

UJI AKTIVITAS ANTI BAKTERI DAUN GANDARUSA (*Justicia Gendarussa* Burmf) TERHADAP BAKTERI *ESCHERICHIA COLI* DAN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Eka Anggie Amalia¹, Rollando², Muhammad Hilmi Afthoni³, Yurida Ekawati⁴

Universitas Ma Chung, Universitas Ma Chung, Universitas Ma Chung

Email Korespondensi : 611810011@student.machung.ac.id, ro.llando@machung.ac.id, muhammad.hilmi@machung.ac.id,
yurida.ekawati@machung.ac.id

Abstrak

Perkembangan dalam pengobatan tradisional semakin marak dan banyak digunakan untuk pengobatan berbagai penyakit terutama untuk antibakteri. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri Daun Gandarusa (*Justicia Gendarussa* Burmf) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

Pada penelitian ini bersifat eksperimental. Tahap penelitian diawali dengan ekstraksi dengan pelarut metanol dan fraksinasi dengan pelarut N-heksan pada Daun Gandarusa sehingga menghasilkan 2 fraksi yaitu fraksi metanol dan N-heksan, uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *disc difusi* untuk pengukuran daya hambat dengan konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm serta kontrol negatif menggunakan aquades dan kontrol positif menggunakan *ampicillin*. Selanjutnya, dilakukan pengujian makrodilusi untuk penentuan nilai KHM dan KBM. Senyawa yang memiliki aktivitas tinggi diuji dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)*. Hasil GC-MS kemudian dilakukan pengujian secara *In Silico* untuk mengetahui senyawa tersebut berikatan dengan protein yang digunakan.

Hasil pengujian yang dilakukan secara *in vitro* dan *in silico* memiliki aktivitas yang baik sebagai antibakteri. Secara *in vitro* dapat dilihat dari zona hambat/zona bening yang terbentuk serta melalui nilai KHM dan KBM. Untuk uji *in silico* dilihat berdasarkan nilai kekuatan interaksi yang terjadi

Kata kunci: Antibakteri, Daun Gandarusa, *Escherichia coli*, *In Vitro*, *In Silico*, KHM, KBM, *Staphylococcus aureus*

Abstract

Developments in traditional medicine are increasingly widespread and are widely used for the treatment of various diseases, especially for antibacterial. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of Gandarusa (Justicia Gendarussa Burmf) leaves against Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria.

This research is experimental. The research phase began with extraction with Methanol solvent and fractionation with N-hexane solvent on Gandarusa Leaf to produce 2 fractions, namely methanol and N-hexane fractions, antibacterial activity test was carried out by disc diffusion method for measuring inhibitory power with a concentration of 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62.5 ppm and negative control using distilled water. For the positive control, the research used ampicillin. Next, a macrodilution test was carried out to determine the MIC and MBC values. Compounds with high activity were tested by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). The results of the GC-MS test were then carried out in Silico to determine whether the compound was bound to the protein used.

The results of tests carried out in vitro and in silico have good activity as antibacterial. In vitro can be seen from the inhibition zone / clear zone formed as well as through

of MIC and MBC. For the in silico test, it is seen based on the value of the strength of the interaction that occurs.

Keywords: Antibacterial, Gandarusa Leaf, *Escherichia coli*, *In Vitro*, *In Silico*, MBC, MIC, *Staphylococcus aureus*.

I. PENDAHULUAN

Perkembangan pengobatan yang semakin berkembang telah melahirkan berbagai macam obat baru. Penggunaan obat tradisional digunakan sebagai pengobatan alternatif dalam mengatasi masalah kesehatan, pencegahan, dan penyembuhan pada suatu penyakit. Penelitian diperuntukkan mencari metabolit sekunder yang dapat dimanfaatkan dalam berbagai macam bahan obat. Dengan mempelajari suatu aktivitas senyawa antibakteri merupakan langkah awal dalam menentukan fungsi dari senyawa tersebut. Adanya senyawa antibakteri di sektor kesehatan menjadikannya bahan penting dalam pengobatan penyakit yang diakibatkan oleh bakteri (Oeiyoano dkk, 2019).

Antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan atau menyebabkan kematian bakteri dengan mekanisme kerja untuk mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan manusia (Nuria dkk, 2010). Bakteri adalah mikroba yang bisa mengganggu dan menyerang pada kehidupan manusia. Pada daerah tropis seperti di Indonesia, penyakit yang diakibatkan oleh bakteri patogen memiliki tingkatan tinggi dalam urutan penyakit yang banyak dijangkit oleh masyarakat. Beragam penyakit infeksi juga disebabkan oleh bakteri dan bahkan beberapanya mengakibatkan gangguan kesehatan serius hingga kematian. Penyakit yang diakibatkan bakteri terjadi dengan berbagai macam cara karena bakteri sendiri dapat mengontaminasi makanan, minuman, udara, dan masih banyak lagi (Hidayati, 2016).

Daun Gandarusa adalah tanaman obat yang digunakan turun-temurun oleh masyarakat untuk pengobatan yang sering digunakan sebagai pengobatan memar kulit, bengkak, sakit pinggang, nyeri sendi, sakit kepala, *bronchitis*, *dyspepsia*, penyakit mata, demam, hemiplegia, sakit telinga, nyeri otot, gangguan pemapasan dan masalah pencernaan. Daun Gandarusa dimungkinkan dapat dimanfaatkan untuk pengobatan antibakteri karena memiliki suatu senyawa aktif yang bersifat antibakteri (Chandra & Lo, 2021)

Pengujian antibakteri pada Daun Gandarusa dilakukan secara *in vitro* dan *in silico* agar dapat ditentukan zat antibakterinya. Pengujian antibakteri dapat diketahui aktivitasnya melalui nilai KHM dan KBM, untuk pengujian *in silico* dilakukan dengan cara melakukan

molekuler docking dengan metode ini akan memprediksi aktivitas pada sel target. Senyawa – senyawa aktif dari daun yang diperoleh dari hasil penelitian nantinya akan bermanfaat untuk bidang farmasi, pangan, dan bidang industri. Sehubungan dengan daun Gandarusa untuk antibakteri. Oleh sebab itu, penulis melakukan penelitian dengan judul “Uji Aktivitas Antibakteri Daun Gandarusa (*Justicia Gendarussa Burm.f*) Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif”.

II. MATERIAL DAN METODE PENELITIAN

A. Material

Beaker Glass (Pyrex), Toples Kaca, Gelas Ukur (Pyrex), *Vacuum Rotary Evaporator* (IKA Rotary Evaporator), *Waterbath* (Memmert), Corong Pisah (Pyrex), Erlenmeyer (Pyrex), Autoklaf, Batang pengaduk, Kawat ose, Labu ukur 10 ml (Pyrex), Labu ukur 250 ml (Pyrex), Kertas cakram, Pinset, Bunsen, Mikropipet, *White tip* dan *blue tip*, tabung *eppendorf*, Neraca analitik (Ohaus), Spektrofotometri UV-Vis (Jasco V760), *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) (Shimadzu, GCMS QP2010 Plus). Metanol, Petroleum Eter, N-heksan, *Nutrient Agar* (Oxoid), *Nutrient Broth* (Merck), *Mueller Hinton Broth*, DMSO 0,2 % (Emsure), Bakteri *Escherichia Coli*, Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Disc Ampicilin* 10 µg (Oxoid), Aquades.

Perangkat keras personal computer dengan spesifikasi Windows 10 pro, AMD Ryzen™ 5 3500U, Mobile Processor (4C/8T, 6MB cache, 3.7GHz Boost), Radeon™ Vega 8 Integrated Graphics with R5 processor, memori 8GB / 16GB 2400MHz DDR4.

B. Metode Penelitian

1. Jenis Penelitian

Metode penelitian yang dilakukan adalah metode eksperimental laboratorium. Metode Eksperimental adalah metode yang dikerjakan dengan seluruh cara ilmiah yang akan mendapatkan suatu data tertentu, dengan kegunaan dan tujuan tertentu. Pada penelitian ini ditujukan untuk menemukan kandungan senyawa dan aktivitas antibakterinya.

2. Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan Daun Gandarusa yang diperoleh dari Kabupaten Bantul, Daerah Istimewa Yogyakarta, Indonesia. Sampel yang digunakan adalah hasil fraksinasi dari Daun Gandarusa dengan berbagai macam konsentrasi yang akan diberikan terhadap biakan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.

3. Metode Kerja

a. Determinasi Tanaman

Determinasi adalah proses membandingkan suatu tumbuhan dengan satu tumbuhan lain yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan atau dipersamakan), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan yang akan diteliti. Determinasi Tanaman ini dilakukan di Balai Materia Medika Batu.

b. Persiapan Tanaman

Sebelum dilakukan ekstraksi Daun Gandarusa terlebih dahulu dikeringkan dengan menggunakan oven pada

suhu 50°C sampai kering. Kemudian setelah daun kering dipisahkan antara batang dan daun yang ada. Setelah proses pemisahan dilakukan proses penyerbukan pada daun

c. Proses Ekstraksi

Pada proses ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi dengan perbandingan 1:4 yaitu serbuk:pelarut. Pelarut yang digunakan pada saat proses ekstraksi adalah metanol. Serbuk Daun Gandarusa ditimbang sebanyak 250 g kemudian dilarutkan dengan 1 liter metanol didalam toples kaca. Setelah pencampuran serbuk dan pelarut diaduk selama 1 jam kemudian dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam kemudian hasil maserasi disaring menggunakan kain saring. Proses maserasi di ulang sebanyak 2 kali dengan menggunakan serbuk yang sebelumnya sudah disaring.

d. Proses Pemisahan Klorofil

Dengan adanya klorofil dapat mengganggu pada proses analisis, sehingga perlu dilakukan pemisahan klorofil. Pada proses ini hampir mirip dengan proses fraksinasi. Untuk pemisahan ini menggunakan perbandingan 1:3 yaitu ekstrak:pelarut. Pelarut yang digunakan dalam proses pemisahan klorofil menggunakan *petroleum eter*. Hasil dari maserasi diambil sebanyak 100 ml kemudian ditambahkan dengan *petroleum eter* sebanyak 300 ml didalam corong pisah, lalu dikocok selama 30 menit. Setelah dikocok ditunggu hingga terjadi 2 fase atau terjadi pemisahan. Proses ini dilakukan secara berulang hingga warna pelarut *petroleum eter* berwarna bening. Hal ini menandakan bahwa ekstrak yang didapatkan sudah tidak memiliki klorofil.

e. Fraksinasi

Ekstrak yang telah dipisahkan klorofilnya dilakukan proses fraksinasi kembali. Pada proses fraksinasi ini menggunakan pelarut n-heksane dengan perbandingan 1:3 yaitu ekstrak tanpa klorofil:n-heksane. Proses ini dilakukan didalam corong pisah, kemudian ekstrak dan pelarut dikocok selama 30 menit, dibiarkan hingga memisah atau terjadi 2 fase. Setelah itu dipisahkan antara fraksi n-heksane dengan fraksi ekstrak. Pada masing-masing fraksi dilakukan proses evaporasi menggunakan *Vacuum Rotary Evaporator* hingga mengental, lalu diuapkan dengan *waterbath* hingga menjadi ekstrak kering pada tiap fraksi.

f. Pembuatan Media

Untuk pembuatan media padat diperlukan 28 gram *nutrient agar* kemudian dilarutkan dalam aquades sebanyak 1 liter, lalu dipanaskan sampai bahan larut sempurna (Bridson, 2006). Pembuatan media cair diperlukan 13 gram *nutrient broth* kemudian dilarutkan dalam aquades sebanyak 1 liter, diaduk hingga larut. Sedangkan untuk *Mueller Hinton Broth* dibutuhkan 21 gram yang dilarutkan dalam 1 liter air (Bridson, 2006).

g. Proses Sterilisasi

Cawan petri, tabung reaksi, vial, tip, wadah dibuat yang telah dicuci bersih dan dikeringkan kemudian dibungkus menggunakan kertas, kertas cakram dimasukan kedalam cawan petri bersih dan media yang telah dibuat dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sterilisasi semua alat dan bahan yang

akan digunakan disimpan didalam *Laminar Air Flow* yang sebelumnya telah dilakukan sterilisasi dengan alkohol 70%.

h. Pembiakan Bakteri

Proses pembiakan bakteri menggunakan metode *streak plate* yaitu dengan menuangkan media *nutrient agar* pada cawan petri kemudian menyentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri lalu digoreskan kawat ose diatas permukaan lempeng *nutrient agar* secara zig-zag sampai setengah permukaan agar, putar cawan petri dan oles kembali pada permukaan agar yang kosong.

Pembiakan bakteri juga menggunakan metode biakan cair menggunakan media *nutrient broth* dengan cara menyentuhkan ujung kawat ose pada koloni bakteri kemudian dicelupkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi media *nutrient broth*.

i. Pembuatan Konsentrasi Larutan Uji

Ekstrak yang terbagi dalam 2 fraksi yaitu fraksi metanol dan fraksi n-hexane dibuat dalam konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm. Larutan baku induk dibuat dengan menimbang ekstrak sebanyak 200 mg dengan menggunakan larutan DMSO 0,2% dalam labu ukur 10 ml. Kemudian pada larutan baku induk diencerkan hingga didapatkan konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm pada tiap fraksi metanol dan fraksi n-hexane.

j. Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif pada percobaan ini menggunakan *disc Ampicillin* 10 µg, sedangkan untuk kontrol negatif menggunakan aquades dengan volume pada kertas disc sebanyak 8 µL.

k. Prosedur Pengujian Antibakteri

- Metode Disc Diffusion
Disiapkan cawan petri sebagai tempat uji aktivitas antibakteri, kemudian pada gelas ukur dituangkan 9 ml *Nutrient Agar* dan ditambahkan 1 ml biakan bakteri yang telah disuspensikan dalam media *Nutrient Broth*. Media yang sudah tercampur dengan bakteri dituang kedalam cawan petri ditunggu hingga mengeras. Disiapkan larutan yang akan diujikan dengan berbagai macam konsentrasi (1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm) dan disiapkan kertas cakram yang digunakan. Kertas cakram ditetesi dengan larutan yang akan diujikan sebanyak 8 µl dan ditempelkan pada media agar. Langkah berikutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Aktivitas antibakteri terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening yang dibentuk dari tiap konsentrasi
- Metode Makrodilusi
Pada penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan metode makrodilusi. Metode makrodilusi yang dilakukan membuat seri konsentrasi larutan uji 1000 dan 2000 mg/L dengan menggunakan pelarut DMSO 0,2% (Tabel 3.1). Kemudian dilakukan pengenceran dengan menggunakan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) steril dengan konsentrasi tertentu. Dilakukan pencampuran larutan dalam tabung Eppendorf yang terdiri dari 250 µL larutan uji; 250 µL suspensi bakteri dengan kekeruhan setara dengan standar

McFarland 0,5; dan 1 ml media MHB. Sedangkan untuk kontrol positif menggunakan 250 µL larutan *ampicillin* 10 mg/mL; 250 µL suspensi bakteri; dan 1 ml media MHB. Untuk kontrol negatif menggunakan 250 µL DMSO 0,2%; 250 µL suspensi bakteri; dan 1 ml media MHB. Hasil dari pengujian diamati setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penentuan nilai KHM dapat ditunjukkan sebagai konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan larutan yang berwarna jernih. Untuk penentuan KBM dilakukan dengan mengambil cairan pada tabung Eppendorf menggunakan kawat ose dan di streak diatas media NA dalam cawan petri. Kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Nilai KBM ditentukan dengan tidak tumbuhnya bakteri yang ada dalam cawan petri.

l. Pengujian GC-MS

Setelah dilakukan pengujian antibakteri, dapat diketahui fraksi yang aktif sebagai antibakteri. Fraksi tersebut dilakukan uji dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)* untuk mengetahui senyawa apa yang terdapat didalam fraksi tersebut

m. Pengujian In Silico

Senyawa yang diperoleh dari hasil GC-MS kemudian dilakukan proses molekuler docking. Setelah didapatkan beberapa senyawa maka dilakukan pencarian dan pengunduhan struktur dari senyawa hasil GC-MS pada <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Pada website Pubchem tersebut terdapat informasi tentang struktur yang dicari, kemudian terdapat SMILES (*Simplified Molecular Input Life Entry System*) dan mengunduh struktur yang akan digunakan saat molekuler docking. Struktur senyawa yang diunduh dalam bentuk 3D dengan format sdf.

Pada molekuler docking, protein yang akan digunakan diunduh melalui program PDB pada <https://www.rcsb.org/> dengan format pengunduhan .pdb, kemudian dilakukan proses kontrol terhadap protein yang digunakan dengan menggunakan aplikasi PyMol. Dalam aplikasi PyMol ini dilakukan kontrol pemilihan protein dan menghilangkan molekul air dalam protein lalu save bagian protein yang tidak memiliki *missing residu*. Proses selanjutnya adalah proses docking dengan menggunakan aplikasi Pyrx. Pada Langkah awal dalam melakukan proses docking adalah memasukan protein yang telah dipreparasi sebelumnya, kemudian klik kanan pilih *autodock* dan pilih *make to makromolekul*. Setelah itu dimasukkan senyawa dan kontrol yang akan digunakan dengan mengklik *open babel* lalu masukan senyawa yang akan digunakan, klik kanan pilih *minimize all* kemudian klik kanan lagi pilih *convert all to autodock pdbqt*. Kemudian klik *vina wizard* dimasukkan protein dan ligan yang akan digunakan, klik forward kemudian atur ukuran kotak pada ligan yang digunakan. Pilih *exhaustives* 16 kemudian di save dengan format *pdbqt*. Interaksi yang dihasilkan dapat dilihat pada table setelah selesai dilakukan proses docking. Setelah itu dipilih nilai ΔG yang memiliki nilai terkecil pada setiap interaksi. Apabila nilai ΔG semakin kecil maka

semakin stabil dan semakin kuat ikatan yang terjadi antara ligan dan reseptor, kemudian di save dengan format pdb. Hasil dari docking pada aplikasi Pyrx dilakukan preparasi menggunakan aplikasi PyMol dengan menggabungkan protein dan hasil docking pada Pyrx kemudian save dengan format pdb. Setelah digabungannya dengan aplikasi PyMol dibuka aplikasi Discovery Studio 2021, buka hasil penggabungan kemudian pilih *receptor-ligan interactions* kemudian klik *ligan interaction* lalu klik *show 2D Diagram*. Didapatkan hasil dari interaksi-interaksi antara ligan dan protein tersebut.

III. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Determinasi Tanaman

Determinasi adalah proses membandingkan tumbuhan satu dengan tumbuhan lainnya yang sudah dikenal sebelumnya (dicocokkan atau disamakan), sehingga dapat menghindari kesalahan dalam pengumpulan tanaman yang digunakan untuk penelitian. Daun Gandarusa yang akan digunakan dilakukan determinasi di Balai Materia Medika Batu. Berdasarkan hasil determinasi yang telah dilakukan diketahui bahwa tanaman Daun Gandarusa yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah benar spesies *Justicia Gendarussa* Burm.f.

B. Hasil Ekstraksi

Sebelum dilakukan proses ekstraksi perlu dilakukan proses pengeringan simplisia dengan cara dipanaskan didalam oven dengan suhu 50°C. Tujuan dilakukan proses pengeringan ini adalah untuk menghilangkan kandungan air sehingga memiliki waktu simpan yang lebih lama. Selain itu, menurunkan kadar air pada simplisia bertujuan untuk menghambat proses degradasi dan menghambat pertumbuhan jamur. Ekstraksi dilakukan adalah untuk memisahkan senyawa aktif yang ada dalam tumbuhan. Maserasi adalah metode yang sederhana dengan melakukan perendaman simplisia dengan pelarut yang sesuai. Pada proses maserasi ini dilakukan pengulangan (remaserasi) sebanyak 3 kali.

Mekanisme dari proses maserasi ini adalah penarikan senyawa yaitu dengan melunakan dinding sel tumbuhan dan pelarutan senyawa pada suhu ruang sehingga menghasilkan proses yang efisien. Hasil ekstraksi menghasilkan ekstrak kental yang memiliki karakteristik berwarna hijau. Pada proses ini menghasilkan 2 ekstrak yaitu ekstrak metanol (Gambar 1) dengan jumlah rendemen 1,432 % (b/b) dan ekstrak n-hexane (Gambar 2) dengan jumlah rendemen 0,261 % (b/b).



Gambar 1
Ekstrak Metanol



Gambar 2
Ekstrak N-Hexane

C. Hasil Pengu

1. Pengujian Disc Diffusion

Pada uji *disc diffusion* yang telah dilakukan pada ekstrak metanol dan ekstrak n-hexane ditandai dengan terbentuknya zona hambat/zona bening pada media setelah diinkubasi kemudian diukur dengan penggaris dan dinyatakan dengan satuan milimeter. Dengan tidak terbentuknya zona hambat/zona bening pada media menandakan bahwa konsentrasi tersebut tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Dengan terbentuknya zona hambat/zona bening menunjukkan tingkatan aktivitas antibakteri yang terjadi, semakin luas diameter zona hambat/zona bening yang terbentuk maka semakin besar aktivitas antibakteri yang dimiliki ekstrak tersebut.

Diameter zona hambat/zona bening yang terbentuk pada ekstrak yang diujikan dibandingkan dengan menggunakan diameter zona hambat/zona bening pada kontrol positif yaitu *ampicillin* 10 µg dan kontrol negatif yaitu DMSO 0,2%. Apabila zona hambat/zona bening yang terbentuk lebih besar dari kontrol positif dapat memungkin bahwa ekstrak ini efektif sebagai antibakteri secara *in vitro* begitu pula sebaliknya. Penggunaan kontrol negatif ini digunakan untuk memastikan bahwa pelarut yang digunakan tidak memiliki pengaruh terhadap zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak.

Tabel 1. Fraksi Metanol Bakteri
Escherichia coli

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Zona Hambat (mm)
Fraksi Metanol Bakteri <i>Escherichia coli</i>	1000	8,88
	500	8,21
	250	7,75
	125	8,00
	62,5	6,83
	Kontrol Negatif	0,00
Kontrol Positif	9,75	

Tabel 2. Fraksi Metanol Bakteri
Staphylococcus aureus

Kelompok	Konsentrasi	Rata-rata
----------	-------------	-----------

	(ppm)	Zona Hambat (mm)
Fraksi Metanol Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	1000	9,79
	500	7,79
	250	9,00
	125	8,92
	62,5	6,88
	Kontrol Negatif	0,00
	Kontrol Positif	10,50

Hasil pengujian *disc diffusion* fraksi metanol terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara kualitatif pada konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm diperoleh hasil bahwa pada tiap konsentrasi memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Dapat diamati berdasarkan diameter zona hambat/zona bening yang terbentuk, apabila konsentrasi semakin besar yang dibuat maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk akan semakin besar dan sebaliknya.

Pada bakteri *Escherichia coli* diperoleh diameter zona hambat/ zona hambat pada konsentrasi terbesar yaitu 8,88 mm (Tabel 1), pada bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh diameter pada konsentrasi terbesar yaitu 9,79 mm (Tabel 2). Pada kontrol positif memiliki diameter zona hambat sebesar 10,50 mm. Zona hambat yang terbentuk pada kedua bakteri tersebut memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif. Hal tersebut bisa dikatakan bahwa aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh fraksi metanol lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif yaitu ampicillin. Dapat disimpulkan pada fraksi metanol memiliki aktivitas lebih besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli*.

Tabel 3. Fraksi N-Hexane Bakteri *Escherichia coli*

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Zona Hambat (mm)
Fraksi N-Hexane Bakteri <i>Escherichia coli</i>	1000	8,96
	500	8,21
	250	8,13
	125	7,50
	62,5	6,96
	Kontrol Negatif	0,00
Kontrol Positif	10,13	

Tabel 4. Fraksi N-Heksane Bakteri *Staphylococcus aureus*

Kelompok	Konsentrasi (ppm)	Rata-rata Zona Hambat (mm)
Fraksi N-Heksane Bakteri	1000	8,83
	500	8,96
	250	8,25

<i>Staphylococcus aureus</i>	125	7,88
	62,5	7,25
	Kontrol Negatif	0,00
	Kontrol Positif	12,92

Hasil pengujian *disc diffusion* fraksi N-hexane terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara kualitatif pada konsentrasi 1000 ppm; 500 ppm; 250 ppm; 125 ppm; 62,5 ppm diperoleh hasil bahwa pada tiap konsentrasi memiliki aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Dapat diamati berdasarkan diameter zona hambat/zona bening yang terbentuk, apabila semakin besar konsentrasi yang dibuat maka semakin besar zona hambat atau zona bening yang terbentuk dan sebaliknya.

Pada bakteri *Escherichia coli* diperoleh diameter zona hambat/ zona hambat pada konsentrasi terbesar yaitu 8,96 mm (Tabel 3), pada bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh diameter pada konsentrasi terbesar yaitu 8,83 mm (Tabel 4). Pada kontrol positif memiliki diameter zona hambat sebesar 12,92 mm. Zona hambat yang terbentuk pada kedua bakteri tersebut memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif. Hal tersebut bisa dikatakan bahwa aktivitas antibakteri yang dimiliki oleh fraksi n-hexane lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif yaitu ampicillin. Dapat disimpulkan pada fraksi n-hexane memiliki aktivitas lebih besar terhadap bakteri *Escherichia coli* dibandingkan dengan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kesimpulan pada pengujian pada uji *disc diffusion* adalah semakin besar konsentrasi ekstrak daun gandarusa fraksi metanol dan fraksi n-hexane maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk dan semakin besar aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Semakin besar konsentrasi yang terdapat pada cakram kertas maka memperbesar kemampuan difusi pada media sehingga mempermudah penetrasi zat dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Uji yang dilakukan pada kedua fraksi dan kedua bakteri diketahui fraksi metanol memiliki aktivitas antibakteri lebih tinggi dibandingkan dengan fraksi n-heksane.

2. Pengujian Makrodilusi

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terkecil pada suatu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terkecil pada suatu senyawa yang dapat membunuh $\geq 99,9\%$ bakteri uji (Mulyadi, dkk 2017).

Pada pengujian makrodilusi dilakukan pengukuran kekeruhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* menggunakan Spektrofotometri UV-Vis dengan panjang gelombang 698 nm dan didapatkan hasil *Optical density* pada kisaran 0,2-0,4. Penentuan KHM dilakukan dengan pengamatan secara langsung kekeruhan larutan dalam tabung eppendorf, apabila larutan dalam tabung tabung semakin jernih maka semakin besar

daya hambatnya.

Bakteri	Replikasi	Fraksi	KHM	KBM
<i>E.coli</i>	1	Metanol	1000	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000
	2	Metanol	500	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000
	3	Metanol	1000	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000

Bakteri	Replikasi	Fraksi	KHM	KBM
<i>S. aureus</i>	1	Metanol	1000	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000
	2	Metanol	500	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000
	3	Metanol	1000	>1000
		N-Hexane	>1000	>1000

Penentuan nilai KHM dan KBM dilakukan dengan cara mengamati secara visual hasil makrodilusi pada media cair dalam tabung eppendorf. Pertumbuhan bakteri dengan media menjadi keruh. Pada konsentrasi larutan uji dapat dikatakan sebagai nilai KHM apabila hasil dari makrodilusi menunjukkan hasil yang jernih yang artinya konsentrasi pada larutan tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Nilai KBM diperoleh dari melihat konsentrasi terkecil hasil pemindahan bakteri secara streak apabila tidak menunjukkan perubahan setelah diinkubasi 24 jam.

Uji yang dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* dengan fraksi metanol memiliki nilai KHM pada konsentrasi 500 ppm, untuk nilai KBM pada fraksi metanol berada pada konsentrasi >1000 ppm. Pada fraksi n-hexane nilai KHM yang diperoleh yaitu >1000 ppm, sedangkan untuk nilai KBM pada konsentrasi >1000 ppm (Tabel 5). Uji yang dilakukan pada bakteri *Staphylococcus aureus* pada fraksi metanol memiliki nilai KHM pada konsentrasi >1000 ppm, untuk nilai KBM pada fraksi metanol berada pada konsentrasi >1000 ppm. Pada fraksi n-Hexane nilai KHM yang diperoleh >1000 ppm, sedangkan untuk nilai KBM pada konsentrasi >1000 ppm (Tabel 6). Kontrol positif menggunakan ampicillin dengan konsentrasi 10 µg/ml. Menurut Rusdi 2018, nilai KHM yang dimiliki oleh Ampicilin berada pada konsentrasi 0,49 µg/ml.

Dapat disimpulkan bahwa hasil pengujian

makrodilusi pada kedua fraksi memiliki aktivitas lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol positif. Untuk fraksi metanol memiliki nilai KHM 500 ppm dan nilai KBM >1000 ppm, pada fraksi n-hexane memiliki nilai KHM >1000 ppm dan nilai KBM >1000 ppm. Berdasarkan nilai KHM dan KBM yang telah diperoleh diketahui bahwa fraksi metanol lebih aktif dibandingkan dengan fraksi n-hexane.

D. Hasil Pengujian GC-MS

Berdasarkan hasil pengujian secara *in vitro* dilakukan pemilihan terhadap fraksi yang aktif yaitu terpilih fraksi metanol untuk dilakukan pengujian dengan GC-MS. Senyawa yang memiliki konsentrasi terendah dapat terbaca menggunakan dengan menggunakan GC-MS dan dapat melakukan identifikasi metabolit sekunder pada tanaman yang memiliki hasil berupa kromatogram dan spektrum massa. (Muzakhar et al., 2015).

Hasil analisis GC-MS yang telah dilakukan telah diperoleh sebanyak 12 peak artinya memiliki 12 senyawa dalam fraksi metanol tersebut :

R.Time	Senyawa	Rumus Kimia	Peak Area %
3.306	<i>n-hexane</i>	C ₆ H ₁₄	45.77
3.113	<i>2-ethyl-oxetane</i>	C ₅ H ₁₀ O	40.37
4.006	<i>toluen</i>	C ₇ H ₈	3.95
4.422	<i>3-penten-2-one, 4-methyl-</i>	C ₆ H ₁₀ O	7.70
5.138	<i>2-pentanone, 4-hydroxy-4-methyl-</i>	C ₆ H ₁₂ O ₂	0.38
10.503	<i>Cyclopentasiloxane, decamethyl-</i>	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	0.32
13.170	<i>Cyclohexasiloxane, dodecamethyl</i>	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	0.65
15.600	<i>Cycloheptasiloxane, tetradecamethyl</i>	C ₁₄ H ₄₂ O ₇ Si ₇	0.38
17.483	<i>Diethyl Phthalate</i>	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0.19
18.373	<i>Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl</i>	C ₁₆ H ₄₈ O ₈ Si ₈	0.18

E. Pengujian In Silico

Uji *in silico* adalah uji yang memiliki metode simulasi dengan dilakukan pada media komputer. Uji ini dilakukan pada penemuan obat baru yang memiliki tujuan untuk memprediksi aktivitas antibakteri. Dalam penelitian ini, pentingnya melakukan molecular docking untuk memperkirakan dan mencari energi yang dibutuhkan senyawa untuk berikatan dengan protein yang menjadi target dari senyawa tersebut.

Berdasarkan hasil dari pengujian GC-MS kemudian mencari struktur senyawa-senyawa tersebut di Pubchem dan dilakukan pengunduhan struktur 3D dengan format .sdf. Untuk pencarian protein yang akan digunakan dilakukan stui literatur dari beberapa jurnal yang telah melakukan molecular docking pada pengujian aktivitas antibakteri pada database protein di website <https://www.rcsb.org>. Ketentuan dari protein yang akan digunakan adalah protein tersebut harus

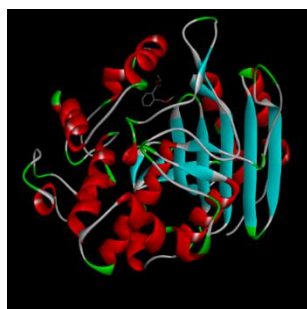
tidak memiliki rantai terputus (*missing residu*) dan protein tersebut memiliki *native ligand*. Kemudian box diset pada situs aktif protein target karena pada penelitian ini dilakukan adalah *targeted docking* bukan *blind docking*.

Proses ini dilakukan agar hasil yang didapatkan lebih dapat terlihat interaksi yang terjadi antara senyawa dan protein. Setelah hasil keluar dipilih nilai kekuatan interaksi yang memiliki nilai RMSD paling kecil karena memiliki ikatan yang stabil dan memiliki aktivitas yang lebih kuat. Pemilihan senyawa dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 8. Senyawa Terbaik Hasil Molekuler Docking		
Senyawa	Protein	Binding Affinity
Diethyl Phthalate	1CEF	-5,8
Toluen	1CEF	-4,5
Ligand Kontrol	1CEF	-7,9
Diethyl Phthalate	1CEG	-4,5
Toluen	1CEG	-3,4
Ligand Kontrol	1CEG	-7,3
Toluen	1ITV	-4,5
Diethyl Phthalate	1ITV	-3,4
Ligand Kontrol	1ITV	-2,5
3-penten-2-one, 4-methyl-(Mesityl oxide)	4DOY	-2,1
Toluen	4DOY	-2,1
Ligand Kontrol	4DOY	-1,7

1. Hasil Molekuler Docking 1CEF

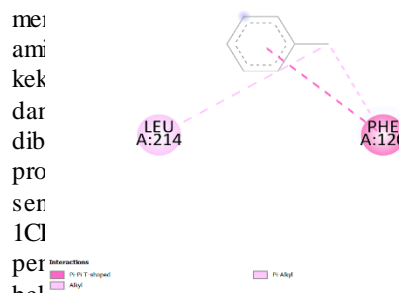
Pada hasil molekuler docking pada protein 1CEF yang merupakan protein *Hydrolase-Transpeptidase* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa hasil GC-MS dimana dapat dilihat ketika terjadi interaksi dengan residu asam amino yang terdapat pada molekul 1CEF dan senyawa hasil GC-MS yang bertindak sebagai ligan. Dari tabel pada protein terlihat bahwa senyawa *diethyl phthalate* memiliki energi ikatan sebesar -5,8 (Gambar 3) dan *toluene* memiliki energi ikatan sebesar -4,5 (Gambar 4). Ligand kontrol yang menempel pada protein 1CEF memiliki energi pengikatan sebesar -7,9.



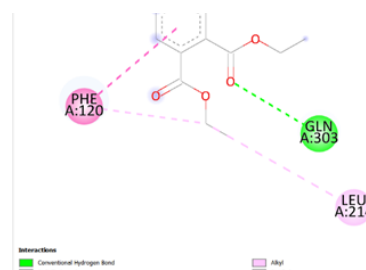
Gambar 3. Diethyl Phthalate dengan Protein 1CEF



Pada visualisasi dengan menggunakan Discovery Studio menunjukkan bahwa *Diethyl Phthalate* memiliki ikatan hidrogen dengan residu asam amino Gln303 dan ikatan hidropobik dengan residu asam amino Phe120 dan Leu124 (Gambar 4.6). *Toluene* memiliki ikatan hidrogen dengan residu asam amino Phe120 dan Leu124 (Gambar 4.7). Nilai energi ikatan antara protein dan senyawa lebih kecil menunjukkan bahwa senyawa tersebut sebagai inhibitor yang menghambat atau bersifat periklis.



Gambar 6. Visualisasi 2D Toluen dengan Protein 1CEF

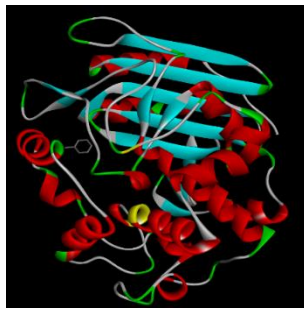


Gambar 5. Visualisasi 2D Diethyl Phthalate dengan Protein 1CEF

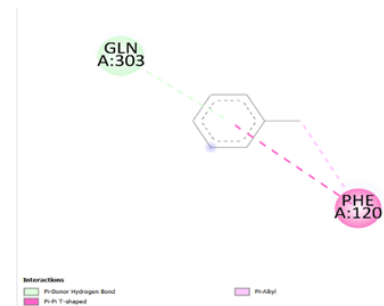
2. Hasil Molekuler Docking 1CEG

Pada hasil molekuler docking pada protein 1CEG yang merupakan protein *Hydrolase-Transpeptidase* dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa hasil GC-MS dimana dapat dilihat ketika terjadi interaksi dengan residu asam amino yang terdapat pada molekul 1CEG dan senyawa hasil GC-MS yang bertindak sebagai ligan. Dari tabel pada protein terlihat bahwa senyawa *diethyl phthalate* memiliki energi ikatan sebesar -4,5 (Gambar 7) dan *toluene* memiliki energi ikatan sebesar -3,4 (Gambar 8).

Ligand kontrol yang menempel pada protein 1CEG memiliki energi pengikatan sebesar -7,3.



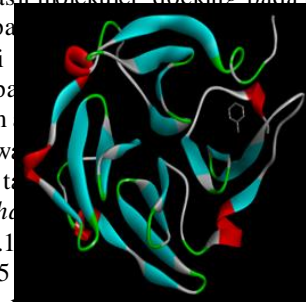
Gambar 7.
Toluen dengan Protein 1CEG



Gambar 10. Visualisasi 2D Toluen dengan Protein 1CEG

3. Hasil Molekuler Docking IITV

Pada hasil molekuler docking pada protein IITV yang merupakan enzim yang digunakan untuk mengetahui aktivitas enzim GC-MS dimana dapat diidentifikasi aksi dengan residu asam amino pada molekul IITV dan senyawa tersebut tidak sebagai ligan. Dari terdapat bahwa senyawa *diethyl phthalate* memiliki energi ikatan sebesar -3,4 (Gambar 4.1) yang memiliki energi ikatan sebesar -4,5 yang memiliki energi pengikat

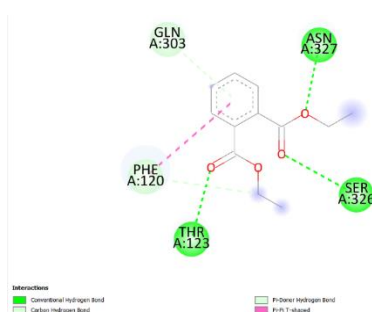


Gambar 12.
Toluen dengan Protein IITV

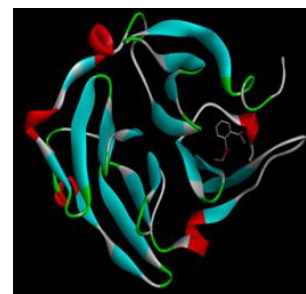


Gambar 8.
Diethyl Phthalate dengan Protein 1CEG

Pada visualisasi dengan menggunakan Discovery Studio menunjukkan bahwa *Diethyl Phthalate* memiliki ikatan hidrogen dengan residu asam amino Thr123, Ser326, Asn327, Phe120, Gln303, Phe120 dan ikatan hidropobik dengan residu asam amino Phe120 (Gambar 9). Toluene memiliki ikatan hidropobik dengan residu asam amino Phe120 dan Leu124 (Gambar 10). Nilai kekuatan interaksi yang ditimbulkan antara protein dan senyawa memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan nilai kekuatan interaksi antara protein dengan ligan asli. Dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai inhibitor ICEG yang bekerja menghambat pembentukan dinding sel pada bakteri atau bersifat bakteriosida.



Gambar 9. Visualisasi 2D Diethyl Phthalate dengan Protein 1CEG

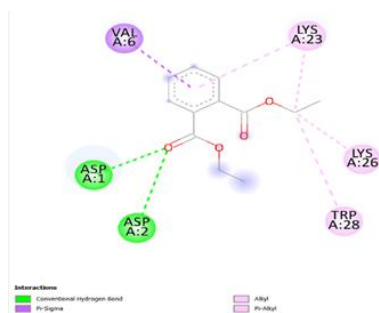


Gambar 11.
Diethyl Phthalate dengan Protein IITV

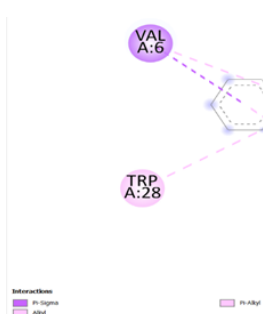
Pada visualisasi dengan menggunakan Discovery Studio menunjukkan bahwa *Diethyl Phthalate* memiliki ikatan hidrogen dengan residu Asp1, Asp2 dan ikatan hidropobik

GLN A:303

asam amino Val6, Lys23, Lys26, Trp 28 (Gambar 13). *Toluene* memiliki ikatan hidropobik dengan residu asam amino Val6, Lys23, dan Trp28 (Gambar 14). Nilai kekuatan interaksi yang ditimbulkan antara protein dan senyawa memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai kekuatan interaksi antara protein dengan ligan. Dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut memiliki potensi sebagai inhibitor IITV yang bekerja melemahkan dan menghambat pertumbuhan bakteri.



Gambar 13. Visualisasi 2D Diethyl Phthalate dengan Protein IITV



Gambar 14. Visualisasi 2D Toluene dengan Protein IITV

4. Hasil Molekuler Docking 4D0Y

Pada hasil molekuler docking pada protein 4D0Y yang merupakan protein Hydrolase dilakukan untuk mengetahui kemampuan senyawa hasil GC-MS dimana dapat dilihat ketika terjadi interaksi dengan residu asam amino yang terdapat pada molekul 4D0Y dan senyawa hasil GC-MS yang bertindak sebagai ligan. Dari tabel pada protein terlihat bahwa senyawa *3-penten-2-one, 4-methyl- (Mesityl oxide)* memiliki energi ikatan sebesar -2,1 (Gambar 15) dan *toluene* memiliki energi ikatan sebesar -2,1 (Gambar 16). Ligand kontrol yang menempel pada protein 4D0Y memiliki energi pengikatan sebesar -1,7.

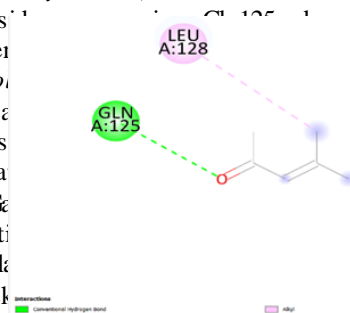


Gambar 15. Toluene dengan Protein 4D0Y



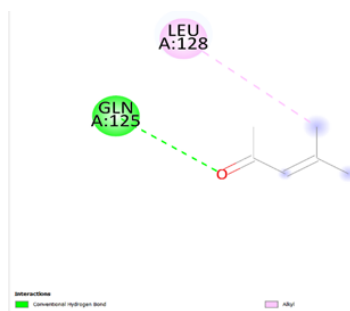
Gambar 16. 3-penten-2-one, 4-methyl- (Mesityl oxide) dengan Protein 4D0Y

Pada visualisasi dengan menggunakan Discovery Studio menunjukkan bahwa *3-penten-2-one, 4-methyl- (Mesityl oxide)* memiliki ikatan hidrogen dengan residu asam amino Gln125 dan Leu128 yang bersifat hidropobik (Gambar 17). *Toluene* memiliki ikatan hidropobik dengan residu asam amino Val6, Lys23, dan Trp28 (Gambar 14). Nilai kekuatan interaksi yang ditimbulkan antara protein dengan senyawa memiliki nilai yang lebih tinggi dibandingkan dengan nilai kekuatan interaksi antara protein dengan ligan asli.



Gambar 18. Visualisasi 2D Toluene dengan Protein 4D0Y

bakteri atau bersifat bakteriosida.



Gambar 17. Visualisasi 2D 3-penten-2-one, 4-methyl- (Mesityl oxide) dengan Protein 4D0Y

IV. KESIMPULAN

Dalam pengujian *disc diffusion*, fraksi metanol dan fraksi n-hexane memiliki aktivitas antibakteri lemah pada konsentrasi tertinggi dengan diameter zona hambat 8,88 mm (*Escherichia coli*) dan 9,79 (*Staphylococcus aureus*) pada fraksi metanol dan pada fraksi n-hexane memiliki diameter zona hambat 8,96 mm (*Escherichia coli*) dan 8,83 (*Staphylococcus aureus*). Pada pengujian makrodilusi KHM dan KBM yang dimiliki fraksi metanol berada pada konsentrasi >1000 ppm, sedangkan pada fraksi n-hexane pada konsentrasi >1000 ppm. Pada pengujian GC-MS menggunakan fraksi metanol karena merupakan fraksi yang paling aktif dan didapatkan 12 senyawa dalam pengujian GC-MS. *Diethyl Phthalate*, *Toluen*, *3-penten-2-one*, *4-methyl- (Mesityl oxide)* memiliki interaksi yang baik dengan protein ICEF, ICEG, IITV, dan 4DOY sehingga berpotensi sebagai senyawa antibakteri dalam proses molekuler docking.

V. DAFTAR PUSTAKA

- Bridson, E. Y. (2006). *The OXOID Manual*.
- Chandra, S., & Lo, D. (2021). A review on the bioactivities of *Justicia gendarussa*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 794(1).
- Hidayati, P. I. (2016). Mikrobiologi Dasar. *Universitas Kanjuruhan Malang*, 1–5.
- Mulyadi, M., Wuryanti, W., & Sarjono, P. R. (2017). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Jurnal Kimia Sains Dan Aplikasi*, 20(3), 130–135.
- Muzakhar, K., Utami, E. T., Ulum, F. B., Setiawan, R., Ubaidillah, S., Barokah, A., & Khoiriyah, Z. (2015). *Exploration and Conservation of Biodiversity*.
- Nuria, M. C., Astuti, E. P., & Sumantri. (2010). Antibacterial Activities of Ethyl Acetate Fraction of Methanol Extract from Sosor Bebek Leaves (*Kalanchoe pinnata Pers.*). *Mediagro*, 6(2), 51–61.
- Oeiyo, W. E., Simbala, H. E. I., & Rotinsulu, H. (2019). Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Spons *Phyllospongia lamellosa* Dari Perairan Tumbak, Minahasa Nusa Tenggara Terhadap Pertumbuhan Mikroba *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans*. *Pharmacon*, 8(3), 629.