

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI BUAH KEMUKUS
(*Piper cubeba L.f.*) SECARA *IN SILICO* PADA BAKTERI *SHIGELLA
FLEXNERI***

*Antibacterial Activity Test of Essential Oil Cubebe Fruit (Piper Cubeba L.f.) for
The Bacteria Shigella Flexneri by In Silico*

**Hari Widada¹, Sabtanti Harimurti¹, Puguh Novi Arsito¹, Rifki Febriansah¹,
Tri Handrianto²**

¹Lecture in Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine and Health Science,
Muhammadiyah University of Yogyakarta.

²Pharmacy Student in Pharmacy Study Program, Faculty of Medicine And Health
Science, Muhammadiyah University of Yogyakarta.

trihandrianto@gmail.com

INTISARI

Penyakit infeksi masih menjadi penyebab utama kesakitan dan kematian, salah satunya adalah infeksi saluran pencernaan. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri dikenal sebagai disentri basiler. Penyebab diare yang tersering adalah *Shigella*, khususnya *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae*. Tanaman kemukus (*Piper cubeba L.*) secara empirik digunakan untuk mengobati radang usus dan disentri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kandungan dan potensi senyawa utama dalam minyak atsiri buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) yang diukur dengan besar afinitas terhadap protein DNA *gyrase* pada bakteri *Shigella flexneri* secara *in silico*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan metode *in silico*. Analisis data dilakukan dengan Uji *AutoDock*. Dari hasil analisa *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) berdasarkan puncak tertinggi yang ditemukan pada buah kemukus adalah *copaene* (AUC=26,32%). Uji kimia komputasi menunjukkan bahwa senyawa *copaene* memiliki afinitas terhadap protein DNA *gyrase* pada bakteri *Shigella flexneri* dengan nilai energi ikatan -6,4 Kkal/mol.

Kata kunci : Minyak Atsiri, Kemukus, *Shigella flexneri*, GC-MS, Penambatan molekul

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ESSENTIAL OIL CUBEBE
FRUIT (*Piper cubeba* L.f.) FOR THE BACTERIA SHIGELLA FLEXNERI****BY IN SILICO**

By :

Tri Handrianto

20120350044

ABSTRACT

Infectious diseases are still a major cause of morbidity and mortality, one of which is an infection of the digestive tract. Infections caused by bacteria known as bacillary dysentery. The most common cause of diarrhea is *Shigella*, especially *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae*. Cubeb plant (*Piper cubeba* L.) empirically used to treat colitis and dysentery. This study aims to determine the content and the potential of the main compounds in the volatile oil cubeb fruit measured by great affinity for DNA gyrase protein in bacteria *Shigella flexneri* by in silico. This research was a laboratory experimental method by in silico. Data analysis was performed with Autodock test. From the analysis, Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) based on the highest peaks found in cubeb fruit is *copaene*. *In silico* result is *copaene* (AUC=26,32%) as a dominant Compound in cubeb fruit have affinity towards protein DNA gyrase in bacteria *Shigella flexneri* with a bond energy value -6,4 kcal / mol.

Keyword : Essential oil, Cubebe, *Shigella flexneri*, GC-MS, Molecular docking

PENDAHULUAN

Ditengah munculnya *new-emerging disease*, penyakit infeksi tetap menjadi masalah kesehatan masyarakat yang penting di seluruh belahan dunia. Penyakit infeksi masih menjadi penyebab utama kesakitan dan kematian, salah satunya adalah infeksi saluran pencernaan. Penyakit infeksi saluran pencernaan dapat disebabkan oleh virus, bakteri dan protozoa. Infeksi yang disebabkan

oleh bakteri dikenal sebagai disentri basiler yang disebabkan oleh bakteri *Shigella*. Penyebab diare yang tersering adalah *Shigella*, khususnya *Shigella flexneri* dan *Shigella dysenteriae* (Zein, 2004). Data profil kesehatan Indonesia tahun 2010 menyebutkan bahwa jumlah kasus diare yang ditemukan sekitar 213.435 penderita dengan jumlah 1.289 kematian, dan sekitar 70–80% dari

jumlah tersebut terjadi pada anak-anak terutama usia dibawah 5 tahun. Tanaman kemukus (*Piper cubeba L.*) merupakan salah satu tanaman yang secara empirik digunakan untuk mengobati masuk angin, radang usus, disentri, perut mulas, kencing nanah, radang selaput lendir, asma, ekspektoran dan bronkhitis (Sudarsono *et.al.*, 1996).

METODE

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris dan penelitian eksploratif dengan metode *in silico*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Teknologi Farmasi FKIK UMY, Laboratorium Penelitian FKIK UMY, *Central of Essential Oil Studies* UII dan Laboratorium Kimia Organik Fakultas MIPA UGM dari bulan Januari hingga Juni 2016.

Alat

Blender Phillips® seri 2071, sarung tangan *Sensi Gloves*® (*Handscoon* Non Steril), masker *Sensi Mask*®, timbangan analitik Mettler Toledo *Scale brite*®, alat GC-MS QP2010S Shimadzu®, seperangkat *Personal Computer* (PC) dengan sistem operasi

adalah Linux Ubuntu 12.04 LTS 64-bit, *processor Pentium(R) Dual-Core* CPU E6600 @ 3.06 GHz, memory 2048 MB RAM. Aplikasi yang digunakan adalah *Libre Office Calc* 4.0, *DS Visualizer*, *Autodock Tools*, *Open Babel* dan *Marvin Sketch*.

Bahan

Kemukus (*Piper cubeba L.f.*) diperoleh dari pedagang tanaman herbal di Desa Mayungan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, Aquades yang dibeli dari toko Brata Chem, Protein DNA *gyrase* yang diunduh dari situs resmi Protein Data Bank (www.rscb.org)

Determinasi Tanaman

Determinasi buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) dilakukan di laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi UGM.

Penyiapan Bahan

Buah kemukus (*Piper cubeba L.f.*) sebanyak 500 gram yang sudah bersih dan kering dihaluskan dengan *blender* hingga halus merata, setelah

halus dimasukkan dalam wadah tertutup rapat.

Destilasi buah kemukus

Serbuk halus buah kemukus sebanyak 500 gram dan aquades sebanyak 2500 ml dimasukkan kedalam panci destilasi. Kemudian dipanaskan menggunakan kompor hingga didapatkan destilat yang ditampung dalam gelas ukur. Selanjutnya minyak atsiri yang berwarna bening kekuningan dipisahkan dengan air menggunakan pipet tetes dan dimasukkan dalam wadah.

Analisis Kandungan Kimia Metode GC-MS

Pemisahan senyawa dengan GC menggunakan kolom AGILENTJ % W DB-1 dengan panjang 30 meter. Fase gerak menggunakan gas pembawa helium dengan kecepatan 0,54 ml/menit. Sistem pemanasan diatur dari suhu 50 hingga 260°C dengan peningkatan sebesar 5°C setiap menit. Dalam instrumen MS digunakan energi ionisasi sebesar 70 Ev. Hasilnya akan diamati melalui spektra yang diamati berdasarkan

berat molekul dan waktu retensi senyawa yang diinginkan.

Uji *In Silico* dengan *Autodock Vina*

Autodock Vina merupakan aplikasi untuk melakukan proses penambatan molekul. *DS Visualizer* untuk preparasi protein uji dan ligan asli, *Marvin Sketch* untuk preparasi ligan atau senyawa ligan yang akan diuji. *AutoDockTools* untuk melakukan penambatan molekuler agar dapat dieksekusi oleh aplikasi *Autodock Vina* untuk mengukur nilai RMSD dan *Open Babel* untuk mengkonversi hasil PDBQT menjadi PDB sehingga dapat divisualisasikan menggunakan *DS Visualizer*.

Penyiapan Protein Target dan Ligan Uji

Protein yang akan digunakan sebagai reseptor uji diunduh dari situs resmi *protein data bank* (www.rcsb.org) dalam format “.pdb”. Berkas protein/reseptor yang digunakan adalah DNA *gyrase* dengan kode protein 3TTZ. Setelah mendapatkan protein target dilakukan preparasi melakukan *DS Visualizer* dengan memastikan ligan bebas dari

molekul air. Reseptor disimpan dalam format PDB. Hal tersebut juga dilakukan pada ligan asli sebagai ligan uji.

Konversi Protein dan Ligan dalam Format PDBQT

Untuk menjalankan fungsi aplikasi Autodock Vina, berkas reseptor target dan ligan uji harus dikonversi menggunakan aplikasi Autodock Tools. Dalam proses konversi berkas protein yang sudah dipreparasi ditambahkan atom hidrogen disimpan dalam bentuk PDBQT menggunakan preparasi *Grid Parameter File*.

Preparasi *Grid Parameter File*

Proses ini merupakan proses lanjutan dari langkah sebelumnya. Aplikasi *Autodock Tools* yang masih terbuka kemudian dipilih bagian *Grid* dan dipilih ligan melalui fungsi *Set Map Types* dan dilanjutkan penyiapan *Grid Box*. *Grid Box* merupakan penentuan area untuk simulasi penambatan. Kemudian hasil *output* disimpan dalam bentuk PDBQT.

Penambatan Molekuler dengan *Autodock Vina*

Sebelum menjalankan fungsi penambatan molekuler berkas reseptor.pdbqt dan ligan.pdbqt berada pada folder yang sama. Kemudian menu RUN dibuka dan klik CMD dan menunggu prosesnya selesai. Pada *folder* Vina akan muncul beberapa konformasi hasil penambatan.

Visualisasi Penambatan Molekul

Hasil penambatan molekul divisualisasikan menggunakan DS Visualizer. Sebelum visualisasi berkas hasil penambatan dengan format PDBQT dirubah menjadi berkas PDB menggunakan aplikasi Open Babel. Setelah didapatkan berkas PDB, berkas reseptor.pdb menggunakan DS Visualizer dan dipilih hasil penambatan dan dimasukan ligan hasil penambatan molekul dan melihat visualisasi menggunakan menu *define ligand* dan *ligan interaction* untuk mengidentifikasi dengan lebih mudah *background* diganti warna putih dan dicantumkan label residu asam amino tempat hasil penambatan berikatan.

Validasi *Molecular Docking*

Validasi *molecular docking* bertujuan untuk menentukan apakah protein yang digunakan untuk *molecular docking* dapat digunakan atau tidak. Validasi *molecular docking* ini dilakukan dengan cara menentukan nilai RSMD. Nilai validitas RSMD yang dipersyaratkan adalah $<2.00 \text{ \AA}$.

HASIL PENELITIAN

Determinasi Tanaman

Hasil determinasi oleh Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada yang menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah benar *Piper cubeba L.f.*

Pengumpulan dan Penyiapan Bahan

Buah kemukus yang akan dianalisis berasal dari pedagang tanaman herbal di Desa Mayungan, Kecamatan Banguntapan, Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta. Buah kemukus dicuci hingga bersih dari kotoran yang menempel kemudian dihaluskan dan ditimbang. Bentuk serbuk dipilih agar

memudahkan penyarian dan memperluas kontak antara bahan dengan cairan penyari.

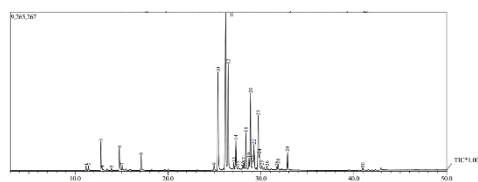
Hasil Destilasi Minyak Atsiri

Metode destilasi rebus dipilih karena minyak atsiri yang dihasilkan tidak berhubungan langsung dengan udara luar sehingga tidak mudah menguap dan volume minyak atsiri yang dihasilkan dapat langsung diketahui jumlahnya karena ditampung dalam gelas ber-skala. Minyak atsiri yang diperoleh berupa cairan berwarna kuning jernih dan berbau khas kemukus sejumlah 35 ml. Penyebaran harus merata dalam ketel sehingga penyari dapat menembus bahan secara merata dan menyeluruh. Minyak atsiri yang didapatkan dari proses destilasi adalah 35 ml dari 500 gram bahan baku serbuk minyak atsiri.

Hasil Analisis GC-MS

Analisis kromatografi gas akan mendapat kemungkinan jumlah komponen minyak atsiri dan kadar masing-masing. Sedangkan untuk menentukan jenis komponen minyak atsiri tersebut dilakukan analisis

dengan MS selanjutnya diidentifikasi dengan spektra yang berasal dari NIST dan WILEY. Analisis dengan GC-MS dilakukan dengan menginjeksi 1 µL larutan ke dalam tempat injeksi. Uap cuplikan ini kemudian dibawa oleh gas pembawa masuk ke dalam kolom. Kolom akan memisahkan komponen-komponen minyak atsiri sehingga dapat dideteksi oleh detektor dan dihasilkan suatu kromatogram. Identifikasi komponen-komponen senyawa kimia dalam minyak atsiri buah kemukus menggunakan alat GC-MS-QP2010S SHIMADZU menghasilkan 30 puncak kromatogram yang dapat dilihat pada gambar 1.

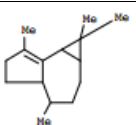
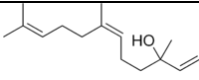
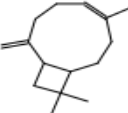
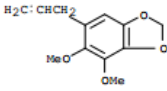
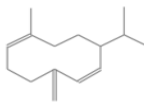
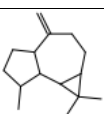
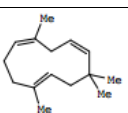
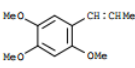
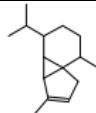
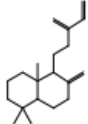
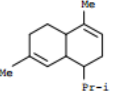
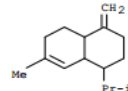
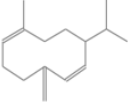
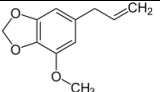
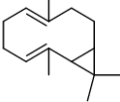
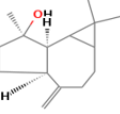
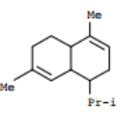
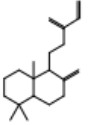


Gambar 1. Kromatogram Hasil Pemisahan Kromatografi Gas Sampel Minyak Atsiri Buah Kemukus

Sedangkan identifikasi 30 puncak yang terdapat pada gambar 1 tersaji pada tabel 1.

Tabel 1. Identifikasi Senyawa dan Struktur Hasil GC-MS Senyawa Minyak Atsiri Buah Kemukus.

No Puncak	Nama Senyawa	Struktur
1	<i>Alpha.-Thujene</i>	
2	<i>Alpha.-pinene</i>	
3	<i>Sabinene</i>	
4	<i>Beta.-Pinene</i>	
5	<i>Alpha.-Phellandrene</i>	
6	<i>Sabinene</i>	
7	<i>Beta.-Ocimene</i>	$H_2C=CHCMe_2CH=CH_2$
8	<i>L.-Linalool</i>	
9	<i>Bicyclogermacrene</i>	
10	<i>Alpha.-Cubebene</i>	
11	<i>Copaene</i>	
12	<i>Germacrene-D</i>	

13	<i>Alpha.-Gurjunene</i>		26	<i>Nerolidol</i>	
14	<i>Caryophyllene</i>		27	<i>Trans-Isodillapiole</i>	
15	<i>Germacrene-D</i>		28	<i>1H-Cycloprop-e-azulene</i>	
16	<i>Alpha cubebene</i>		29	<i>Alpha.-asarone</i>	
17	<i>Alpha.-Humulene</i>		30	<i>Naphtalene</i>	
18	<i>1H-Cycloprop e azulene</i>				
19	<i>Alpha.-amorphone</i>				
20	<i>Germacrene-D</i>				
21	<i>Myristicin</i>				
22	<i>Bicyclo germacrene</i>				
23	<i>Spathulenol</i>				
24	<i>Delta.-Cadinene</i>				
25	<i>Naphtalene</i>				

Dari 30 puncak yang muncul yang memiliki kelimpahan tertinggi adalah *copaene*. Analisis kandungan minyak atsiri buah kemukus pada penelitian ini dilakukan dengan analisis spektra massa yang didasarkan pada "base peak" (puncak dasar) dan *Similarity Index (SI)* dengan perbandingan spektra dari NIST 62 dan Wiley 299.LIB. *Base peak* merupakan puncak yang paling besar limpahnya dalam spektrum dan diberi harga 100%. Jika nilai SI mendekati 100% maka senyawa yang terdeteksi memiliki tingkat kemiripan dengan data pembanding.

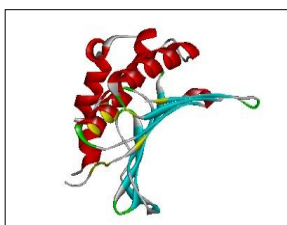
Dari tabel 1 dapat diketahui bahwa minyak atsiri buah kemukus

terdiri dari golongan *seskuiterpen* dan yang memiliki kelimpahan tertinggi adalah *copaene*. Senyawa pada puncak dasar 11 dengan waktu retensi 26,203 menit dan SI=96 mirip dengan senyawa *copaene* dengan rumus molekul $C_{15}H_{24}$, yang merupakan senyawa golongan *seskuiterpen*.

Hasil Analisis Uji Penambatan Molekul

Visualisasi Sisi Aktif DNA *gyrase* subunit B

Untuk mengetahui sisi aktif dari protein DNA *gyrase* subunit B maka dilakukan visualisasi protein target secara tiga dimensi melalui aplikasi *Discovery Studio Visualizer*. Hasil visualisasi ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Visualisasi sisi aktif protein DNA *gyrase* subunit B (3TTZ)

Visualisasi Ligan dengan *Marvin Sketch*

Ligan yang digunakan untuk sampel uji penambatan molekul adalah senyawa seskuiterpen yang memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan. Pada hasil analisis GC-MS diketahui bahwa senyawa dengan kelimpahan tertinggi minyak atsiri buah kemukus merupakan senyawa seskuiterpen yaitu *copaene*. Dalam uji ini sebagai pembanding digunakan *Ciprofloxacin*.

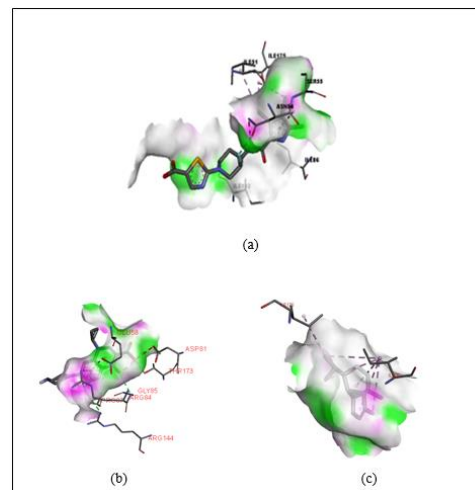
Hasil penambatan antara ligan dan protein target akan menghasilkan 9 konformasi yang berisi informasi energi dari masing-masing konformasi. Hal yang perlu diperhatikan dalam analisis hasil *docking* adalah melalui energi ikatan (*binding energy*). Konformasi terbaik dapat dilihat melalui fungsi *scoring* yang ditunjukkan dalam energi ikatan atau *binding energy* (ΔG) yang memiliki satuan dalam Kkal/mol.

Tabel 2. Interaksi Ligan dengan Protein target.

Ligan	Energi Ikatan (Kkal/mol)	Protein
<i>Ciprofloxacin</i>	-7,1	ASP81, GLU58, PRO87, GLY85, ARG84, ARG44, THR173
<i>Copaene</i>	-6,4	ILE86, ILE175
2-[(3S,4R)-4-[(3,4-dichloro-5-methyl-1H-pyrrol-2-yl)carbonyl]amino]-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid	-6,2	ILE51, ILE 86, ILE 102, ILE175, SER55, ASN54

Berdasarkan tabel 2 senyawa yang memiliki energi ikatan paling tinggi adalah *copaene* dengan energi ikatan sebesar -6,4 Kkal/mol dan mengikat residu dari protein target yaitu Isoleusin 86 (ILE86), dan Isoleusin 175 (ILE175). Residu ligan asli antara lain Isoleusin 51 (ILE51), Isoleusin 86 (ILE 86), Isoleusin 102 (ILE102), Isoleusin 175 (ILE175), Serin 55 (SER55), Asparginin 54 (ASN54). Residu ligan *Ciprofloxacin* (kontrol positif) antara lain *Aspartic acid* ke 81 (ASP81), Glutamic Acid

58 (GLU58), Prolin 58 (PRO87), Glisin 85 (GLY85), Arginin 84 (ARG84), Arginin 144 (ARG144) dan Threonine 173 (THR173). Hasil Visualisasi ditunjukkan pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Visualisasi (a) Ligan Asli, (b) *Ciprofloxacin* dan (c) *Copaene*

DISKUSI

Kemukus merupakan salah satu tanaman yang mengandung terpenoid yang merupakan metabolit sekunder pada tanaman yang memiliki efek farmakologis seperti antivirus, antibakteri, antimalaria, antiradang, penghambat sintesis kolesterol dan anti kanker (Nassar & Abdalrahim, 2010).

Dalam penelitian aktivitas antibakteri ini digunakan kontrol positif *Ciprofloxacin*. Kontrol positif digunakan sebagai pembanding

aktivitas antibakteri dengan antibiotik yang digunakan masyarakat. Sedangkan kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut memiliki efek antibakteri atau tidak. Penggunaan *Ciprofloxacin* sebagai kontrol positif disamping karena merupakan terapi lini pertama pada pengobatan diare basiler juga dikarenakan *ciprofloxacin* dan anti bakteri minyak atsiri buah kemukus memiliki kesamaan mekanisme yaitu menghambat pertumbuhan DNA.

Uji identifikasi dilakukan secara GC-MS analisis GC digunakan kolom AGILENTJ%W DB-1 yang merupakan kolom yang bersifat nonpolar. Fase diam nonpolar digunakan karena sampel yang digunakan adalah minyak atsiri yang bersifat nonpolar. Berdasarkan hasil identifikasi GC-MS ini minyak atsiri buah kemukus mengandung senyawa tertinggi yaitu *copaene*, yang merupakan senyawa terpenoid. Mekanisme molekuler senyawa tersebut diteliti dengan uji *in silico* menggunakan *molecular docking*. Aplikasi yang digunakan dalam pengujian *in silico* adalah *Autodock Vina*. Protein yang digunakan adalah DNA gyrase. Ligan yang digunakan

dalam uji adalah *copaene*. Berdasarkan uji tersebut senyawa yang diuji memiliki afinitas terhadap protein target. Senyawa *copaene* dalam minyak atsiri buah kemukus memiliki aktifitas yang sama dengan antibiotik *Ciprofloxacin* yaitu menghambat protein DNA gyrase. Dalam minyak atsiri buah kemukus *Piper cubeba L.f.*, senyawa *copaene* merupakan senyawa dengan kelimpahan tertinggi dan juga merupakan senyawa yang potensial memiliki aktifitas penghambatan terhadap bakteri *Shigella flexneri* dengan nilai energi ikatan -6,4 Kkal/mol. Selain dikarenakan senyawa tersebut memiliki energi ikatan yang tinggi dan memiliki residu yang sama dengan ligan asli yaitu Isoleusin 86 (ILE86), dan Isoleusin 175 (ILE175).

KESIMPULAN

Senyawa penyusun utama minyak atsiri buah kemukus berdasarkan puncak tertinggi *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) yaitu *copaene*. Senyawa *copaene* memiliki afinitas terhadap protein DNA gyrase pada bakteri *Shigella flexneri* secara *in silico*

dengan nilai energi ikatan -6,4 kkal /mol.

DAFTAR PUSTAKA

Sударsono, Pudjoarinto, A.,

Gunawan, Wahyuono, S.,

Donatus, I.A., Dradjad, M.,

Wibowo, S S., Ngatidjan, (1996).

Tumbuhan Obat Hasil

Penelitian, Sifat-Sifat dan

Penggunaannya, Pusat Penelitian

Obat Tradisional, Universitas

Gadjah Mada Yogyakarta

Zein, Umar. (2004). *Diare Akut*

Disebabkan Bakteri. Diakses

tanggal 26 Oktober 2015, dari

<http://library.usu.ac.id/download/f>

[k/penydalam-umar5.pdf](http://library.usu.ac.id/download/f)

Nassar, Z., Abdalrahim, Amin M.S.

2010. The Parmalogical Properties

of terpenoid from *Sandoricum*

Koetjape. Journal Medcentral.

p.1-11