan yang digunakan pada studi *in silico* adalah struktur 3D senyawa kloram yang didownload pada *chemical web library database* <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> dan 3D protein 1N67 (*S.aureus*) dan 1IWM (*E.coli*) didownload pada website database PDB <https://www.rcsb.org/>. Bahan studi *in vitro* meliputi antibiotik kloram, medium Natrium Agar (NA), etanol 96%, aquades, dan isolat bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

Alat-alat yang diperlukan dalam melakukan studi *in silico* antara lain *hardware* laptop dengan windows 9 64 bit, *software* antara lain PyRx 0.8 dan

Discovery Studio. Alat studi in vitro meliputi jarum ose, refrigerator, beaker glass, labu Erlenmeyer, hotplate dan magnetic stirrer, autoclave, cawan petri, bor gabus, mikropipet dan tip, Laminar Air Flow (LAF), dan kamera.

Uji In Silico

Protein 1N67 (*S.aureus*) dan 1IWM (*E.coli*) yang telah diunduh dipreparasi menggunakan aplikasi *Discovery Studio* dengan menghilangkan *water* dan *native ligand*. Protein yang sudah dipreparasi disimpan dalam bentuk PDB. Hasil protein yang dipreparasi di *load molecul* pada *software PyRx 0.8*. Senyawa ligan 3D dari senyawa Kloram dipreparasi menggunakan *software PyRx 0.8* melalui sistem *Open Babel* dengan meminimize senyawa ligan tersebut. Senyawa ligan Kloram yang telah dipreparasi dikonversi menjadi *Autodock Ligand* (pdbqt) (Yuniati et al., 2023).

Senyawa Ligan kloram yang sudah dipreparasi kemudian di tambatkan molekulnya dengan protein 1N67 dan 1IWM yang sudah dipreparasi menggunakan *software PyRx 0.8* menggunakan sistem *Vina Wizard*. Hasil penambatan dipilih dengan nilai RMSD $< 2 \text{ \AA}$ dan nilai paling kecil untuk selanjutnya hasil tersebut di visualisasikan dengan *software Discovery Studio*, dan interaksi ikatan ligan dengan protein disajikan dalam bentuk 2D. Validasi metode dilakukan dengan parameter RSMD, jika nilainya $< 2 \text{ \AA}$ maka metode tersebut dikatakan valid (Yuniati et al., 2023).

Uji In Vitro Kloram

Suspensi bakteri *S.aureus* yang telah diencerkan dalam aquadest steril diambil menggunakan mikropipet sebanyak 100 μL lalu letakan pada cawan petri yang berisi media nutrient agar (NA), kemudian ratakan dengan batang L/durgalsky. Selanjutnya sebanyak 50 μL kloram yang diencerkan dengan larutan DMSO kemudian dipipet pada sumuran. Medium yang sudah berisi isolat dan kloram di inkubasi di dalam inkubator selama 2x24 jam pada suhu 27°C. Hal yang sama berlaku untuk bakteri *E.coli* (Husen & Ratnaningtyas, 2022). Medium yang telah diinkubasi dilihat dan diamati apakah terbentuk zona hambat atau tidak. Lalu diukur lebar zona hambat yang dihasilkan. Hal tersebut untuk memastikan ada tidaknya penghambatan bakteri *S.aureus* dan *E.coli* (Islamiyati et al., 2023).

Analisis Data

Hasil studi dianalisis secara deskriptif eksperimental secara *in silico* dimana hasil pengujiannya kemudian diobservasi secara in vitro dengan analisis deskriptif analitik kloram satu konsentrasi yang diujicobakan melalui metode difusi cakram.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Kloram merupakan jenis antibiotik yang banyak dimanfaatkan untuk pengobatan oleh masyarakat. Kloram masuk dalam golongan antibiotic spektrum luas dengan menyerang sintesis dari protein bakteri target (Syafriana et al., 2020). Studi ini teliti untuk mengetahui aktivitas senyawa kloram terhadap bakteri gram positif dan negative secara *in silico* dan pembuktian secara *in vitro*.

Penelitian secara *in silico* dengan menggunakan protein dari bakteri *S. aureus* (1N67) dan *E. coli* (1IWM) yang ditambatkan molekulnya dengan ligan senyawa

kloram. Protein 1N67 merupakan protein yang berada pada organisme bakteri *S.aureus* yang jika di hambat dengan ikatan oleh ligan dapat menghambat perkebangkan bakteri *S.aureus* (Yeshwanth & Sivaprasad, 2023). Sedangkan protein 1IWM merupakan protein dari organisme bakteri *E.coli* yang berfungsi sebagai protein ekstraseluler lipoprotein LoIB bakteri (Svanberg Frisinger et al., 2021). Penambatan molekul (*Docking molekuler*) dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan nilai afinitas dimana nilai tersebut merupakan nilai prediksi dari potensi senyawa kloram sebagai antibakteri dari bakteri *s.aureus* dan *E.coli*. Faktor yang mempengaruhi tinggi rendahnya nilai afinitas adalah energi Gibbs, elektronegatifitas, dan muatan energi serta banyaknya ikatan residu asam amino pada ligan dan protein uji. Semakin rendah nilai dari nilai afinitas maka semakin tinggi potensi aktivitasnya (Vennila et al., 2014). Dalam uji *in silico*, penambatan ligan dan reseptor dari hasil doking dipilih berdasarkan nilai *binding affinity* nya, walaupun secara menyeluruh perlu pengujian ulang secara *in vitro* atau *in vivo*. *Binding affinity* juga menjadi salah satu kunci yang penting untuk menentukan ligan mana yang perlu dieksplorasi lebih lanjut (Husen, 2025).

Hasil dari docking molekuler yang dilakukan menunjukkan bahwa nilai afinitas antara ligan senyawa kloram dengan protein 1N67 di *S.aureus* memiliki nilai afinitas yang lebih rendah yaitu -7,6 kkal/mol dari nilai afinitas antara kloram dengan protein 1IWM di *E.coli* yaitu -6,8 kkal/mol (Tabel 1). Validasi metode dilakukan dengan parameter RMSD, diperoleh nilai RMSD dari masing-masing ikatan antara ligan dan kedua protein yang diujikan yaitu 0 Å sehingga metode yang digunakan dikatakan valid karena memiliki nilai $< 2 \text{ Å}$ (Yuniati et al., 2023).

Interaksi ikatan 2D antara senyawa kloram dengan protein target divisualisasikan dengan menggunakan *Discovery studio* dengan tujuan untuk mengetahui ikatan asam amino yang dihasilkan dari inetarki ligan dan protein yang diujikan (Islamiyati et al., 2023). Visualisasi yang didapatkan menunjukkan adanya ikatan asam amino antara ligan kloram dengan protein 1N67 dan 1IWM. Ligan senyawa kloram dengan protein 1N67 menghasilkan ikatan asam amino di rantai A lebih banyak dibandingkan dengan protein 1IWM. Hal tersebut merupakan salah satu penyebab yang mempengaruhi rendahnya nilai afinitas sehingga menggambarkan kuatnya aktivitas antibakteri (Gambar 1). Sehingga dapat diprediksi bahwa aktivitas antibakteri senyawa kloram lebih besar untuk menghambat bakteri *S.aureus* sebagai bakteri gram positif daripada untuk menghambat bakteri *E.coli* sebagai bakteri gram negatif. Hasil percobaan *in silico* yang telah dilakukan kemudian dilanjutkan dengan percobaan *in vitro* terhadap bakteri gram positif (*S. aureus*), dan gram negatif (*E. coli*) di laboratorium. Hasil pengujian menunjukkan bahwa kloram secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* (Gambar 2).

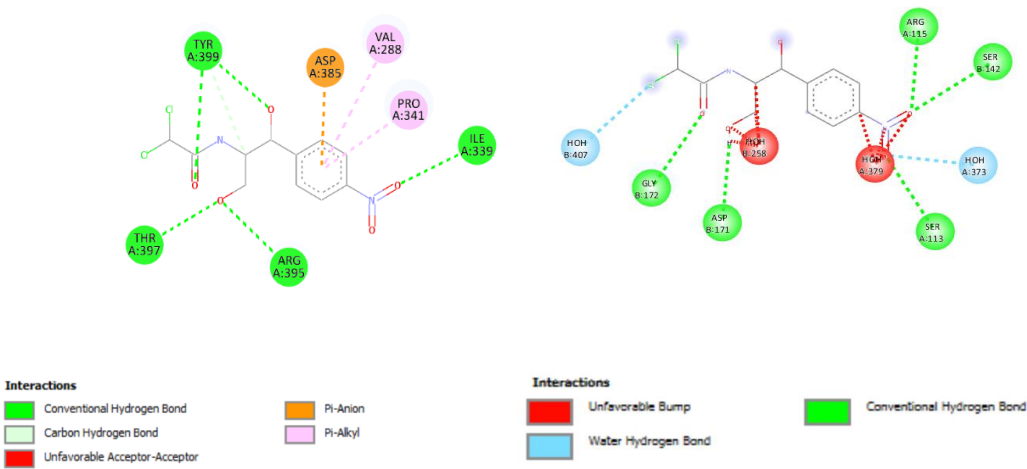
Hasil pada Gambar 2 menunjukkan bahwa pengujian *in vitro* terhadap bakteri gram positif (*S. aureus*) dan gram negatif (*E. coli*), menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0.05$). aktivitas inhibisi kloram terhadap *S. aureus* menunjukkan nilai yang paling tinggi dengan rata-rata zona hambat 34.16 mm. Sementara itu aktivitas inhibisi kloram terhdap bakteri *E. coli* menunjukkan penghambatan sebesar 26.48 mm. Hasil zona hambat disajikan pada Gambar 3.

Tabel 1. Hasil docking molekuler ligan senyawa kloram dengan protein 1N67 dan 1IWM.

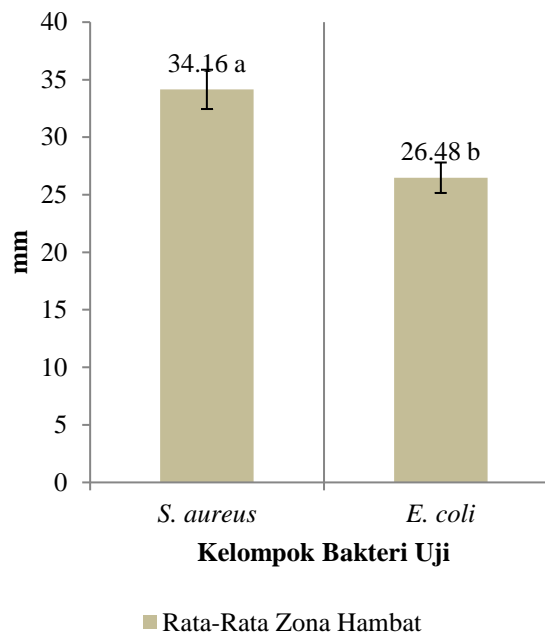
Protein	Nilai Afinitas	Ikatan Amino Asam
1N67	-7,6	TYR A:399 THR A:397 ARG A:395 ILE A:339 ASP A:385 VAL A:288 PRO A:341
1IWM	-6.8	GLY B:171 ASP B:171 SER B:142 HOH B:407 HOH B:258 SER A:113 ARG A:115 HOH A:373 HOH A:379

(a)

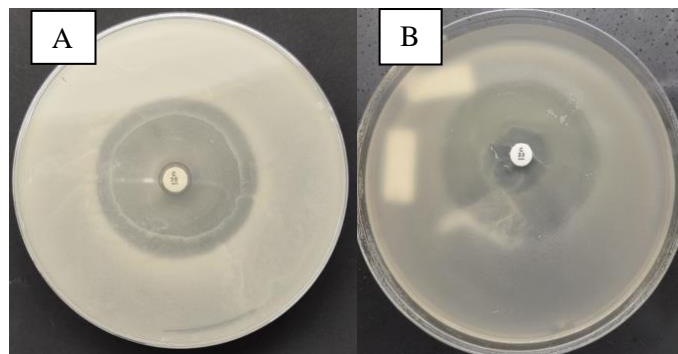
(b)



Gambar 1. (a) Visualisasi 2D interaksi senyawa kloram dengan protein 1N67, (b) Visualisasi 2D interaksi senyawa kloram dengan protein 1IWM.



Gambar 2. Hasil Pengujian *In Vitro* Kloram Terhadap Bakteri *S. aureus* Dan *E. coli*



Gambar 3. Hasil Uji Daya Hambat Kloram Terhadap *S. aureus* (A), dan *E. coli* (B).

Berdasarkan Gambar 3, aktivitas inhibisi antibiotik kloram dengan metode difusi cakram menunjukkan efektivitas yang cukup baik, dengan rata-rata nilai inhibisi >25 mm untuk kedua jenis bakteri uji yang digunakan. Pentingnya mengevaluasi efektivitas suatu senyawa antibiotik bertujuan untuk memonitor dan mengevaluasi kemungkinan-kemungkinan yang dapat terjadi yang dapat mengarahkan pada resistensi antibiotik. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa antibiotik gentamicin dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan indikator kategori sensitif dan intermediate (Husen & Ratnaningtyas, 2022). Perlu diketahui bahwa terdapat kategori untuk menentukan apakah suatu antibiotik termasuk sensitif, intermediate, atau resisten. Hasil ini didasarkan pada Tabel 2 berikut:

Tabel 2. Kategori Antibiotik Pada Pengujian *In Vitro* Zona Hambat

No	Nilai Standar	Kategori
1	< 12 milimeter	Resisten
2	13 – 16 milimeter	Sedang/ Intermediet
3	> 16 milimeter	Sensitif

Berdasarkan evaluasi yang dilakukan dari tabel 2 nilai standar dan kategori sensitivitas antibiotik terhadap bakteri, maka kloram yang masuk dalam kategori antibiotik spektrum luas termasuk ke dalam kategori sensitif. Nilai zona hambat yang disajikan pada gambar 2 dengan nilai >25 mm masuk ke dalam kategori sensitif dengan nilai standar >16 mm (Husen & Ratnaningtyas, 2022). Penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa antibiotik kloram mampu menghambat pertumbuhan *E. coli* dengan nilai zona hambat lebih dari 54 mm (Islamiyati et al., 2023).

Tabel 3. Interpretasi hasil uji antibakteri secara *in silico* dan *in vitro*

No	Bakteri	Skor Docking (kcal/mol)	Zona Hambat (mm)	Interpretasi
1	<i>S. aureus</i>	-7,6	34,16	Sensitive, sesuai prediksi
2	<i>E. coli</i>	-6,8	26,48	Sensitive, sesuai prediksi

Berdasarkan hasil dari tabel 3 bahwa hasil interpretasi data antara uji antibakteri pada kloram secara *in silico* dan *in vitro* mempunyai keterkaitan. Hal tersebut dapat dilihat dari hasil secara *in silico* dimana kloram dengan bakteri *S. aureus* mempunyai hasil skor docking lebih rendah dari pada kloram dengan bakteri *E. coli*. Sehingga sesuai dengan diprediksi bahwa aktivitas antibakteri senyawa kloram lebih besar untuk menghambat bakteri *S.aureus* sebagai bakteri gram positif daripada untuk menghambat bakteri *E.coli* sebagai bakteri gram negatif. . Semakin rendah nilai dari nilai afinitas maka semakin tinggi potensi aktivitasnya (Vennila et al., 2014).

KESIMPULAN

Rata-rata pengambatan kloram terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* lebih dari 25 mm yang termasuk ke dalam kategori sensitif. Kloram secara *in silico* dan *in vitro* mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif dengan mekanisme penghambatan secara *docking molekuler* adalah menghambat protein IN67 dan I1WM. Kloram masih tergolong antibiotik yang sangat poten dan sensitif dalam membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri patogen *S. aureus* dan *E. coli*.

DAFTAR PUSTAKA

- Chrisnandari, R. D. (2018). Sintesis dan Karakterisasi Molecularly Imprinted Polymer Untuk Kloramfenikol Menggunakan Polimerisasi Fasa Ruah. *Journal of Pharmacy and Science*, 3(1), 40–46.

- Dewitasari, W. F., & Yuliastrin, A. (2019). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Cabe Rawit Putih (*Capsicum frutescens* L). *Proceeding Biology Education Conference*, 16(1), 295–301.
- Husen, F. (2025). Aktivitas Rutin Dan α -Tokoferol Medicinal Mushroom *Coprinus comatus* Sebagai Anti-Inflamasi Dan Antidiabetes Terhadap Beberapa Enzim Secara In Silico. *Jurnal Bina Cipta Husada: Jurnal Kesehatan Dan Science*, 21(1), 114–126.
- Husen, F., & Ratnaningtyas, N. I. (2022). Inhibitory test of gentamicin antibiotics against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* bacteria using disc method. *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, 10(2), 126–131.
- Husen, F., & Ratnaningtyas, N. I. (2024). Aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap bakteri *Escherichia coli* penyebab penyakit gangguan pencernaan secara in vitro. *Jurnal Penelitian Dan Pengabdian Kepada Masyarakat UNSIQ*, 11(2), 77–83.
- Islamiyati, D., Husen, F., & Ina Ratnaningtyas, N. (2023). Potensi Aktivitas Antibakteri Ekstrak *Moringa oleifera* (Lamk.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Secara In Silico dan In Vitro. *Jurnal Bina Cipta Husada: Jurnal Kesehatan Dan Science*, 19(2), 80–90.
- Sedef Gocmen, J., Buyukkocak, U., Caglayan, O., & Aksoy, A. (2008). In vitro antibacterial effects of topical local anesthetics. *Journal of Dermatological Treatment*, 19(6), 351–353.
- Sutan Mulia Ananda, & Gemah Nuripah. (2022). Uji Aktivitas Senyawa Aktif Daun Sirsak sebagai Kandidat Antidepresan dengan Pendekatan In silico. *Jurnal Riset Kedokteran*, 135–172. <https://doi.org/10.29313/jrk.vi.1552>
- Svanberg Frisinger, F., Jana, B., Donadio, S., & Guardabassi, L. (2021). In silico prediction and prioritization of novel selective antimicrobial drug targets in *Escherichia coli*. *Antibiotics*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics10060632>
- Syafriana, V., Hamida, F., Sukanto, A. R., & Aliya, L. S. A. (2020). Resistensi *Escherichia coli* dari Air Danau ISTN Jakarta Terhadap Antibiotik Amoksisilin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, dan Siprofloksasin. *Sainstech Farma Vol*, 13(2), 33–39.
- Vennila, S., Bupesh, G., Saravanamurali, K., SenthilKumar, V., SenthilRaja, R., Saran, N., & Magesh, S. (2014). Insilico docking study of compounds elucidated from *Helicteres isora* fruits with ampkinae- insulin receptor. *Bioinformation*, 10(5), 263–266. h
- Yeshwanth, S. S., & Sivaprasad, S. (2023). Comparative Analysis of Antibacterial Properties of Fluorescein Derivatives Over Commercial Antibiotics. *Cardiometry*, 25, 1677–1684.
- Yuniati, N. I., Islamiyati, D., Aini, N., Khasanah, H., Stikes, H., Cipta, B., & Purwokerto, H. (2023). Perbandingan Senyawa Kuersetin dan Kaempferol pada Reseptor COX-2 sebagai Agen Antikanker Kolorektal secara in-silico. *Jurnal Kesehatan Dan Science*, 19(1), 98–107.