

## Aktivitas Antibakteri Senyawa Aktif Ekstrak Jintan Hitam (*Nigella sativa*) Terhadap Bakteri MRSA secara *In Silico*

(Antibacterial Activity of Black Cumin (*Nigella sativa*) Active Compounds Against MRSA in In Silico)

Dea Khalissa Anidya<sup>1</sup>, Rini Madyastuti Purwono<sup>2\*</sup>, Dimas Andrianto<sup>3</sup>, Nina Tri Kusumawati<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Program Sarjana Kedokteran Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, 16680, Jawa Barat, Indonesia

<sup>2</sup>Sub Divisi Farmasi Veteriner, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, 16680, Jawa Barat, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Biokimia, Fakultas Ilmu Pengetahuan Alam dan Matematika, IPB University, Bogor, 16680, Jawa Barat, Indonesia

<sup>4</sup>Program Pascasarjana Ilmu Biomedis Hewan, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, 16680, Jawa Barat, Indonesia

Diterima: 16/08/2023, Disetujui: 01/10/2023, Terbit Online: 31/10/2023

\*Penulis untuk korespondensi: keyla@apps.ipb.ac.id

### ABSTRAK

Semakin tinggi penggunaan antibiotik akan meningkatkan risiko terjadinya resistensi bakteri. *S. aureus* merupakan bakteri penyebab mastitis tertinggi yaitu mencapai 67% diantara bakteri patogen penyebab mastitis lainnya. Akibat tingginya penggunaan antibiotik, terbentuklah strain *S. aureus* yang resisten yaitu MRSA. Bahan alami seperti jintan hitam bisa menjadi alternatif pengobatan penyakit menular bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk menguji sifat antibakteri ekstrak jintan hitam terhadap bakteri MRSA (ID:3VSL) secara *in silico* dan mengetahui zat aktif mana yang mempunyai potensi antibakteri terbaik. Berdasarkan hasil LC-MS dari 89 zat aktif yang teridentifikasi, 9 diantaranya mempunyai potensi antibakteri yang cukup baik dibandingkan sefotaksim setelah dilakukan prediksi bioavailabilitas dan toksisitas Lipinski. Hasil analisis penelitian menunjukkan 3 zat aktif yang terdiri dari prolylleucine, (2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole, dan Bis(4-ethylbenzylidene)) Sorbitol merupakan ligan produk alami dengan aktivitas antibakteri terbaik serta menjadi kandidat bahan aktif alternatif pengganti antibiotik.

**Kata kunci:** antibakteri, jintan hitam, *in silico*, MRSA

### ABSTRACT

The higher use of antibiotics will increase the risk of bacterial resistance. *S. aureus* is the highest mastitis-causing bacteria, up to 67%, among other mastitis-causing pathogenic bacteria. Due to the high use of antibiotics, a resistant strain of *S. aureus* was formed, namely MRSA. Natural ingredients such as black cumin can be an alternative treatment of bacterial infectious diseases. This study aims to test the antibacterial properties of black cumin extract against MRSA bacteria (ID: 3VSL) *in silico* and find out which active substances have the best antibacterial potential. Based on the results of LC-MS from 89 active substances identified, 9 of them has a fairly good antibacterial potential compared to cefotaxime after prediction of Lipinski bioavailability and toxicity. The results of this research analysis showed that 3 active substances consisting of prolylleucine, (2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole, and Bis(4-ethylbenzylidene)) sorbitol are natural product ligands with the best antibacterial activity as well as being a candidate for active substances for an alternative to antibiotics.

**Keywords:** antibacterial, black cumin, in silico, MRSA

## 1. Pendahuluan

Penggunaan antibiotik terus meningkat semenjak ditemukannya penisilin pertama kali. Penggunaannya juga turut meningkat dalam penanganan infeksi hewan dan pencegahan penyakit serta seringkali ditambahkan dalam pakan tambahan untuk ternak pedaging sebagai *growth promoter*. Konsumsi secara ekstensif ini akhirnya mengakibatkan semakin tingginya kasus resistensi antibiotik pada hewan <sup>[1]</sup>. Bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) merupakan salah satu bakteri patogen oportunistik yang berkaitan dengan infeksi nosokomial bersumber dari manusia serta penyebab dari penyakit hewan yang berpengaruh pada perekonomian yaitu mastitis pada sapi <sup>[2]</sup>. Saat ini resistensi bakteri tersebut sudah berkembang menjadi *Methicillin-Resistant S. aureus* (MRSA) semenjak ditemukannya metisilin dalam upaya penanggulangan resistensi *S. aureus* akibat penisilin di tahun 1960. Strain ini memiliki kemampuan untuk memproduksi reseptor *Penicillin-Binding Protein* (PBP) dengan afinitas yang berkurang <sup>[3]</sup>. Penyakit ini dapat timbul akibat kurangnya sanitasi, baik pada pemerah maupun kandang, yang menyebabkan bakteri-bakteri patogen mastitis berkembang biak secara masif <sup>[4]</sup>. *S. aureus* menjadi bakteri penyebab tertinggi mastitis, mencapai angka 67%, dibandingkan bakteri-bakteri patogen lainnya <sup>[5]</sup>. Meskipun insidensi mastitis pada sapi perah akibat MRSA masih terbilang rendah, hal tersebut tidak boleh dipandang sebelah mata mengingat sulitnya untuk menangani strain ini <sup>[6]</sup>. Penggunaan bahan alami sebagai alternatif antibiotik saat ini masih dikembangkan, salah satunya yaitu jintan hitam. Kandungan utama yang terkandung pada jintan hitam diketahui dan diuji memiliki aktivitas antibakteri yang sangat baik terhadap bakteri gram positif <sup>[7]</sup>.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji sifat antibakteri ekstrak jintan hitam terhadap bakteri MRSA secara *in silico* serta mengetahui zat aktif yang memiliki potensi antibakteri terbaik. Manfaat penelitian ini dalam upaya penemuan bahan aktif terbaru yang bersifat antibakteri dalam upaya mengganti penggunaan antibiotik dari penyakit akibat bakteri MRSA pada hewan sehingga dapat mengurangi resiko resistensi.

## 2. Materi dan Metode

### 2.1. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah laptop dengan

spesifikasi RAM 2GB dengan sistem operasi *Windows 10 Professional* 64-Bit, dan perangkat lunak (*software*) berupa *Yasara Structure*, *Discovery Studio*, dan *PyMol*. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah struktur protein target MRSA (PDB ID: 3VSL) yang diperoleh melalui laman *Protein Data Bank* (PDB) (<https://rcsb.org>) dan senyawa aktif jintan hitam.

### 2.2. Prosedur Penelitian

Sebanyak 5 mg sampel dalam 1 mL metanol diinjeksikan sebanyak 2.5  $\mu$ L ke sistem *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (LC–MS). Pengaturan MS dijalankan dan dioperasikan dengan mode ionisasi positif dan negatif. Sebanyak 300 data senyawa aktif jintan hitam disortir kembali dan didapatkan total 89 senyawa ligan uji yang tercatat dalam *database*. Struktur protein dalam bentuk 3D diunduh dari laman PDB (<https://rcsb.org>). Protein ini memiliki ligan alami berupa *cefotaxime* yang dapat diketahui melalui jurnal yang tercantum dalam laman protein.

Validasi dilakukan pada lokasi penambatan ligan alami yang telah dipreparasi dari reseptor. Ligan alami divalidasi dengan berbagai ukuran *gridbox* yang berbeda dari rentang 0,25–7 Å dengan interval 0,25 Å. Hasil validasi berupa file 'Validasi(n).log', akan otomatis muncul di *folder* yang berisi informasi mengenai *binding energy*, *dissoc. constant*, dan *contacting receptor residue*, serta file 'Validasi(n).yob'. Berbagai variasi ukuran *gridbox* dapat dicoba untuk mendapatkan nilai *binding energy* paling positif. Ukuran *gridbox* dapat digunakan ketika nilai *Root Mean Square Deviation* (RMSD) diperoleh kurang dari 2 Å. File 'Validasi(n).yob' terbaik kemudian dilakukan *superpose* untuk mengetahui nilai RMSD.

Seluruh file ligan uji digabungkan menjadi satu objek agar seluruh ligan dapat di-*docking* secara bersamaan. Pada halaman baru pada *Yasara Structure* dibuka file reseptor lalu besar *gridbox* diatur kemudian ligan alami. Selanjutnya ligan uji di-*docking* dan ligan uji terbaik dipilih berdasarkan nilai *binding energy* dan *dissoc. constant* terbaik dibandingkan ligan alami.

Sejumlah ligan uji dengan *binding energy* dan konstanta inhibisi terbaik diseleksi kembali berdasarkan aturan *Lipinski* melalui laman <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Kemudian dilakukan uji toksisitas senyawa aktif melalui laman [https://tox-new.charite.de/protox\\_II/](https://tox-new.charite.de/protox_II/).

### 2.3. Analisis Data

Analisis dilakukan dengan menganalisa ikatan kimia ligan uji dan reseptor melalui visualisasi 2D dan 3D menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio* dan *Pymol*. Ligan uji yang dianalisis merupakan ligan uji yang memiliki nilai *binding energy* dan konstanta disosiasi paling negatif serta lolos analisis Lipinski dan prediksi toksisitas.

## 3. Hasil

### 3.1. Identifikasi Senyawa Aktif *N. sativa* dengan LC–MS

Berdasarkan hasil LC–MS disortir kembali nama–nama senyawa yang tercatat pada situs

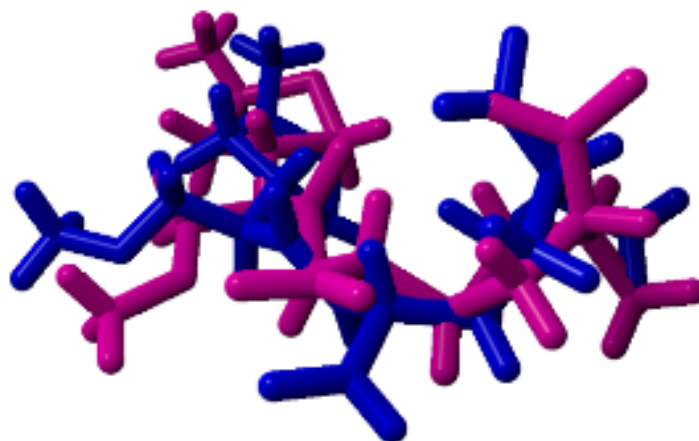
database molekul kimia dan tersisa 89 senyawa yang dapat digunakan. Senyawa tersebut dicari notasi *Simplified Molecular–Input Line–Entry System*–nya melalui situs *PubChem* dan *mzCloud* yang selanjutnya digunakan sebagai ligan uji *N. sativa*.

### 3.2. Validasi *Gridbox*

Berdasarkan validasi menggunakan aplikasi *Yasara Structure*, *gridbox* terbaik hasil penambatan ulang ligan alami dengan reseptor berada pada ukuran 4 Å dengan nilai *binding energy* -7,38 kkal/mol dan RMSD 1,44 Å (**Tabel 1**). Pose yang didapat dari penambatan ulang dapat dinilai baik ketika kemiripannya mendekati pose awal ligan alami (**Gambar 1**).

**Tabel 1.** Hasil validasi ligan alami

Gridbox (Å)	Binding Energy (kkal/mol)	RMSD (Å)	Gridbox (Å)	Binding Energy (kkal/mol)	RMSD (Å)
0,5	-7,039	2,64	4	-7,38	<b>1,44</b>
0,75	-7,009	2,64	4,25	-7,003	2,62
1	-7,35	1,46	4,5	-7,035	2,63
1,25	-7,026	2,62	4,75	-7,364	1,48
1,5	-7,028	2,62	5	-6,979	2,61
1,75	-7,36	1,5	5,25	-6,997	2,61
2	-7,029	2,63	5,5	-7,323	1,5
2,25	-7,036	2,64	5,75	-7,012	2,63
2,5	-7,363	1,511	6	-7,37	1,77
2,75	-7,032	2,63	6,25	-7,261	1,49
3	-6,998	2,63	6,5	-7,037	2,58
3,25	-7,352	1,52	6,75	-7,38	2,62
3,5	-7,006	2,62	7	-7,357	1,47



**Gambar 1.** Superimposisi validasi *gridbox* 4 *cefotaxime* (magenta) dengan hasil *redocking* (biru)

### 3.3. Virtual Screening Ligan Uji

Berdasarkan hasil dari *virtual screening* didapatkan 25 ligan uji yang memiliki nilai yang lebih baik dibandingkan ligan alami. *N1-(3-chlorophenyl)-2-[2-(trifluoromethyl)-4-quinolyl]hydrazine-1-carboxamide* merupakan ligan uji yang memiliki *binding energy* paling negatif serta konstanta disosiasi terkecil yaitu -8,855 dan 322.997,34 pM. Sedangkan *6-hydroxyflavone* memiliki *binding energy* serta konstanta disosiasi yang paling mendekati *cefotaxime* yaitu -7,403 dan 3.745.666 pM (**Tabel 2**).

### 3.4. Prediksi Bioavailabilitas dan Toksisitas Ligan Uji

Lima parameter Lipinski ini diantaranya bobot molekul  $\leq 500$  Da, nilai logP 0–5, donor hidrogen  $\leq 5$ , akseptor hidrogen  $\leq 10$ , dan nilai refraktivitas

molar 40-130<sup>[8]</sup>. Beberapa penelitian dengan target hewan juga masih menggunakan uji ini mengingat belum banyaknya perkembangan penelitian *in silico* pada hewan anjing, kuda, dan sapi<sup>[9][10][11]</sup>.

Ligan uji kemudian diuji toksisitasnya dengan parameter yang digunakan yaitu hepatotoksitas, karsinogenitas, toksisitas oral, dan imunotoksitas (**Tabel 4**).

### 3.5. Analisis Penambatan Molekular Ligan Uji– Reseptor

Seluruh ligan uji divisualisasi secara 2D dan 3D untuk diamati kembali interaksi antara ligan uji dan reseptor target. Parameter yang diamati adalah ikatan asam amino yang meliputi ikatan hidrogen dan ikatan hidrofilik yang akan menunjukkan nilai persentase *binding site similarity* (BSS) mengacu pada ligan alami (**Tabel 5**).

**Tabel 2.** Hasil penambatan molekular ligan pembanding dan ligan uji terhadap ligan alami

Nama	Binding Energy (kcal/mol)	Konstanta Disosiasi [pM]
<i>Cefotaxime</i> (Ligan Alami)	-7,38	3.893.931,25
<i>N1-(3-chlorophenyl)-2-[2-(trifluoromethyl)-4-quinolyl]hydrazine-1-carboxamide</i>	-8,855	322.997,34
D-Raffinose	-8,564	527.843
5-[(2R,4S,5R)-5-[1-Methyl-3-(2-thienyl)-1H-pyrazol-5-yl]-1-azabicyclo[2.2.2]oct-2-yl]methylamino]-5-oxopentanoic acid	-8,494	594.039,69
Curcumin	-8,49	598.063,75
3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-7-methoxy-1-benzofuran-5-yl]-3-hydroxypropyl hexopyranoside	-8,487	601.099,69
Triamterene	-8,481	607.217,94
2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole	-8,311	809.014,37
Adenosine	-8,232	924.408,62
1-[4-(dimethylamino)phenyl]-4-phenyldihydro-2,6(1H,3H)-pyridinedione	-8,003	1.360.577,25
$\alpha,\alpha$ -Trehalose	-7,927	1.546.792,12
D-(+)-Maltose	-7,927	1.546.792,12
Ethyl 4-[(6-methyl-3-pyridazinyl)oxy]benzoate	-7,87	1.702.995,5
Prolylleucine	-7,87	1.702.995,5
Kaempferol	-7,855	1.746.661,12
6-Amino-3-methyl-4-phenyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	-7,759	2.053.891,87
5-((2-methylallyl)oxy)-2-phenylbenzofuran-3-carboxylate	-7,742	2.113.677,75
$\alpha$ -Lactose	-7,718	2.201.055,5
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	-7,659	2.431.524
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	-7,654	2.452.130,75
Citrinin	-7,613	2.627.828,5
Nobiletin	-7,534	3.002.650,5
6-Hydroxyflavone	-7,403	3.745.666

**Tabel 3.** Hasil analisis Lipinski ligan uji dan ligan alami

No.	Nama	a	b	c	d	e
1.	Cefotaxime (Ligan Alami)	410	-2,443	1	10	82,717
2.	N1-(3-chlorophenyl)-2-[2-(trifluoromethyl)-4-quinolyl]hydrazine-1-carboxamide	380	4,28	3	5	91,04
3.	D-Raffinose	504	-7,416	11	16	94,7787
4.	5-[(2R,4S,5R)-5-[1-Methyl-3-(2-thienyl)-1H-pyrazol-5-yl]-1-azabicyclo[2.2.2]oct-2-yl)methylamino]-5-oxopentanoic acid	415	-0,13	2	6	101,947
5.	Curcumin	368	0	2	6	0
6.	3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-7-methoxy-1-benzofuran-5-yl]-3-hydroxypropyl hexopyranoside	504	1,025	5	11	115,22
7.	Triamterene	253	0	0	7	0
8.	2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole	294	3,19	1	3	78,095
9.	Adenosine	296	-2,497	4	9	58,483
10.	1-[4-(dimethylamino)phenyl]-4-phenyldihydro-2,6(1H,3H)-pyridinedione	308	3,081	0	3	83,985
11.	$\alpha,\alpha$ -Trehalose	342	-5,319	8	11	65,371
12.	D-(+)-Maltose	342	-5,319	8	11	65,371
13.	ethyl 4-[(6-methyl-3-pyridazinyl)oxy]benzoate	258	2,148	0	5	63,631
14.	Prolylleucine	228	-2,105	1	5	49,777
15.	Kaempferol	286	2,3053	4	6	72,3857
16.	6-Amino-3-methyl-4-phenyl-1,4-dihydropyran[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	252	2,329	1	4	65,046
17.	5-((2-methylallyl)oxy)-2-phenylbenzofuran-3-carboxylate	307	2,441	0	4	78,919
18.	$\alpha$ -Lactose	342	-5,319	8	11	65,371
19.	17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	332	-0,077	1	3	82,507
20.	Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	414	1,939	2	6	99,425
21.	Citrinin	251	0	1	5	0
22.	Nobiletin	402	6,297	0	8	88,433
23.	6-Hydroxyflavone	238	3,008	1	3	67,484

Keterangan : (a): Massa molekul (Da); (b): logP; (c): Ikatan donor hydrogen; (d): Ikatan akseptor donor; (e): Refraktivitas molar;  
■ : Tidak memenuhi syarat Lipinski

**Tabel 4.** Analisis prediksi toksisitas

Nama	H	K	Toksitas Oral	
			Kelas	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
<b>Cefotaxime (Ligan Alami)</b>	-	-	6	20000
N1-(3-chlorophenyl)-2-[2-(trifluoromethyl)-4-quinolyl]hydrazine-1-carboxamide	+	-	4	1096
5-[(2R,4S,5R)-5-[1-Methyl-3-(2-thienyl)-1H-pyrazol-5-yl]-1-azabicyclo[2.2.2]oct-2-yl)methylamino]-5-oxopentanoic acid	-	-	4	500
Curcumin	-	-	4	2000
3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-7-methoxy-1-benzofuran-5-yl]-3-hydroxypropyl hexopyranoside	-	-	5	5000
Triamterene	+	-	3	285
2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole	-	-	4	1600
Adenosine	-	-	2	8
1-[4-(dimethylamino)phenyl]-4-phenyldihydro-2,6(1H,3H)-pyridinedione	-	-	5	3000
Ethyl 4-[(6-methyl-3-pyridazinyl)oxy]benzoate	+	-	4	600
Prolylleucine	-	-	5	3000
Kaempferol	-	-	5	3919

**Tabel 4.** Analisis prediksi toksisitas (lanjutan)

Nama	H	K	Toksisitas Oral	
			Kelas	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
6-Amino-3-methyl-4-phenyl-1,4-dihydropyrano[2,3-c]pyrazole-5-carbonitrile	+	+	4	800
5-((2-methylallyl)oxy)-2-phenylbenzofuran-3-carboxylate	-	+	3	138
17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone	-	+	4	1860
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	-	-	5	4000
Citrinin	-	-	3	105
Nobiletin	-	-	5	5000
6-Hydroxyflavone	-	+	5	4000

Keterangan : H: Hepatotoksisitas; K: Karsinogenitas; I: Imunotoksisitas; (-): inaktif; (+): aktif;

■ : tidak memenuhi syarat toksisitas

**Tabel 5.** Hasil penambatan ligan uji

Nama	Jarak (Å)	Ikatan Asam Amino		BSS (%)
		Hidrogen	Hidrofobik	
<b>Cefotaxime (ligan alami)</b>	1,80	Asn450		100
		His447		
		Glu623		
		Gly620		
		Lys618	Pro660	
		Ser392		
		Ser429		
		Ser448		
Thr621				
5-[(2R,4S,5R)-5-[1-Methyl-3-(2-thienyl)-1H-pyrazol-5-yl]-1-azabicyclo[2.2.2]oct-2-yl]methylamino]-5-oxopentanoic acid	2,23	Thr621	Pro660	20
		Leu663	Pro661	
Curcumin	2,83	Ser392		30
		Ser448		
		Thr603	-	
		Thr621		
3-[2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-7-methoxy-1-benzofuran-5-yl]-3-hydroxypropyl hexopyranoside	2,83	Ser392	Thr603	30
		Ser448	Pro660	
		Thr619		
2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole	1,66 2,49	Ser392		40
		Ser448	Ser429	
		Lys618		
1-[4-(dimethylamino)phenyl]-4-phenyldihydro-2,6(1H,3H)-pyridinedione	2,24	Gly620		30
		Ser448	Pro660	
		Thr603		
Prolylleucine	2,24	Thr621		50
		Asn450		
		His447		
		Ser392		
		Ser448		
Kaempferol	2,24	Thr619		10
		Thr621		
		Thr603		
		Tyr636		

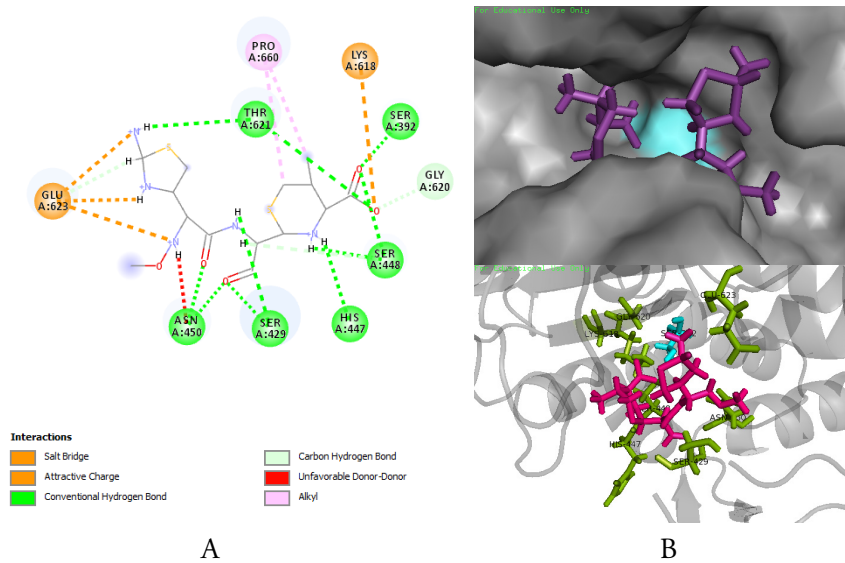
Tabel 5. Hasil penambatan ligan uji (lanjutan)

Nama	Jarak (Å)	Ikatan Asam Amino		BSS (%)
		Hidrogen	Hidrofobik	
Bis(4-ethylbenzylidene)sorbitol	2,22	Gly620	Pro660	40
		Ser392		
		Thr621		
Nobiletin		Gly620	-	20
		Ser634		
		Thr621		

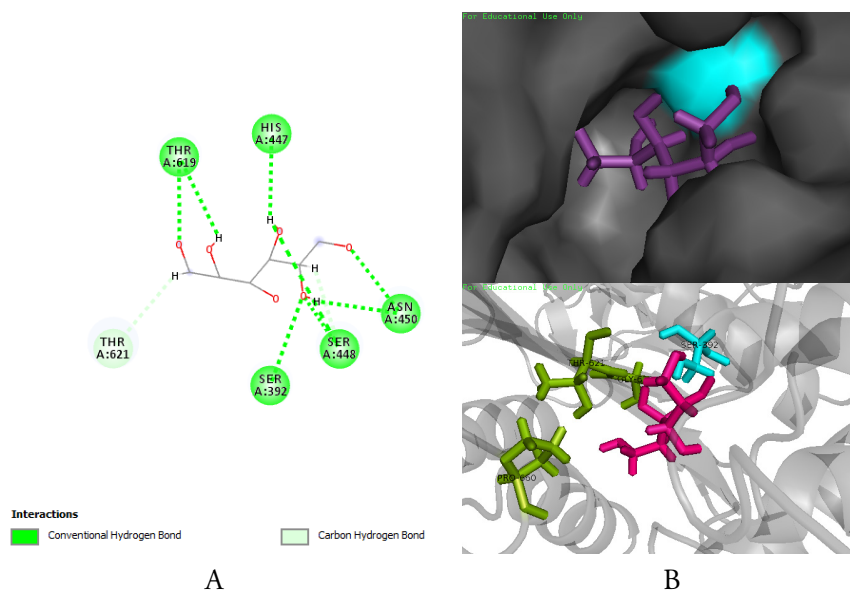
Keterangan : ■ : ikatan sesuai ligan alami; ■ : sisi aktif reseptor

Visualisasi antara ligan alami *cefotaxime* dan ligan uji *Prolylleucine* dengan dengan sisi aktif reseptor ditunjukkan pada gambar 2 dan 3. Ligan uji *Prolylleucine* menunjukkan persen BSS tertinggi

yaitu 50% dibandingkan ligan uji lainnya, dari total 6 ikatan yang terjadi, 5 diantaranya tertambat pada ikatan hidrogen yang sama dengan *cefotaxime* yaitu Asn450, His447, Ser392, Ser448, dan Thr621.



Gambar 2 Visualisasi ikatan *cefotaxime* dan reseptor; (A) 2D; (B) 3D  
Keterangan: ■ = sisi katalitik; ■ = *cefotaxime* ■ = asam amino



Gambar 3 Visualisasi ikatan *prolylleucine* dan reseptor; (A) 2D; (B) 3D  
Keterangan: ■ = sisi katalitik; ■ = ligan uji ■ = asam amino

#### 4. Pembahasan

Ukuran *gridbox* terbaik yang akan digunakan pada ligan uji dan ligan pembanding mengacu pada nilai *binding energy* paling negatif dan  $RMSD \leq 2 \text{ \AA}$ <sup>[12]</sup>. Ukuran *gridbox* ini nantinya akan menjadi area bagi ligan uji serta ligan pembanding dalam proses penambatan molekular<sup>[13]</sup>. Penambatan ulang ligan alami cefotaxime dilakukan pada reseptor target struktur kristal *Penicillin-Binding Protein 3* (PBP3) pada bakteri MRSA dengan parameter nilai RMSD terbaik. Nilai RMSD menggambarkan besarnya penyimpangan pose akibat perubahan interaksi antara ligan alami dengan reseptor setelah dilakukan penambatan ulang, semakin kecil nilai RMSD yang dihasilkan maka semakin minim perubahan pose yang terjadi<sup>[12]</sup>. Hal ini menunjukkan bahwa penambatan ulang pada ukuran *gridbox* memiliki pose yang paling mendekati ligan alami serta memiliki nilai *binding energy* terbaik, sehingga ukuran tersebut akan digunakan dalam proses penambatan ligan uji dan ligan pembanding.

Penapisan virtual atau *virtual screening* merupakan metode komputasional yang berfungsi mengidentifikasi senyawa aktif dalam bahan alami dengan potensi ikatan terbaik terhadap protein target yang umum dilakukan dalam pengembangan obat-obatan mengingat suatu bahan alami yang memiliki puluhan hingga ratusan senyawa aktif<sup>[14]</sup>. Ligan uji yang digunakan yakni diatas -7,38 kkal/mol dan 389.391,25 untuk dianalisa kekuatan ikatan yang (Tabel 2). Semakin negatif nilai yang dihasilkan, semakin kuat ikatan yang terjadi<sup>[15]</sup>. Konstanta disosiasi menggambarkan interaksi ligan terhadap suatu makromolekul dengan nilai yang semakin kecil maka ligan uji akan semakin mudah untuk berinteraksi dengan reseptor<sup>[16]</sup>.

Berdasarkan uji Lipinski yang telah dilakukan terdapat 4 senyawa yang melanggar lebih dari 2 aturan Lipinski sehingga senyawa tersebut tidak direkomendasikan untuk digunakan (Tabel 3). Ligan uji dengan bobot lebih dari 500 g/mol akan sulit untuk berdifusi menembus membran sel. Ketika nilai logP terlalu negatif, maka senyawa akan sulit untuk melewati membran lipid bilayer sedangkan nilai yang melebihi 5 akan cenderung meningkatkan toksisitas senyawa. Ikatan hidrogen akseptor > 5 serta donor > 10 akan menyebabkan semakin tingginya energi yang diperlukan dalam proses absorpsi sehingga ketiga ligan uji tersebut tidak ideal untuk digunakan lebih lanjut<sup>[17]</sup>. Nilai refraktivitas molar merupakan nilai total

polarisabilitas senyawa yang mempengaruhi aktivitas metabolisme senyawa agar dapat diekskresikan dari tubuh. Ketika nilai refraktivitas berada di bawah 40–130, maka terdapat kemungkinan tingginya toksisitas senyawa karena dapat menembus masuk ke dalam sel dan menyerang basa DNA<sup>[18]</sup>. Senyawa ligan uji *D-Raffinose*,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -*Trehalose*, *D-(+)-Maltose*, dan  $\alpha$ -*Lactose* melanggar 3 hingga 4 aturan Lipinski sehingga ke-empat senyawa tersebut tidak dapat diabsorpsi dengan baik di dalam tubuh.

Hepatotoksitas merupakan parameter uji toksisitas pada organ hati yang sering digunakan untuk mengobservasi efek xenobiotik seperti pada penelitian dan pengembangan obat-obatan<sup>[19]</sup>. Terdapat 4 ligan uji yang tercatat memiliki aktifitas hepatotoksik pada tubuh berdasarkan prediksi toksisitas. Sebanyak 5 ligan uji diprediksi memiliki aktifitas karsinogenitas terhadap tubuh. Karsinogen merupakan zat yang dapat menginduksi atau meningkatkan insidensi terbentuknya kanker maupun tumor baik jinak maupun ganas<sup>[20]</sup>. Toksisitas akut merupakan uji toksisitas sistemik yang mengevaluasi efek samping yang terjadi pada organisme dalam waktu 24 jam melalui rute oral, dermal, ataupun inhalasi. Uji ini dilakukan untuk mengetahui efek buruk yang mungkin terjadi sehingga hasil uji ini digunakan untuk mengetahui dosis yang tepat digunakan jangka panjang. LD<sub>50</sub> dapat diklasifikasikan menjadi kelas 1 (amat sangat toksik), kelas 2 (sangat toksik), kelas 3 (toksik), kelas 4 (sedikit toksik), kelas 5 (non-toksik), dan kelas 6 aman<sup>[21]</sup>. *Cefotaxime* yang merupakan ligan alami sekaligus antibiotik golongan beta-laktam memiliki LD<sub>50</sub> yang baik yaitu 20.000 mg/kg. Senyawa aktif yang dapat lolos menjadi kandidat obat harus berada pada kelas 4 dan 5 yang memiliki sifat sedikit toksik serta non-toksik. 4 ligan uji yang tidak lolos uji toksisitas akut yaitu *adenosin* yang berada di kelas 2 serta *triamterene*, *5-((2-methylallyl)oxy)-2-phenylbenzofuran-3-carboxylate*, dan *citritin* yang berada pada kelas 3. Sehingga total hanya 9 ligan uji yang memenuhi syarat keamanan senyawa aktif (Tabel 4)<sup>[22]</sup>.

Analisa BSS dilakukan untuk mengamati ketepatan interaksi ligan uji dengan ligan alami. Persentase BSS dapat menjadi gambaran efisiensi ligan uji sebagai inhibitor dengan mengacu pada daerah penambatan pada *cefotaxime*<sup>[23][24][25]</sup>. Prolylleucine merupakan ligan uji dengan BSS tertinggi yang berinteraksi pada total 6 asam amino yang yakni Asn450, His447, Ser392, Ser448,



Thr619, dan Thr621 dengan 5 interaksi asam amino yang sama dengan *cefotaxime*. 2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole dan Bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol merupakan 2 ligan uji dengan persen BSS tertinggi ke-2 yaitu 40%. Ligan uji 2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole memiliki total 5 interaksi asam amino pada Ser392, Ser448, Lys618, Gly620, dan Ser429 dengan 4 interaksi asam amino yang sama dengan *cefotaxime*. Bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol memiliki total 4 interaksi asam amino yakni Gly620, Ser392, Thr621, dan Pro660 dengan seluruh interaksi yang terjadi memiliki kesamaan dengan *cefotaxime*.

*Cefotaxime* sebagai ligan alami tertambat pada total 10 ikatan asam amino meliputi Asn450, His447, Glu623, Gly620, Lys618, Ser392, Ser429, Ser448, dan Thr621 yang merupakan ikatan hidrogen serta Pro660 yang merupakan ikatan hidrofobik. Pada Glu623 dan Lys618 terjadi pembentukan jembatan garam yang juga termasuk kedalam ikatan hidrogen yang berfungsi dalam menjaga kestabilan interaksi asam amino dan protein [26][27]. PBP3 memiliki situs katalitik berupa Ser392 yang merupakan sisi penting dalam proses perusakan dinding sel bakteri [28][29]. Ketiga ligan uji yang berikatan ada sisi katalitik reseptor memiliki jarak < 2,5 Å yang menandakan terjadinya interaksi kuat terhadap reseptor [30]. Ligan uji Bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol menunjukkan adanya ikatan hidrofobik yang sama dengan ligan alami yaitu Pro660. Ikatan hidrofobik berfungsi untuk mempertahankan konformasi pada ikatan ligan dan reseptor, dengan adanya kedua ikatan tersebut maka interaksi yang terjadi dapat dikatakan cukup kuat [31]. Hasil visualisasi menunjukkan adanya ikatan *unfavorable donor* pada *cefotaxime* dan ligan uji 2-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole terhadap Ser392 sebanyak masing-masing 2 dan 1 kali yang menandakan interaksi serta penambahan kurang baik antara reseptor dan ligan. Tetapi jika interaksi tersebut hanya terjadi sebanyak 1 atau 2 kali maka interaksi masih dikatakan baik [32]. Ligan uji *prolylleucine* dan Bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol tidak menunjukkan adanya ikatan *unfavorable donor* terhadap reseptor.

Jintan hitam sejak lama dikenal memiliki aktivitas antibakteri yang baik. Penelitian terdahulu juga melaporkan hasil pengujian *in vitro* dan *in vivo* sifat antibakteri ekstrak metanol jintan hitam terhadap mastitis sapi pada tahun 2010 hingga 2011. Sapi diinjeksi pada bagian ambingnya, serta untuk uji *in vitro* sampel bakteri dikoleksi

dari ambing terinfeksi. Hasilnya menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap bakteri [33]. Penelitian lain yang menggunakan minyak jintan hitam dengan hasil yang menunjukkan tingginya sensitivitas bakteri MRSA terhadap minyak jintan hitam [34]. Penelitian terdahulu juga melaporkan pengujian *in vitro* ekstrak jintan hitam yang disuplementasikan pada kelinci yang diinduksi oleh bakteri MRSA menunjukkan aktivitas bakterisidal terhadap bakteri [35].

## 5. Kesimpulan

Sebanyak 10 senyawa aktif dari total 89 senyawa hasil skrining dengan menggunakan instrumen LC-MS menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap MRSA yang jauh lebih baik dibandingkan *cefotaxime* secara *in silico* serta lolos dalam aturan Lipinski dan prediksi toksisitas. Berdasarkan interaksi asam amino dan reseptornya, 3 ligan uji (2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-4,5,6,7-tetramethyl-1H-benzimidazole, *prolylleucine*, dan Bis(4-ethylbenzylidene) sorbitol menjadi kandidat senyawa aktif antibakteri terbaik.

## Daftar Pustaka

- [1] Xie, W.Y., Shen, Q., & Zhao, F.J. 2018. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science* 69:181–195.
- [2] Paterson, G.K., Harrison, E.M., Craven, E.F., Petersen, A., Larsen, A.R., Ellington, M.J., Torok, M.E., Peacock, S.J., Parkhill, J., & Zadoks, R.N. 2013. Incidence and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) from nasal colonisation in participants attending a cattle veterinary conference in the UK. *Plos One*. 8(7): e68463.
- [3] Nandhini, P., Kumar, P., Mickymaray, S., Alothaim, A.S., Somasundaram, J., & Rajan, M. 2022. Recent development in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) treatment: a review. *Antibiotic* 11(5):606–627.
- [4] Surjowardojo, P., Susilorini, T.E., & Sirait, G.R.B. 2015. Daya hambat dekok kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas* sp. penyebab mastitis pada sapi perah. *Jurnal Ternak Tropika* 16(2):40–48.
- [5] Astriyani, W., Surjowardojo, P., & Susilorini, T.E. 2017. Daya hambat ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa* L.) dengan pelarut etanol dan aquades terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis pada sapi perah. *Jurnal Ternak Tropika* 18(2):8–13.
- [6] Weese, J.S. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals. *ILAR journal* 51(3):233–244.
- [7] Anggono, F.D., & Kuswandari S. 2017. comparison of antibacterial activity inhibitory of black cumin (*Nigella sativa*) oil, cresophene, and calcium hydroxide. *Padjajaran Journal of Dentistry* 29(1):38–43.

- [8] **Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., & Feeney, P.J.** 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64:4–17.
- [9] **Zheng, C., Pei, T., Huang, C., Chen, X., Bai, Y., Xue, J., Wu, Z., Mu, J., Li, Y., & Wang, Y.** 2016. A novel systems pharmacology platform to dissect action mechanisms of traditional Chinese medicines for bovine viral diarrhoea. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 94:33–45.
- [10] **Khusro, A., Aarti, C., Salem, A.Z.M., Pliego, A.B., & Rivas-Caceres, R.R.** 2020. Methyl-coenzyme M reductase (MCR) receptor as potential drug target for inhibiting methanogenesis in horses using *Moringa oleifera* L: an *in silico* docking study. *Journal of Equine Veterinary Science* 91:103149.
- [11] **Ramakrishnan, V., Ravikumar, P., Raja, T., Vijayarani, K., Arivuchelva, A., Parthiban, M., Thangapandian, M., & Preetha, S.P.** 2021. *In silico* evaluation of phytochemicals from Indian medicinal plants for canine mammary tumours. *The Journal of Phytopharmacology* 10(2):80–83.
- [12] **Rena, S.R., Nurhidayah, & Rustan.** 2022. Analisis *molecular docking* senyawa *Garcinia mangostana* L sebagai kandidat anti SARS-Cov-2. *Jurnal Fisika Unand* 11(1):82–88.
- [13] **Hasan, R., Fanah, F.C., & Bahi, R.R.R.** 2022. *Docking* molekuler senyawa potensial daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap reseptor folat. *Journal of Innovation Research and Knowledge* 2(2):519–527.
- [14] **Morya, V.K., Dewaker, V., & Kim, E.K.** 2012. In silico study and validation of phosphotransacetylase (PTA) as a putative drug target for *Staphylococcus aureus* by homology-based modelling and virtual screening. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 168(7):1792–1805.
- [15] **Sharma, J., Bhardwaj, V.K., Singh, R., Rajendran, V., Purohit, R., Kumar, S.** 2021. An in-silico evaluation of different bioactive molecules of tea for their inhibition potency against non-structural protein-15 of SARS-CoV-2. *Food Chemistry* 346:128933
- [16] **Wulandari D.** 2018. Esterifikasi komponen minyak serih wangi dan perbandingan tipe aromanya [skripsi]. Malang: Universitas Brawijaya.
- [17] **Naufa, F., Mutiah, R., & Indrawijaya, Y.Y.A.** 2021. Studi *in silico* potensi senyawa katekin teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai antivirus SARS CoV-2 terhadap *spike glycoprotein* (6LZG) dan *Main Protease* (5R7Y). *Journal of Food and Pharmaceutical Sciences* 10(1):584–596.
- [18] **Kelutur, F.J., Mustarichie, R., & Umar, A.K.** 2020. *Virtual screening* kandungan senyawa kipas laut (*Gorgonia virens*) sebagai anti-asma. *Jurnal Penelitian Kimia* 16(2):48.
- [19] **Bassan, A., Alves, V.M., Amberg, A., Anger, L.T., Auerbach, S., Beilke, L., Bender, A., Cronin, M.T.D., & Cross, K.P.** 2021. In silico approaches in organ toxicity hazard assessment: current status and future needs in predicting liver toxicity. *Journal Pre-proofs* 20:100187.
- [20] **Singgih, M., Permana, B., Maulidya, S.A.I., & Yuliana, A.** 2019. Studi *in silico* metabolit sekunder kapang *Monascus* sp. sebagai kandidat obat antikolesterol dan antikanker. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* 15(1):104–123.
- [21] **Erhirhie, E.O., Ihekwereme, C.P., & Ilodigwe, E.E.** 2018. Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology* 11(1):5–12.
- [22] **Nursanti, O., Wardani, I., & Hadisoebroto, G.** 2022. Validasi penambatan molekuler (*docking*) *Zingiber Officinale* dan *Cymbopogon citratus* sebagai ligan aktif reseptor *Pparγ*. *Jurnal Farmasi Higea*. 14(1):79–95.
- [23] **Ehrt, C., Brinkjost, T., & Koch, O.** 2019. Binding site characterization – similarity, promiscuity, and druggability. *MedChemComm*. 10(7):1145–1159.
- [24] **Ferdian, P.R.** 2016. Potensi senyawa asam lemak rantai pendek sebagai aktivator langsung ampk secara *in silico* untuk terapi sindrom metabolik [tesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [25] **Fakhruri, M., Rahmayanti, Y., & Isfanda.** 2021. Potensi fitokimia *Citrus aurantium* (*hesperetin, naringenin*) dalam menghambat *xantin oksidase* pada hiperurisemia secara *in silico*. *Jurnal Health Sains*. 2(1):79–90.
- [26] **Bosshard, H.R., Marti, D.N., & Jelesarov I.** 2004. Protein stabilization by salt bridges: concepts, experimental approaches and clarification of some misunderstandings. *Journal of Molecular Recognition* 17:1–16.
- [27] **Duart, G., Lamb, J., Ortiz-Mateu, J., & Elofsson A.** 2022. Intra-helical salt bridge contribution to membrane protein insertion. *Journal of Molecular Biology* 5(15):1–16.
- [28] **Yoshida, H., Kawai, F., Obayashi, E., Akashi, S., Roper, D.I., Tame, J.R.H., & Park, S.Y.** 2012. Crystal structure of Penicillin-Binding Protein 3 (PBP3) from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the apo and cefotaxime-bound forms. *Journal of Molecular Biology* 423:351–364.
- [29] **Sinurat, M.R., Rahmayanti, Y., & Rizarullah.** 2021. Uji aktivitas antidiabetes senyawa baru daun yakon (*Smallanthus sonchifolius*) sebagai inhibitor enzim DPP-4: studi *in silico*. *Jurnal IPA dan Pembelajaran IPA* 5(2):138–150.
- [30] **Handayani SDP.** 2022. Hubungan struktur dan aktivitas senyawa biflavonoid genus *Araucaria* sebagai inhibitor enzim  $\alpha$ -glukosidasa secara *in silico* [skripsi]. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- [31] **Ummah, K., Mahardika, R.G., & Mardilyah, A.** 2020. Sintesis senyawa vanili metil keton dan uji aktivitas antiinflamasi terhadap enzim COX-1 dan COX-2 melalui analisis *in silico*. *Alchemy: Journal of Chemistry* 8(2):1–11.
- [32] **Zainab, B., Ayaz, Z., Alwahibi, M.S., Khan, S., Rizwana, H., Soliman, D.W., Alawaad, A., & Abbasi, A.M.** 2020. In-silico elucidation of *Moringa oleifera* phytochemicals against diabetes mellitus. *Saudi Journal of Biological Science* 27(9):2299–2307.

- [33] **Foroufanzhar, F., Bazzaz, B.S.F., & Hosseinzadeh, H.** 2014. Black cumin (*Nigella sativa*) and its constituent (thymoquinone): a review on antimicrobial effects. Iranian Journal of Basic Medical Sciences 17(12):929–939.
- [34] **Othman, B.R., Kuan, C.H., Mohammed, A.S., Cheah, Y.K., Tan, C.W., New, C.Y., Thung, T.Y., Chang, W.S., Loo, Y.Y., & Nakaguchi, Y.** 2018. Occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in raw shellfish at retail markets in Malaysia and antibacterial efficacies of black seed (*Nigella sativa*) oil against MRSA. Food Control 90:324–331.
- [35] **Elmowalid, G.A.E., Ahmad, A.A.M., El-Hamid, M.I.A., Ibrahim, D., Wahda, .A., El-Oksh, A.S.A., Yonis, A.E., Elkady, M.A., & Ismail, T.A., & Alkhedaide, A.Q.** 2022. *Nigella sativa* extract potentially inhibited methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* induced infection in rabbits: potential immunomodulatory and growth promoting properties. Animals 12(19):1–17.