

Studi *In Vitro* dan *In Silico* Efektivitas Antibakteri Kunyit Putih Terhadap Hambatan Pertumbuhan *Escherichia Coli*

In Vitro and Silico Study of White Turmeric's Antibacterial Efficacy against Escherichia coli

Putu Oky Ari Tania¹, Agusniar Furkani Listyawati², Aylly Soekanto³, Dorta Simamora¹, Rini Purbowati¹

¹Bagian Biomedik Penelitian Biomolekuler Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

²Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

³Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya

*Korespondensi Penulis :

Putu Oky Ari Tania, putu.oky@gmail.com

Abstrak

Latar Belakang: *Escherichia coli* telah diamati sebagai salah satu bakteri penyebab resistensi antibiotik. Pasien ISK di India Selatan dilaporkan menunjukkan peningkatan resistensi terhadap ciprofloxacin. Senyawa bioaktif diperlukan sebagai kandidat antibiotik untuk mengendalikan infeksi bakteri. *Curcuma zedoaria* atau kunyit putih sebagai antimikroba terutama terhadap *E. coli*. Aktivitas antibakteri pada dinding sel paling sering digunakan sebagai agen bakterisida. Enzim penting untuk biosintesis peptidoglikan pada dinding sel bakteri adalah protein muramyl ligase E (MurE) (entri PDB: 7B9E) dan Gyrase B (entri PDB: 4ZVI), berpotensi sebagai target pengikatan dengan metabolit sekunder curcumenol dan germacrone dengan *in silico* (*molecular docking*). **Tujuan:** Penelitian ini bertujuan untuk melihat efektivitas ekstrak etanol kunyit putih dibandingkan antibiotik dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* secara *in vitro* dan *in silico*. **Metode:** 5 kelompok yang digunakan, yaitu ekstrak kunyit putih konsentrasi 15%, 20% dan 25%, kelompok kontrol positif dengan pemberian ciprofloxacin dan negatif yang diberikan aquades. Metode yang digunakan adalah mengukur diameter zona hambat dan daya bunuh (jumlah koloni) *E. coli* dan uji *in silico* yang dilakukan pada software PyRx. **Hasil :** penelitian menunjukkan ekstrak kunyit putih konsentrasi 25% mempunyai zona hambat yang sangat kuat dengan diameter hambatan 36,2 mm, sedangkan kunyit putih tidak mempunyai daya membunuh pada konsentrasi 10, 15 dan 25%. Afinitas pengikatan terendah untuk protein MurE adalah germacrone, sedangkan untuk pengikatan DNA girase B adalah curcumenol. **Kesimpulan:** Kunyit putih mempunyai potensi sebagai antibakteri dan diduga ligan curcumenol dan germacrone dapat menghambat aktivitas protein MurE dan DNA Gyrase B.

Kata Kunci: antibakteri; DNA Gyrase B; kunyit putih; *molecular docking*; MurE

Abstract

Background: *Escherichia coli* has been observed as one of the causes of antibiotic resistance. It has been reported that urinary tract infections in South India showed increased resistance to ciprofloxacin. Bioactive compounds, such as *Curcuma zedoaria* or white turmeric, are needed as antibiotic candidates to control bacterial infections and as antimicrobials against *E. coli*. Antibacterial activity on the cell wall is often used as a bactericidal agent. Necessary enzymes for peptidoglycan biosynthesis in bacterial cell walls are muramyl ligase E (MurE) (PDB entry: 7B9E) and Gyrase B (PDB entry: 4ZVI) proteins, which are potential targets for binding with secondary metabolites kurkumenol and germacrone by molecular docking. **Objective:** This study explored the effectiveness of white turmeric ethanol extract compared to antibiotics in inhibiting *E. coli* growth *in vitro* and *in silico*. **Methods:** Using five groups, namely, white turmeric extract concentrations of 15%, 20%, and 25%, positive control was given ciprofloxacin and aqua dest as negative control. The method used was measuring the diameter of the inhibition zone and killing power (number of colonies) of *E. coli*, and *in silico* tests were carried out using PyRx software. **Results:** It was shown that white turmeric extract at a concentration of 25% had a potent inhibition zone of 36.2 mm, while white turmeric at concentrations of 10, 15 and 25% had no antibacterial effect. The lowest binding affinity for MurE protein is germacrone, while gyrase B is curcumin for DNA. **Conclusion:** White turmeric has potential as an antibacterial, and the ligands curcumin and germacrone are predicted to have potential inhibitory activity against MurE protein and DNA Gyrase B.

Keywords: antibacterial; DNA Gyrase B; white turmeric; *molecular docking*; MurE

Pendahuluan

Resistensi terhadap antibiotik menjadi masalah bidang kesehatan karena menyebabkan ketidakefektifan terapi untuk melawan infeksi bakteri tertentu. Ketidakefektifan tersebut dapat berdampak fatal berupa kematian akibat penyakit infeksi.¹ *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang resistensi terhadap antibiotik, AMRIN-Study atau *antimicrobial Resistance in Indonesia* melaporkan bahwa 43 % *E. coli* mengalami resistensi antibiotik.² Studi dari Vieira (2011),³ yang dilakukan di 11 negara Eropa, termasuk Austria, Denmark, Finlandia, Perancis, Jerman, Italia, Belanda, Norwegia, Spanyol, Swis dan Swedia melaporkan terdapatnya isolat *E.coli* yang resistensi antibiotik pada sumber makanan hewani berasal dari daging unggas, daging babi dan daging sapi. Sumber makanan terkontaminasi *E. coli* yang resisten antibiotik, dapat menyebar ke manusia. Manusia berisiko untuk terinfeksi selama proses pemasakan atau mengonsumsi sumber pangan yang terkontaminasi. Kontaminasi *E.coli* resisten antibiotik ini selanjutnya akan berkolonisasi di usus dan berpotensi menyebabkan infeksi, pada umumnya infeksi saluran kencing (ISK).⁴ Selain itu dapat juga menyebabkan infeksi bloodstream, infeksi food-borne, meningitis bayi 1. Bakteri gram negatif ini berkontribusi

terhadap terjadinya diare, berdasarkan kelompok virulensinya, penyebab diare ini dikenal dengan Diarrheagenic *E. coli* (DEC).⁵

Beberapa antibiotik telah berkurang efektivitasnya terhadap *E. coli* termasuk amoksisilin dan sefuroksim.⁶ Prevalensi resistensi *E. coli* terhadap ciprofloxacin pada kultur fecal dari 3.284 pasien di Semarang dan Surabaya, Indonesia adalah 8% dengan menggunakan metode difusi cakram.⁷ Oleh karena itu perlu pengembangan potensi antimikroba untuk membantu antibiotik sebagai pengendali infeksi bakteri, khususnya *E. coli*. Salah satunya *Curcuma zedoaria* atau kunyit putih yang banyak ditemukan dan mempunyai beberapa manfaatnya untuk kesehatan.

Curcuma zedoaria adalah herbal yang mengandung berbagai senyawa seperti alkaloid, fenol, saponin, glikosida, steroid, terpenoid. Rimpang dari tanaman ini mengandung lebih dari sepuluh jenis sesquiterpene termasuk curcumin, zingiberene, curcumenol, furanodiene dan germacrone.⁸ Kunyit putih memiliki beberapa fungsi antara lain sebagai antimikroba, antifungi, antikanker, anti alergi, antioksidan dan sebagai analgesic.⁹ Menurut Islam et al¹⁰, ekstrak etanol rimpang kunyit putih berpotensi sebagai antibakteri dengan hambatan terbesar pada bakteri *E. coli* dan *Salmonella typhi*. *Curcuma*

mengandung curcuminoid termasuk curcumin yang merupakan senyawa fenolik yang merupakan senyawa paling aktif dan merupakan bahan yang berpotensi dalam membentuk zona hambat.¹¹

Beberapa protein pada bakteri diketahui sebagai target antibakteri. Mekanisme antibakteri dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri, menghambat sintesis protein, dan sintesis asam nukleat dan antimetabolit. Aktivitas antibakteri pada dinding sel adalah yang paling sering digunakan sebagai bakterisidal karena hambatan sintesis peptidoglikan pada bakteri menyebabkan lisis sel.¹² Enzim penting untuk biosintesis peptidoglikan pada dinding sel bakteri adalah protein muramyl ligase E (MurE) (PDB entry: 7B9E).

Cara kerja antibiotik ciprofloxacin adalah hambatan enzim topoisomerase. Gyrase B merupakan sub unit DNA gyrase yang merupakan enzim topoisomerase type II yang ketika berikatan dengan suatu komponen, maka biosintesis DNA tidak terjadi sehingga terjadi kematian bakteri.^{13,14} Pada Penelitian ini dilakukan studi invitro dalam mengeksplorasi efikasi *Curcuma zedoaria* sebagai antibakteri *E. coli* sekaligus memprediksi target antibakteri untuk protein *E. coli* secara in silico yaitu

muramyl ligase E dan protein DNA gyrase B.

Metode

Penelitian eksperimental dengan metode *in vitro* dan *in silico*. Metode *In vitro* Lima kelompok isolate *E. coli* diberikan perlakuan dengan Kontrol Positif (KP) yaitu pemberian Ciprofloxacin, Kontrol Negatif (KN) dengan pemberian aquades, kelompok A, B, dan C (ekstrak kunyit putih masing-masing konsentrasi 10%, 15%, dan 25%). Sedangkan pendekatan *in silico* dengan metode *molecular docking* menggunakan *software* PyRx dan PyMOL.

Bahan yang digunakan adalah serbuk kunyit putih yang diambil dari petani di daerah Banyumas, etanol, Dimetil sulfoksida (DMSO), isolat *Escherichia coli*, media Mueller Hinton Agar (MHA), Eosin Methylene Blue (EMB). Banyumas merupakan daerah pertanian dan pengolahan kunyit putih hingga menjadi serbuk yang dijual sebagai bahan jamu dan obat.

Alat yang digunakan untuk proses ekstraksi yaitu pisau, blender, tabung Erlenmeyer, dan *rotary vacuum evaporator*. Timbangan analitik dengan ketelitian 4 angka ukuran di belakang koma. Penelitian in silico dengan bantuan perangkat lunak (*software*) PyMOL, Discovery Studio 2016, dan

PyRx pada notebook yang akan digunakan. Spesifikasi notebook yang akan digunakan instalasi minimal adalah dual core processor, 2 GHz, RAM 2GB, dengan tipe sistem Windows 8 Enterprise – 64 bit operating system. Protein muramyl ligase E (PDB entry: 7B9E) dan protein DNA gyrase B (PDB entry: 4ZVI), ligan Germacrone (Pubchem ID: 6436348) dan curcumenol (Pubchem ID: 167812).

Ekstraksi kunyit putih dengan metode maserasi etanol 96%. Simplisia didapatkan berupa serbuk kunyit putih 500 gram dimaserasi dengan 1250 mL etanol (2:2,5). Ekstraksi dilakukan dalam botol kaca tertutup selama 7 hari, dengan sesekali diaduk.¹⁰ Dari 500 gram serbuk didapatkan 14,3 gram ekstrak kental.

Pembuatan suspensi bakteri dengan cara mencampur bakteri *E. coli* dengan PZ sesuai standar 0,5 Mc. Farland. Suspensi bakteri ini dibuat di Laboratorium Mikrobiologi FK UWKS. Isolat ekstrak kunyit putih 10%, 15% dan 25% dilarutkan dalam DMSO. Kontrol positif yaitu kelompok Ciprofloxacin dengan dosis 50 µg/ 50 mL.¹⁵

Aktivitas Daya Hambat menggunakan metode difusi sumuran dengan Media Muller Hinton Agar. Setiap sumuran diisi sebanyak 0,1 mL dan diukur diameter zona hambatnya. Aktivitas Daya Bunuh yaitu masing-masing 1 ml biakan *E. Coli* dan 1 ml

larutan uji (ekstrak kunyit putih berbagai konsentrasi, aquades, dan ciprofloxacin) dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu diinkubasi, lalu diinokulasi ke EMB dengan metode spreading dan dilakukan penghitungan koloni.

Uji *In silico*: Tahap biokomputasi molekuler secara *in silico* dengan data yang diperoleh dari database PubChem, RCSB dan uniprot. Visualisasi dengan PyMOL. Docking molekul dengan PyRx. Hasil uji *in silico* dibandingkan dengan antibiotik ciprofloxacin. Protein yang digunakan sebagai protein uji adalah protein DNA gyrase B (PDB entry: 7B9E) dan protein DNA gyrase B (PDB entry: 4ZVI). Ligan yang digunakan adalah senyawa kunyit putih yang diduga dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* yaitu curcumenol, dan Germacrone.

Data yang diperoleh berupa diameter zona hambat pertumbuhan *E. coli*, *Minimum inhibitory concentrations* (MIC) dan *Minimum bactericidal concentrations* (MBC) dan jumlah koloni (daya bunuh). Pengumpulan data MIC yaitu konsentrasi minimal dari ekstrak yang dapat menghambat bakteri, sedangkan MBC adalah konsentrasi minimal yang bisa membunuh bakteri. Analisis dilakukan beberapa tahap, Uji asumsi statistik normalitas menggunakan Kolmogorov-Smirnov dan uji homogenitas menggunakan Leven's test (p value > 0,05). Dilanjutkan dengan

ANOVA dan Uji post hoc dengan uji LSD ($\alpha = 0,05$) jika memenuhi asumsi uji parametrik dan jika tidak memenuhi asumsi menggunakan non parametrik Mann Whitney. Hasil uji *in silico* dianalisis dengan membanding antara ikatan hidrogen, letak pengikatan, dan asam amino yang menjadi lokasi pengikatan senyawa aktif terhadap antibiotik ciprofloxacin.

Hasil

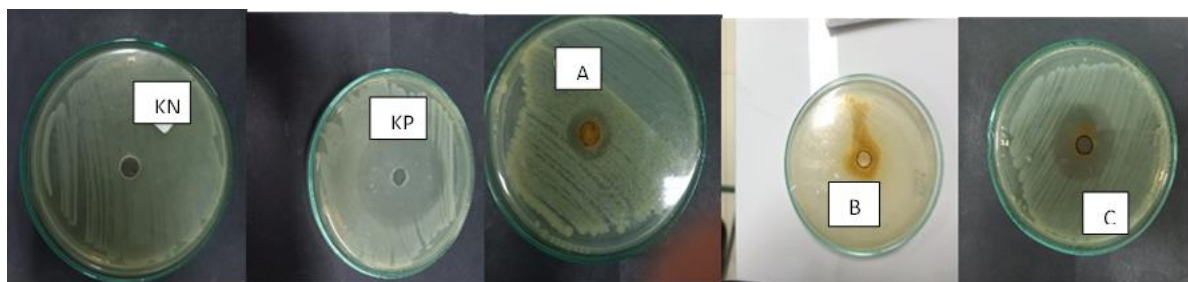
Zona hambat dengan uji difusi sumuran, didapatkan hasil adanya zona bening disekitar sumuran yang menandakan pertumbuhan *E. coli* dapat dihambat oleh larutan uji yaitu ekstrak kunyit putih. Diameter zona hambat pada Tabel 1 menunjukkan rerata diameter

zona hambat terbesar ditunjukkan dari pemberian ciprofloxacin yaitu sebesar 43,8 mm, sedangkan pemberian aquades tidak menunjukkan adanya daya hambat.

Pemberian ekstrak kunyit putih konsentrasi 25% menunjukkan diameter daya hambat yang paling besar dibandingkan konsentrasi lainnya. *Index inhibition* diukur dengan membagi zona hambat masing-masing larutan dengan diameter sumuran yang digunakan. Tabel 1 menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak yang diujikan menunjukkan *index inhibition* yang semakin besar. *Visualisasi* diameter daya hambat tiap kelompok dapat diamati pada Gambar 1.

Tabel 1. Uji Daya Hambat Ekstrak Kunyit Putih terhadap Pertumbuhan *E. coli*

Kelompok	Diameter Zona Hambat (mm)		Rerata Jumlah Koloni (CFU)
	Rerata	<i>Index inhibition</i>	
Ekstrak Kunyit Putih 10%	22,7	0,52	97,4
Ekstrak Kunyit Putih 15%	18,7	0,43	78,8
Ekstrak Kunyit Putih 25%	36,2	0,83	72,4
Ciprofloxacin 5 μ g/ 50 mL	43,8	1	51,4
Aquades	0	0	123,4



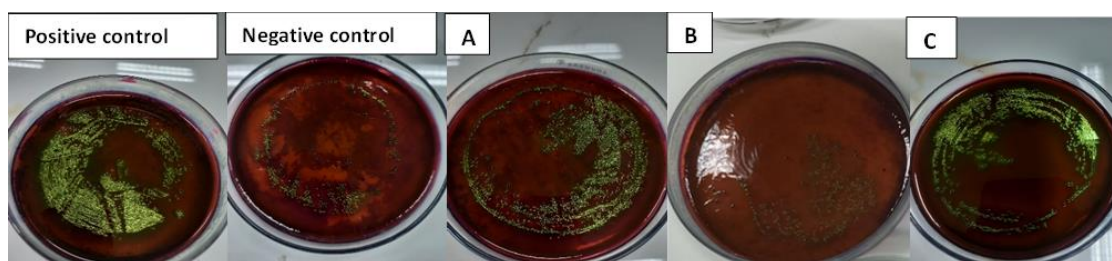
Gambar 1. Diameter daya hambat atau zona terang pertumbuhan *E. coli* di sekitar sumuran

Jumlah koloni terbanyak ditunjukkan pada kontrol negatif (KN) yaitu dengan pemberian aquades terbukti tidak memiliki daya bunuh terhadap *E. coli*. Rerata jumlah koloni paling sedikit ditunjukkan pada KP atau pemberian ciprofloxacin. Koloni *E. coli* pada media EMB spesifik menunjukkan warna hijau metalik (Gambar 2.)

Hasil uji normalitas untuk diameter daya hambat dan jumlah koloni menunjukkan nilai p value $> 0,05$. Uji homogenitas dengan Levene test menunjukkan p value $< 0,05$. Hasil uji Mann-Whitney U menunjukkan p value pada variabel diameter daya hambat 0,000 dan jumlah koloni 0,025 yang berarti pemberian perlakuan ekstrak kunyit, aquades maupun ciprofloxacin menunjukkan perbedaan rata-rata yang berbeda signifikan terhadap zona hambat dan jumlah koloni *E. coli*. Hasil uji statistik tersaji pada Tabel 2.

Perbedaan rata-rata zona hambat dan rata-rata jumlah koloni dari masing-

masing kelompok dapat diamati perbedaannya menggunakan uji Kruskal-Wallis pada Tabel 3. Perbedaan variabel diameter daya hambat dan jumlah koloni pada masing-masing kelompok ditunjukkan pada Tabel 3. Perbedaan zona hambat antara kelompok kontrol Negatif dan pemberian ciprofloxacin (KP) menunjukkan beda bermakna (0,000). Daya Hambat ekstrak kunyit putih 25% menunjukkan tidak ada perbedaan zona hambat dengan ciprofloxacin. Ekstrak kunyit konsentrasi 10% dan 15% tidak menunjukkan perbedaan zona hambat, sedangkan pemberian ekstrak kunyit putih antara 15% dan 25% menunjukkan perbedaan zona hambat. Diameter zona hambat menunjukkan perbedaan yang bermakna antara kelompok ekstrak kunyit putih 10% dengan KP (ciprofloxacin), dan konsentrasi 15% dengan ciprofloxacin.



Gambar 2. Koloni *E. coli* di Media EMB Agar pada masing-masing Kelompok

Tabel 2. Hasil Uji Statistik

Uji Statistik	Diameter Daya Hambat (<i>p value</i>)	Jumlah Koloni (<i>p value</i>)
Kolmogorov-Smirnov	0,200	0,110
Levene	0,000	0,025
Mann-Whitney U	0,000	0,000

Tabel 3. Tabel Analisis Statistik Perbedaan Diameter Zona Hambat dan Jumlah Koloni *E. coli* dengan Berbagai Perlakuan

Kelompok	Kelompok	<i>p Value</i>	
		Diameter Zona Hambat	Jumlah Koloni
Aquades (KN)	KP (ciprofloxacin)	0,000*	0,000*
	Ekstrak Kunyit Putih 10%	0,344	0,282
	Ekstrak Kunyit Putih 15%	0,262	0,018*
	Ekstrak Kunyit Putih 25%	0,000*	0,003*
Ciprofloxacin (KP)	Ekstrak Kunyit Putih 10%	0,040*	0,001*
	Ekstrak Kunyit Putih 15%	0,002*	0,053*
	Ekstrak Kunyit Putih 25%	0,437	0,196
Ekstrak Kunyit Putih 10% (A)	Ekstrak Kunyit Putih 15%	0,321	0,196
	Ekstrak Kunyit Putih 25%	0,203	0,053
Ekstrak Kunyit Putih 15% (B)	Ekstrak Kunyit Putih 25%	0,023*	0,518
Ekstrak Kunyit Putih 25% (C)	KN (aquades)	0,000*	0,003*
	KP (ciprofloxacin)	0,437	0,196
	Ekstrak Kunyit Putih 10%	0,203	0,053*
	Ekstrak Kunyit Putih 15%	0,023	0,518

Studi In silico

Pemilihan senyawa uji/ kandidat berdasarkan studi literatur, yaitu curcumenol dan germacrone karena dua senyawa ini berpotensi sebagai antibakteri. Struktur senyawa uji sebagai kandidat diambil melalui database yaitu curcumenol <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/167812> Germacrone yaitu <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6436348>. Kedua senyawa uji tersebut dalam struktur tiga dimensi dapat disimpan dalam format "sdf", untuk diubah ke bentuk "pdf" menggunakan aplikasi PyMOL.

Pencarian dan Preparasi Protein Target

Protein target yang digunakan yaitu protein muramyl ligase E (PDB entry: 7B9E) dan protein DNA gyrase B (PDB entry: 4ZVI). Ligan dari senyawa uji kunyit putih adalah germacrone (pubchem ID: 6436348) dan curcumenol (Pubchem ID: 167812) serta antibiotik ciprofloxacin sebagai obat kontrol (Pubchem ID: 2764). Protein target perlu dicari rantai yang berikatan dengan ligan unik sehingga dapat disimpan sebagai protein yang siap untuk dilakukan docking, dan disimpan dalam format

.pdb. Ligan unik protein 7B9E yaitu JHP dan 4S4 untuk protein 4ZVI. Struktur tiga dimensi masing-masing protein diambil dari database RCSB Protein Data Bank yaitu untuk muramyl ligase E <https://www.rcsb.org/structure/7B9E> dan DNA gyrase B <https://www.rcsb.org/structure/4ZVI>, kriteria masing-masing protein menggunakan struktur X-Ray dengan resolusi < 3,00 Å, untuk organisme *E. coli*. Data diunduh menggunakan format .pdb. Sebelum dilakukan docking, terlebih dahulu dilakukan tahap preparasi protein target dengan penghilangan molekul air menggunakan software Pymol.

Prediksi Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas pada Senyawa

Senyawa atau ligan uji yaitu curcumenol dan germacrone diuji juga parameter fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitasnya menggunakan database pkCSM. Prediksi fisikokimia diukur berdasarkan Lipinski's rule of five, yaitu senyawa dikatakan sebagai kandidat obat jika berat molekul < 500, koefisien *logarithm of the octanol partition* (LogP) <5, hydrogen bond donor (HBD) <5, hydrogen bond acceptor (HBA)<10, and tidak lebih dari dua errors/violations. Prediksi fisikokimia dan prediksi farmakokinetik dan toksisitas senyawa uji dapat diamati pada Tabel 4 dan Tabel 5.

Tabel 4. Prediksi Fisikokimia dari Curcumenol dan Germacrone

No	Compounds	Lipinski's Five Law Parameters				Application of Lipinski's Five Laws
		BM (g/mol)	Log P	HBA	HBD	
1	Curcumenol	234.339	3.1765	2	1	Yes, 0 Error
2	Germacrone	218.34	4.3885	1	0	Yes, 0 Error
3	Ciprofloxacin (antibiotik pembanding)	331.347	1.5833	5	2	Yes, 0 Error

Molecular Docking

Setelah diketahui protein target dan ligan dari senyawa uji, maka dilanjutkan dengan prediksi dan *molekuler docking* yaitu menggunakan software pyRx. Pada software pyRx dimasukkan macromolecule yaitu protein target yang telah di preparasi, berikut ligan unik dan

ligan dari senyawa *Curcuma zedoaria*. Selanjutnya dilakukan *specific docking* pada tempat/ site ligan alami dan ligan uji berada berikatan (binding site). Pada protein 7B9E center terdapat pada X: 16,443; Y: 7,9059; dan Z: 13,4645, sedangkan protein 4ZVI terdapat pada center: X: -3.9065; Y: 12.3038; Z:

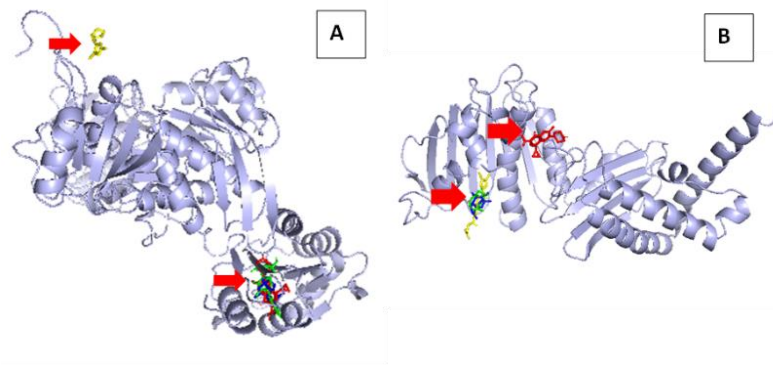
12.5368. Proses selanjutnya adalah *docking* untuk mendapatkan hasil *pose*, *binding affinity*, *RMSD upper bond* dan *RMSD lower bond*.

Studi *in silico* dilakukan dengan memprediksi cara kerja kunyit putih terhadap hambatan pertumbuhan *E. coli*. Pada uji *in silico* dilakukan analisis mekanisme penghambatan antara senyawa obat yang diuji yaitu curcumenol dan germacrone kunyit putih terhadap protein target dari *E. coli* yaitu protein murE dan DNA gyrase B dengan ligan alami masing-masing adalah JHP dan 4S4, yang dibandingkan dengan antibiotik

ciprofloxacin. Hasil binding affinity terhadap kedua protein dan ligan alami serta ciprofloxacin terdapat pada Tabel 6. Gambar 3. (A) menunjukkan bahwa semua ligan uji yaitu senyawa germacrone, curcumenol, ligan alami JHP dan ciprofloxacin menunjukkan sisi ikatan di satu *pocket*. Sedangkan gambar (B) menunjukkan sisi aktif ligan uji terdapat di dua *pocket*, satu *pocket* yaitu ciprofloxacin, dan *pocket* lainnya yaitu ligan 4S4, germacrone dan curcumenol. Struktur 3 dimensi masing-masing protein dan ligan uji, ligan alami serta ciprofloxacin dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 5. Prediksi Farmakokinetik dan Toksisitas

Prediksi farmakokinetik dan toksisitas	Cucumenol	Germacrone	Ciprofloxacin
<i>Water solubility (log mol/L)</i>	-3,421	-4,298	-2,897
<i>Caco2 permeability (log Papp in 10⁻⁶ cm/s)</i>	1,525	1,434	0,492
<i>Intestinal absorption (human) (%)</i>	95,613	95,515	96,466
<i>Skin permeability (log Kp)</i>	-2,95	-1,922	-2,734
<i>Vss (human) (log L/kg)</i>	0,412	0,292	-0,17
<i>BBB permeability (log BB)</i>	0,545	0,526	-0,587
<i>CNS Permeability</i>	-2,809	-2,48	-2,999
<i>CYP2D6 substrate (Yes/ No)</i>	No	No	No
<i>CYP2D6 inhibitor (Yes/ No)</i>	No	No	No
<i>Total Clearance (log ml/min/kg)</i>	1,016	1,416	0,633
<i>Renal OCT substrate (Yes/ No)</i>	No	No	No
<i>Ames toxicity (Yes/ No)</i>	No	No	No
<i>Oral Rat acute toxicity LD50 (mol/kg)</i>	1,829	1,768	2,891
<i>Hepatotoxicity (Yes/ No)</i>	No	No	Yes



Gambar 3. Kompleks protein target dengan semua ligan: MurE (A), DNA gyrase B (B). Rantai merah: Ciprofloxacin; Hijau: Germacrone; Biru: Curcumenol; Kuning: ligan alami (JHP dan 4S4)

Tabel 6. Nilai Binding Affinity interaksi protein-ligan

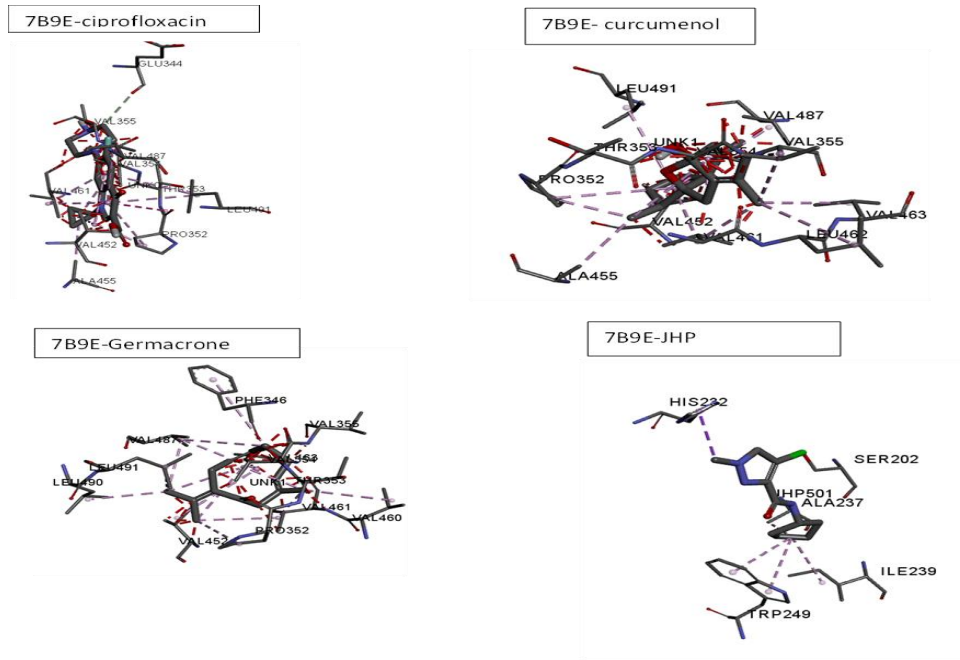
Protein Target	Binding Affinity (Kkal/ mol)			
	Senyawa Kandidat/ ligan			
	Curcumenol	Germacrone	Ciprofloxacin	Ligan alami
MurE	-7,3	-7,4	-6,9	-7,6
DNA Gyrase B	-7,0	-6,7	-7,0	-7,3

Nilai *binding affinity* atau energi ikatan antara protein dan ligan. Binding affinity menunjukkan kemampuan suatu protein untuk berikatan dengan ligannya pada posisi tertentu. Protein MurE dan DNA gyrase B diketahui memiliki *binding affinity* paling rendah masing-masing terdapat pada ligan germacrone -7,4 Kkal/mol dan curcumenol sebesar -7,0 Kkal/ mol. Ciprofloxacin memiliki nilai *binding affinity* pada protein murE dan DNA gyrase B masing-masing sebesar -6,9 dan -7,0 Kkal. Nilai binding affinity germacrone terhadap protein MurE lebih rendah dibandingkan antibiotik

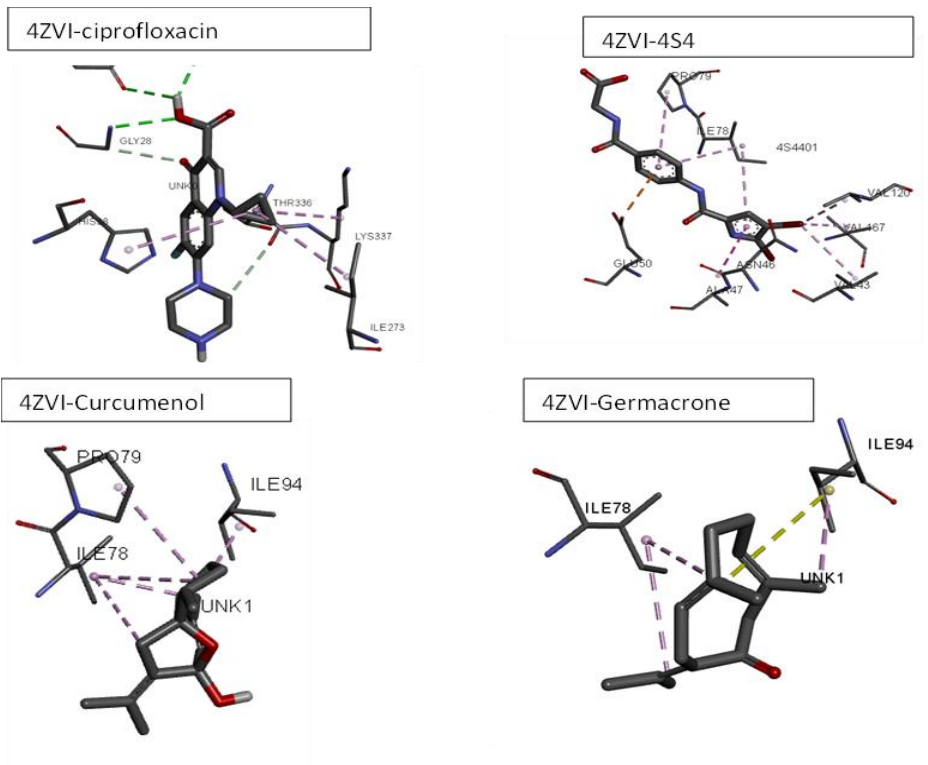
ciprofloxacin, sedangkan *binding affinity* antara DNA gyrase B dan curcumenil sama dengan ciprofloxacin.

Interaksi Ligan dan Reseptor

Interaksi ligan dengan residu asam amino pada protein (reseptor) dapat diamati pada struktur 2 dimensinya dan dapat diketahui jenis ikatannya melalui software Discovery Studio. Struktur 2 dimensi interaksi antara ligan dan proteinnya dapat dilihat pada Gambar 4. Jenis interaksi dan ikatan yang terbentuk antara ligan dan protein tersebut dapat diketahui pada Tabel 6.



Gambar 4. A. interaksi Residu Asam Amino Ligan dan Protein 7B9E



Gambar 4. B. interaksi Residu Asam Amino Ligan dan Protein 4ZVI

Tabel 6. Residu Asam Amino pada Senyawa dan Protein Target

Protein	Kandidat senyawa	Residu Asam Amino	Interaksi
MurE	Curcumenol	Leu491, Val452, Pro352, Val354, Ala455, Val355, Val461, Leu462, Val463, Val487	Hidrofobik
	Germacrone	Val487, Val354, Val460, Val461, Leu490, Leu491, Pro352, Val452, Val463, Val487, Phe346	Hidrofobik
	Ciprofloxacin	Pro352-Thr353, Val354, Val452, Ala455, Pro352, Val461, Val487, Leu451, Val452, Leu491 Glu334	Hidrofobik Ikatan hidrogen
	JHP	His232, Ala237, Ile239, Trp249 Ser202	Hidrofobik Ikatan hidrogen
DNA Gyrase B	Curcumenol	Ile78, Ile94, Pro79	Hidrofobik
	Germacrone	Ile94, Ile78	Hidrofobik
	Ciprofloxacin	Ile273, Lys337, His38 Gyl24, Met25, Gyl28, Thr336, Gyl28	Hidrofobik Ikatan hidrogen
	4S4	Asn46, Val43, Val120, Val167, Ile78, Pro79, Ile78 Glu50	Hidrofobik Elektrostatik

Keterangan: cetak tebal menunjukkan kompleks ligan dan protein dengan kontrol

Pembahasan

Pada penelitian ini, aktivitas anti bakteri diamati dari daya hambat dan zona bunuh terhadap pertumbuhan *E. coli*. Konsentrasi *Minimal Inhibition Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah dari suatu agen antibakterial yang dikontrol pada kondisi *in vitro* yang mencegah pertumbuhan nyata dari suatu bakteri.¹⁶ MIC ekstrak kunyit putih dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* yaitu pada konsentrasi 10%. Konsentrasi ini menghasilkan zona hambat rata-rata sebesar 22,7 mm. Kategori aktivitas antibakteri ditunjukkan dari nilai yang beragam. Diameter zona hambat yang lebih dari 20 mm

dikategorikan sebagai antibakteri yang sangat kuat, sedangkan diameter 10-20 mm dikategorikan antibakteri kuat, 5-10 mm kategori sedang dan < 5mm dikategorikan lemah aktivitas antibakterinya.⁹ Hanya konsentrasi 15% saja yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat, konsentrasi lainnya menunjukkan aktivitas antibakteri yang sangat kuat.

Index inhibition atau *activity index* sebesar 1,00 menyatakan bahwa ekstrak tersebut memiliki kemampuan yang sama dalam menghambat seperti kontrol positif yaitu antibiotik ciprofloxacin.¹⁷ Pada penelitian ini *index inhibition* konsentrasi 25% adalah

konsentrasi ekstrak kunyit putih yang paling baik karena mendekati aktivitas ciprofloxacin yaitu antibiotik standar dalam membunuh *E. coli*.

Pada uji daya bunuh, semua konsentrasi uji yaitu 10, 15 dan 25% masih menunjukkan pertumbuhan koloni, artinya belum memiliki daya bunuh terhadap pertumbuhan *E. coli*. Bahkan pemberian ciprofloxacin tidak menunjukkan adanya daya bunuh terhadap *E. coli*. Menurut Eltai et al,⁴ bakteri *E. coli* dapat berperan sebagai pembawa atau penampung dari gen *Antibiotics Resistance* (AR), yang dapat memberikan materi genetik AR dengan bakteri dalam golongannya atau spesies berbeda, sehingga bakteri komensal *E. coli* dapat berperan sebagai penyebab utama kematian akibat resistensi antibiotik.¹

Pemberian ciprofloxacin sebagai antibiotik standar untuk infeksi *E. coli*. Menurut Abbott et al,¹⁸ penggunaan ciprofloxacin pada infeksi saluran kencing akibat *E. coli* dapat dikategorikan adalah antibiotik yang manjur. Tidak ada perbedaan zona hambat antara ekstrak kunyit konsentrasi 25% dengan ciprofloxacin, sehingga penggunaan ekstrak kunyit putih 25% hanya dapat menghambat pertumbuhan *E. coli* seperti ciprofloxacin.

Kunyit putih mengandung metabolit primer dan sekunder, dengan komponen utama adalah pati, curcumin, minyak esensial dan Arabic gum. Rimpangnya mengandung lebih dari 10 jenis sesquiterpene termasuk germacrone,⁸ pada fraksi heksan dan dikloromethan ditemukan 19 komponen termasuk curcumenol.¹⁹ Curcumenol juga merupakan senyawa yang termasuk dalam kelompok sesquiterpenoid yaitu sesquiterpene tipe Guaiane.²⁰

Menurut Rahayu et al.²¹ curcumenol pada kunyit putih meliputi penghambatan yang sedang sebesar 50 ppm yang menghambat *Staphylococcus aureus* dan *E. coli*. Komponen bioaktif utama yang ditemukan pada minyak volatile dari kunyit putih adalah germacrone yang memiliki salah satu khasiat sebagai antibakteri.²² Senyawa Germacrone adalah golongan sesquiterpene yang bersifat hidrofob sehingga mengganggu integritas sel bakteri melalui penurunan cadangan ATP intrasel, menurunkan pH sel, sehingga bakteri mengalami presipitasi dan denaturasi protein.²³

Hasil uji Kruskal-Wallis juga menunjukkan pada jumlah koloni pada aquades tidak menunjukkan perbedaan jumlah koloni dengan ekstrak kunyit putih konsentrasi 10%. Pemberian ciprofloxacin tidak menunjukkan jumlah

koloni yang berbeda signifikan dengan ekstrak kunyit putih konsentrasi 15% dan 25%. Artinya, ekstrak kunyit putih konsentrasi 15% dan 25% memiliki daya bunuh bakteri *E. coli* yang sama dengan ciprofloxacin.

Resistensi *E. coli* terhadap antibiotik ciprofloxacin dilaporkan beberapa dekade ini. Pemberian dosis rendah ekstrak kunyit putih sudah mampu membunuh bakteri seperti ciprofloxacin. *E. coli* mengalami evolusi sehingga mengalami resistensi ciprofloxacin dari akumulasi perubahan beberapa gen. Mutasi pada gen tertentu seperti *rpoB* mengakibatkan tidak sensitif terhadap ciprofloxacin. Terjadi peningkatan efflux membran intraseluler dari *E. coli* yang tidak rentan terhadap ciprofloxacin akibatnya ciprofloxacin akan dikeluarkan dari sitoplasma ke periplasma atau bahkan dikeluarkan dari sel.²⁴ Penelitian secara *in vitro* menunjukkan potensi ekstrak kunyit putih dengan dosis yang semakin tinggi untuk menyamai potensi ciprofloxacin dalam kerentanan terhadap *E. coli*.

Pendekatan *in silico* memungkinkan skrining molekul secara virtual sehingga didapatkan prediksi fisikokimia, farmakokinetik dan toksisitas yang lebih baik dalam kandidat obat dan membutuhkan waktu yang lebih cepat. Pendekatan *docking* molekuler berbasis ligan tersedia untuk eksplorasi

penemuan obat baru dengan *throughput* tinggi.²⁵ Beberapa agen terapi gagal di tahap uji coba klinis karena parameter ADMET (*adsorption, distribution, metabolism, elimination* dan *Toxicity*) yang tidak diinginkan. Metode *drug-likeness* paling sering digunakan untuk mengidentifikasi rekomendasi senyawa sebagai obat yaitu memenuhi aturan Lipinski.²⁶

Senyawa yang digunakan sebagai ligan pada penelitian ini yaitu curcumenol dan germacrone pada kunyit putih telah memenuhi 5 parameter Lipinski's antara lain jika berat molekul < 500, koefisien logarithm of the octanol partition (LogP) <5, hydrogen bond donor (HBD) <5, hydrogen bond acceptor (HBA)<10, and tidak lebih dari dua errors/violations.

Profiling farmakokinetik dan toksisitas (ADMET) senyawa uji dilakukan dengan database *online* pkCSM. Pada Tabel 4. parameter *Caco-2 permeability* pada curcumenol dan germacrone adalah 1,525 dan 1,434. *Caco-2* digunakan sebagai sel model secara *in vitro* untuk melihat transpor suatu obat melalui epitel usus. Nilai *bioavailability* untuk memprediksi permeabilitas sel *Caco2* adalah $\geq 0,55$, yang menunjukkan curcumenol dan germacrone dapat menembus membran sel.²⁷

Suatu senyawa dapat diserap usus pada manusia (*intestinal absorption*) jika nilai $> 30\%$, artinya curcumenol dan germacrone dapat diserap di usus. Senyawa yang dapat menembus sistem saraf pusat (*Central Nervous System/ CNS*) jika nilai $< -2,0$, sehingga curcumenol dan germacrone tidak mudah menembus system saraf pusat karena nilai *CNS Permeability* adalah $-2,809$ dan $-2,48 \log PS$.²⁸ Curcumenol dan germacrone tidak menunjukkan efek akut toksik dan mutagenic karena tidak menunjukkan adanya Ames toxicity. Ames toxicity secara umum digunakan sebagai metode untuk mengukur potensi senyawa mutagenik menggunakan bakteri.²⁹

Aktivitas *docking* dapat dilihat pada Tabel 5. *Binding affinity* dari obat, paling baik jika memiliki nilai energi ikat terendah atau lebih negatif.³⁰ Pengikatan ini menghasilkan pembentukan lebih banyak interaksi antara reseptor dan ligan karena lebih banyak energi bebas yang dilepas. Hasilnya, target yang diinginkan lebih mudah diakses dibandingkan dengan ligan dengan nilai negatif lebih rendah.

Nilai *binding affinity* atau energi ikatan antara protein dan ligan. *Binding affinity* menunjukkan kemampuan suatu protein untuk berikatan dengan ligannya pada posisi tertentu. Kompleks protein MurE dan germacrone memiliki *binding*

affinity yaitu $-7,4$ Kkal/mol. Ligan protein MurE (germacrone) berinteraksi dengan sisi aktif pada 11 residu asam amino, sedangkan ligan alaminya yaitu JHP menunjukkan *binding affinity* sebesar $-7,6$ Kkal/mol dan memiliki sisi aktif di 5 residu asam amino. *Binding affinity* dengan ligan curcumenol menunjukkan nilai $-7,3$ Kkal/ mol dengan 10 sisi aktif residu asam amino. Perbandingan jumlah sisi aktif yang penting dan terlibat pada penghambatan MurE dengan ligan curcumenol dan germacrone mengindikasikan germacrone berinteraksi dengan jumlah yang terbesar pada sisi aktif yang penting terhadap hambatan aktivitas protein murE dibandingkan dengan jumlah sisi aktif pada ligan lainnya.

Energi ikatan antara ligan germacrone dengan reseptor MurE ($-7,4$ Kkal/mol) adalah lebih rendah dibandingkan curcumenol dan ciprofloxacin ($-6,9$ Kkal/mol) yang berarti germacrone lebih stabil dan lebih terlokalisasi pada *pocket* protein MurE dibandingkan ligan lainnya.²⁶ Sisi aktif yang penting pada kompleks MurE dan germacrone diketahui pada residu asam amino Val487, Val354, Val460, Val461, Leu490, Leu491, Pro352, Val452, Val463, Val487, Phe346 dengan jenis ikatan hidrofobik. Residu asam amino Leu491, Val452, Pro352, Val354, Val461, Val487 menunjukkan sisi aktif

yang sama dengan kontrol yaitu ciprofloxacin, asam amino ini merupakan sisi aktif yang penting yang dapat digunakan sebagai referensi sisi aktif kandidat obat yang sama dengan ciprofloxacin.

Protein muramyl ligase E (MurE) merupakan enzim penting untuk biosintesis peptidoglikan pada dinding sel bakteri. Peptide muramyl merupakan protein *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMPs) bakteri selama merupakan fragmen peptidoglikan atau murein dari bakteri. Peptidoglikan berlokasi di luar membran plasma bakteri dan membentuk dinding sel bakteri.³¹ Peptide muramyl dapat digunakan untuk komunikasi bagi bakteri, membantu koordinasi pertumbuhan keseluruhan populasi bersama dengan bioregulator lain dari bakteri juga berperan sebagai mediator *Quorum-sensing*.³¹ Menurut Wysocka et al,³² aktivitas antimicrobial dari derivative muramyl dipeptide secara umum lebih tinggi pada bakteri gram negatif termasuk *E. coli* dibandingkan pada bakteri gram negatif. Sehingga germacrone dengan 11 sisi aktif yaitu residu asam amino Val487, Val354, Val460, Val461, Leu490, Leu491, Pro352, Val452, Val463, Val487, Phe346 yang berikatan dengan protein MurE melalui ikatan hidrofobik, akan berpotensi untuk menghambat

aktivasi protein ini dengan cara menghambat pembentukan peptidoglikan *E. coli*. Banyaknya interaksi antara ligan dengan asam amino melalui ikatan hidrofobik akan menunjukkan bahwa interaksinya berpotensi sebagai inhibitor potensial.³⁰

Analisis dari *molecular docking* dilakukan untuk menentukan posisi ikatan hidrogen, hidrofobik antara senyawa yang diuji dengan target protein termasuk kekuatan ikatan antara kompleks tersebut. Senyawa aktif diprediksi memiliki ikatan yang kuat dengan protein target jika ikatan hidrogen berikatan kuat dengan residu asam amino yang sama dengan rujukan kontrol.²⁹

Nilai *binding affinity* antara DNA gyrase B dan curcumenol sama dengan ciprofloxacin yaitu -7,0 Kkal/mol, sedangkan dengan germacrone menunjukkan nilai *binding affinity* yaitu -6,7 Kkal/mol. Hasil *docking* curcumenol menunjukkan *binding affinity* yang lebih negatif dibandingkan dengan germacrone dengan residu asam amino Ile94, Ile78, sedangkan antara curcumenol dengan protein DNA gyrase B ada di sisi aktif Ile78, Ile94, Pro79. Jumlah sisi aktif di curcumenol lebih banyak dari germacrone yaitu 3 residu asam amino yang artinya lebih banyak sisi aktif yang dapat berikatan dengan DNA gyrase B.

DNA Gyrase B merupakan sub unit DNA gyrase yang merupakan enzim topoisomerase type II.¹³ Protein DNA Gyrase sub unit B merupakan reseptor protein yang ketika berikatan dengan suatu komponen, maka biosintesis DNA tidak terjadi sehingga menyebabkan sel bakteri akan mati,¹⁴ sehingga ketika 3 residu asam amino yaitu Ile78, Ile94, Pro79 pada curcumenol berikatan dengan DNA gyrase B, maka biosintesis DNA bakteri akan terhambat sehingga mengakibatkan kematian sel bakteri. *Docking* protein MurE dan DNA gyrase B yang diikat dengan ligan curcumenol serta Germacron, tidak membentuk ikatan hidrogen, namun terdapat interaksi hidrofobik yang ikatannya akan distabilkan pada *binding pocket*.³³

Kesimpulan

Index inhibition konsentrasi 25% adalah konsentrasi ekstrak kunyit putih yang paling mendekati aktivitas ciprofloxacin. Ekstrak kunyit putih konsentrasi 10, 15 dan 25% belum memiliki daya bunuh terhadap pertumbuhan *E. Coli*. Curcumenol maupun Germacron memenuhi standar sebagai obat karena memenuhi 5 kriteria Lipinski (*Lipinski's five of rules*) yaitu berat molekul < 500, koefisien *logarithm of the octanol partition* (LogP) <5, hydrogen bond donor (HBD) <5,

hydrogen bond acceptor (HBA) <10, and tidak lebih dari dua errors/violations.

Saran

Melakukan eksplorasi ekstrak kunyit putih dengan konsentrasi yang lebih besar untuk memperoleh daya bunuh yang lebih baik. Analisis *in silico* dengan senyawa bioaktif lain dari kunyit putih diperlukan untuk memperoleh prediksi yang lebih baik sebagai antibakteri.

Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Wijaya Kusuma sebagai penyandang dana penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Shrestha A, Shrestha R, Koju P, Tamrakar S, Rai A, Shrestha P, et al. The Resistance Patterns in *E. coli* Isolates among Apparently Healthy Adults and Local Drivers of Antimicrobial Resistance: A Mixed-Methods Study in a Suburban Area of Nepal. *Trop Med Infect Dis.* 2022;7(7).
2. Nurjanah GS, Cahyadi AI, Windria S. *Escherichia Coli* Resistance To Various Kinds of Antibiotics in Animals and Humans: a Literature Study. *Indones Med Veterinus.* 2020;9(6):970–83.

3. Barlaam A, Parisi A, Spinelli E, Caruso M, Taranto PDI, Normanno G. Global Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Food Chains and Associated Food Safety Implications : A Review. *J Food Prot* [Internet]. 2019;82(8):1440–8. Available from: <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-116>
4. Eltai NO, Yassine HM, Al Thani AA, Abu Madi MA, Ismail A, Ibrahim E, et al. Prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* isolates from fecal samples of food handlers in Qatar. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2018;7(1):1–7.
5. Montes-yedra J, Bautista-avenda AA, Garcı ES. Virulence genes , antimicrobial resistance profile , phylotyping and pathotyping of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children in Southwest Mexico. 2024;1–23.
6. Rostinawati T. Pola Resistensi Antibiotik Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Kemih di Puskesmas Ibrahim Adjie Kota Bandung. *J Sains Farm Klin*. 2021;8(1):27.
7. Puspandari N, Sunarno S, Febrianti T, Febriyana D, Dian R, Rooslamati I, et al. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* surveillance in the human , food chain , and environment sectors : Tricycle project (pilot) in Indonesia. 2021;13.
8. Gharge S, Hiremath SI, Kagawad P, Jivaje K, Palled MS, Suryawanshi SS. *Curcuma zedoaria* Rosc (Zingiberaceae): a review on its chemical, pharmacological and biological activities. *Futur J Pharm Sci*. 2021;7(1):1–9.
9. Indriani V, Chiuman L, Wijaya LL, Lister G, Grandis L. Antibacterial Effect of *Curcuma zedoaria* Extract on *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Althea Med J*. 2020;7(1):6–10.
10. Miah MAS, Yeasmin T, Islam F, Yeasmin S. Antimicrobial , membrane stabilizing and thrombolytic activities of ethanolic extract of *Curcuma zedoaria* Rosc . Rhizome. *J Pharmacogn Phytochem*. 2017;6 (5)(October 2018):38–41.
11. Dwi Puspita S, Yulianti R, Mozartha M. The effectiveness of white turmeric (*Curcuma zedoaria*) extracts as root canal irrigation alternative material on *Streptococcus viridans*. *J Phys Conf Ser*. 2019;1246(1).
12. Alves MJ, Froufe HJC, Costa AFT, Santos AF, Oliveira LG, Osório SRM, et al. Docking studies in target proteins involved in antibacterial action mechanisms: Extending the knowledge on

- standard antibiotics to antimicrobial mushroom compounds. *Molecules*. 2014;19(2):1672–84.
13. Saqallah FG, Hamed WM, Talib WH, Dianita R, Wahab HA. Antimicrobial activity and molecular docking screening of bioactive components of *Antirrhinum majus* (snapdragon) aerial parts. *Heliyon* [Internet]. 2022;8(8):e10391. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10391>
 14. Yuan C, Hao X. *Heliyon* Antibacterial mechanism of action and in silico molecular docking studies of *Cupressus funebris* essential oil against drug resistant bacterial strains. *Heliyon* [Internet]. 2023;9(8):e18742. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e18742>.
 15. Kanter J, Untu S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Tanaman Jengkol *Pithecellobium jiringa* Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofarmasetikal Trop*. 2019;2(2):170–9.
 16. Kowalska-krochmal B, Dudek-wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics : Methods , Interpretation , Clinical Relevance. 2021.
 17. Kuspradini H, Putri AS, Egra S, Yanti. Short communication: In vitro antibacterial activity of essential oils from twelve aromatic plants from East Kalimantan, Indonesia. *Biodiversitas*. 2019;20(7):2039–42.
 18. Abbott IJ, van Gorp E, Cottingham H, Macesic N, Wallis SC, Roberts JA, et al. Oral ciprofloxacin activity against ceftriaxone-resistant *Escherichia coli* in an in vitro bladder infection model. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2023;78(2):397–410. Available from: <https://doi.org/10.1093/jac/dkac402>
 19. Ganur ANA, Rahayu DUC, Dianhar H, Irwanto I, Sugita P. Terpenoid from Indonesian Temu Mangga (*Curcuma mangga* , Val) Rhizomes and Review of Its Anticancer Towards MCF-7 Breast Cells. 4th International Swminar on Chemistry. <https://doi.org/10.1063/5.00515> (June 2021):1–8.
 20. Ode DS, Dwi AS, Gustin S, Dyah CR, Hanhan D, Purwantiningsih S. Secondary metabolite isolated from Indonesian white turmeric (*Curcuma zedoaria*) rhizomes and its potential as antibacterial agent. 2022;11(1):28–32.
 21. Rahayu WP, Nurjanah S, Komalasari E. *Escherichia coli*: Patogenitas, Analisis, dan Kajian Risiko. *J Chem Inf Model*.

- 2018;53(9):5.
22. Wu J, Feng Y, Han C, Huang W, Shen Z, Yang M, et al. Germacrone derivatives: Synthesis, biological activity, molecular docking studies and molecular dynamics simulations. *Oncotarget*. 2017;8(9):15149–58.
 23. Putri R, Mursiti S, Sumarni W. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Temu Putih dan Temulawak terhadap *Streptococcus Mutans*. *J MIPA [Internet]*. 2017;40(1):43–7. Available from: <http://journal.unnes.ac.id/nju/index.php/JM>
 24. Garoff L, Huseby DL, Praski Alzrigat L, Hughes D. Effect of aminoacyl-TRNA synthetase mutations on susceptibility to ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(12):3285–92.
 25. Abishad P, Niveditha P, Unni V, Vergis J, Kurkure NV, Chaudhari S, et al. In silico molecular docking and in vitro antimicrobial efficacy of phytochemicals against multi-drug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli* and non-typhoidal *Salmonella* spp. *Gut Pathog [Internet]*. 2021;13(1):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13099-021-00443-3>.
 26. Daoui O, Elkhatabi S, Chtita S, Elkhalabi R, Zgou H, Benjelloun AT. QSAR, molecular docking and ADMET properties in silico studies of novel 4,5,6,7-tetrahydrobenzo[D]-thiazol-2-Yl derivatives derived from dimedone as potent anti-tumor agents through inhibition of C-Met receptor tyrosine kinase. *Heliyon [Internet]*. 2021;7(7):e07463. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07463>
 27. Novianty R. Analisis Farmakokinetik, Toksisitas dan Drug-Likeness Lima Senyawa Aktif Biji Pinang Sebagai Antidepresan secara In Silico. *Jurnal Inovasi Pendidikan dan Sains*. 2023;4(1):61-66
 28. Diyah NW, Ghifari AS, Hidayati SW, Ekowati J. In silico Study on Physicochemical, Pharmacokinetic and Toxicity Profiles of Available Antiviral Drugs and The Drug-Target Interaction with Protease of SARS-CoV-2 Studi In Silico Profil Fisikokimia, Farmakokinetik dan Toksisitas Obat Antivirus yang Bereda. *Camellia*. 2022;1(2):38–47.
 29. Hartati FK, Djauhari AB, Viol Dhea K. Evaluation of pharmacokinetic properties, toxicity, and bioactive cytotoxic activity of black rice (*Oryza sativa* L.) as candidates for diabetes mellitus drugs by in silico. *Biointerface Res Appl Chem*. 2021;11(4):12301–11.

30. Sattari A, Ramazani A, Aghahosseini H. Repositioning therapeutics for COVID-19: virtual screening of the potent synthetic and natural compounds as SARS-CoV-2 3CLpro inhibitors. *J Iran Chem Soc* [Internet]. 2021;18(10):2807–27. Available from: <https://doi.org/10.1007/s13738-021-02235-7>
31. Guryanova S V., Khaitov RM. Strategies for Using Muramyl Peptides - Modulators of Innate Immunity of Bacterial Origin - in Medicine. *Front Immunol*. 2021;12(April).
32. Wysocka M, Dzierzbicka K, Krawczyk B. Evaluating the antibacterial activity of muramyl dipeptide derivatives, retro-tuftsins derivatives, and anthraquinone oligopeptides against a range of pathogenic bacteria*. *Acta Biochim Pol*. 2021;68(3):449–55.
33. Jianu C, Stoin D, Cocan I, David I, Pop G et al. In Silico and In Vitro Evaluation of The Antimicrobial and Antioxidant Potential of Mentha x Smithiana R> Graham Essential Oil from Western Romania. *Foods*. 2021,10, 815:1-17.