

SINTESIS SENYAWA *MANNICH-EUGENOL* SEBAGAI ANTIMIKROBA BARU DALAM MENGATASI RESISTENSI ANTIMIKROBA

Anisa Aulia Rahim^a, Roma Dhony^a, Shinta Okka Zulya^b, Jufrizal Syahri^{a*}

^a Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Muhammadiyah Riau, J

^b Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Muhammadiyah Riau,

Email*: jsyachri@umri.ac.id

ABSTRACT

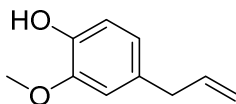
Anti-microbial resistance is one of the biggest health challenges in the world. In 2015, WHO reported at least around 700 thousand people died due to anti-microbial resistance. One of the many natural compounds found in Indonesia and reported to have anti-microbial activity is the eugenol compound. However, the activity of the resulting compound is still very weak, so it is necessary to modify the functional group to increase its anti-microbial activity by adding an amine group. In this research, a Mannich-eugenol compound was synthesized based on Docking and experimental studies. Molecular docking method using Discovery studio software was performed to Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Sar2676 (2X3F.pdb.) To understand the interactions formed by compound structure was confirmed by spectrophotometric analysis using MS, H- and C-NMR. Eugenol without the addition of an amine group to the S. aureus bacteria showed a zone of 12.2 mm and the addition of morpholine and dimethylamine could significantly increase the antibacterial activity to 15.2 mm and 18.6 mm respectively while eugenol without the addition of an amine group to the bacteria E. coli shows a zone of 11.5 mm and the addition of morpholine and dimethylamine can significantly increase the antibacterial activity respectively to 14.3 mm and 20 mm. Molecular docking of the compound shows the interaction of strong hydrogen bonds with SER186, ARG188, ASP151, HIS35, LYS150, LYS185, PHE147, with an interaction energy of CDOCKER -48.84 kcal / mol.

Keywords : Anti-microbial, Docking, Escherichia Coli, Mannich-Eugenol, and Staphylococcus aureus.

PENDAHULUAN

Resistensi antimikroba merupakan salah satu tantangan kesehatan terbesar didunia. Pada tahun 2015, WHO melaporkan sedikitnya sekitar 700 ribu orang meninggal dunia akibat resistensi antimikroba. Jumlah ini akan terus meningkat, dan diperkirakan pada tahun 2050 jumlah kasus resistensi antimikroba akan menjadi 10 juta kasus, dan 4 juta diantaranya meninggal dunia (WHO, 2015). Adanya kasus resistensi ini membuat penyakit infeksi lebih sulit untuk diobati dan bahkan tidak dapat disembuhkan. Oleh

karena itu, sangat *urgen* saat ini untuk menemukan senyawa antimikroba baru yang efektif dan efisien dengan biaya yang terjangkau sehingga dapat mengatasi kasus resistensi ini. Jika masalah resistensi ini tidak segera diatasi maka kemungkinan penyakit infeksi akan menjadi penyakit yang tidak terobati pada beberapa dasawarsa mendatang (WHO, 2015). Salah satu senyawa alam yang banyak terdapat di Indonesia dan dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba adalah senyawa eugenol.



Gambar 1. Struktur kimia eugenol

Eugenol merupakan senyawa alam yang banyak terdapat di Indonesia terutama pada minyak cengkeh (*Syzygium Aromaticum*). Senyawa eugenol mempunyai gugus fungsi alil, hidroksi dan metoksi. Adanya gugus fungsi ini menjadikan eugenol memiliki banyak aktivitas biologi seperti antioksidan (Mahapatra *et al.*, 2014; Mahboub, 2015), antiviral (Banencia *et al.*, 200), antikanker (Majeed *et al.*, 2014; Al-Sharif *et al.*, 2013; Koh *et al.*, 2013), antiinflamasi (Yogalakshmi *et al.*, 2010), antibakteri (Hemaiswarya *et al.*, 2009; Oyedemi *et al.*, 2009), dan antijamur (Abrao *et al.*, 2014; Chaieb *et al.*, 2007). Selain aktivitasnya yang sangat banyak, hal lain yang sangat menarik perhatian dari senyawa eugenol ini adalah kelimpahannya yang besar di alam sehingga mudah untuk diperoleh.

Aktivitas antimikroba dari senyawa eugenol masih tergolong lemah jika dibandingkan obat antimikroba yang dijual dipasaran. Oleh karena itu diperlukan modifikasi gugus fungsi dari struktur eugenol untuk meningkatkan aktivitas antimikrobanya. Agar proses modifikasi gugus fungsi lebih efektif dan efisien, maka didahului dengan kajian komputasi *docking* sebagai penuntun modifikasi gugus fungsi. Penggunaan kajian komputasi ini sangat mutlak dilakukan karena dapat memprediksi senyawa yang memiliki aktivitas terbaik. Salah satu gugus fungsi yang diyakini dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dari senyawa eugenol adalah gugus amina sekunder. Menurut Syahri, *et al.*, (2017) gugus amina dapat membentuk interaksi elektrostatik dengan protein parasit sehingga dapat membunuh parasit tersebut. Diharapkan dengan adanya gugus amina pada senyawa eugenol aktivitas antimikrobanya menjadi sangat baik bahkan melebihi aktivitas obat saat ini. Penambahan gugus amina sekunder pada senyawa eugenol dapat dilakukan dengan menggunakan reaksi *Mannich*, sedangkan posisi dan jenis amina sekunder yang akan disubstitusikan ditentukan berdasarkan hasil studi *docking*. Gabungan metode komputasi dan eksperimen ini diharapkan dapat menghasilkan kolaborasi yang sangat efektif dan efisien dalam menghasilkan senyawa baru yang memiliki aktivitas sangat baik.

Pada penelitian ini akan dilakukan sintesis senyawa *Mannich*-eugenol berdasarkan studi *docking* untuk mendapatkan senyawa antimikroba baru yang dapat mengatasi resistensi antimikroba.

METODE PENELITIAN

BAHAN PENELITIAN

Bahan yang digunakan untuk proses *docking* adalah kristal protein antimikroba yang di download dari Protein Data Bank atau www.pdb.org. Bahan laboratorium yang

digunakan dalam proses sintesis senyawa usulan memiliki kualitas analitik dari *Sigma Aldrich* dan *Merck*. Bahan kimia dari *Sigma Aldrich* yaitu pereaksi eugenol, alilbromida, dimetilamin, piperidin, morfolin. Sementara itu, bahan kimia dari *Merck* meliputi sodium hidroksida, potasium hidroksida, asam klorida, plat TLC (20cmx20cm), etanol, metanol, aseton, akuades. Bahan kimia yang digunakan dalam proses uji antimikroba secara *in-vitro* adalah natrium agar, natrium broth, water pepton, bakteri *E.Coli*, *S. aureus*, dan jamur *Candida albicans*.

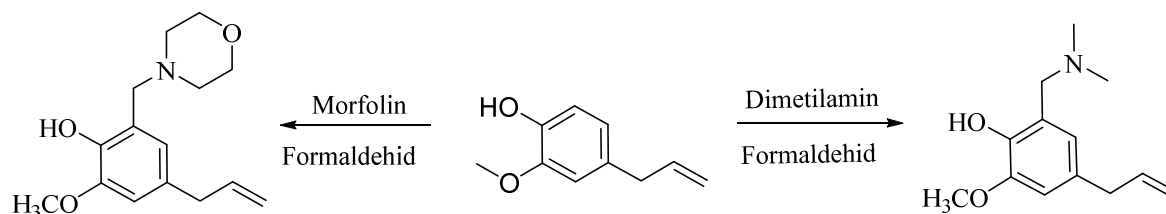
PROSEDUR PENELITIAN

Docking Molekul

Proses docking dimulai dari mempersiapkan kristal protein dengan aktivitas sebagai antimikroba. Struktur protein 3 dimensi diambil disitus data bank protein (www.pdb.org). Interaksi intramolekular antara ligan dan protein didalam docking dapat digambarkan dengan istilah gembok dan kunci. Protein yang merupakan reseptor berfungsi sebagai gembok, sedangkan ligan (senyawa) yang merupakan pasangan komplemen dari protein bertindak sebagai kunci. Sebelum dilakukan proses *docking*, senyawa diberikan perlakuan terlebih dahulu, begitu juga protein. Hal ini bertujuan agar senyawa dan protein benar-benar seperti pada keadaan di eksperimen. Apabila persiapan protein dan senyawa telah selesai, baru proses *docking* dapat dilakukan. Proses *docking* dan analisis dilakukan menggunakan perangkat lunak *Discovery studio* (Gaber *et al.*, 2017).

Sintesis Senyawa *Mannich-eugenol*

Modifikasi eugenol dilakukan berdasarkan hasil analisis *Docking* molekul. Beberapa metoda modifikasi yang diperkirakan akan dilakukan adalah reaksi *Mannich* menggunakan amina sekunder seperti Morfolin dan dimetilamin, alilasi menggunakan alilbromida, dan prenilasi. Proses modifikasi ini dilakukan di laboratorium eksperimen, dan hasilnya dilakukan uji aktivitas antimikroba. Sebanyak 10 mmol eugenol dilarutkan dengan 75mL etanol dalam labu leher tiga kapasitas 100mL, kemudian ditambahkan formaldehid 10 mmol dan amina sekunder (morfolin atau piperidin, atau dimetilamin) 10 mmol. Reflux campuran reaksi selama 20 jam sambil diaduk menggunakan magnetic stirrer. Monitor reaksi menggunakan TLC, jika reaksi sudah selesai campuran reaksi di uapkan pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*. Kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan MS, H- dan C- NMR. Mekanisme reaksi sintesis dapat dilihat pada gambar 2.



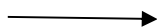
gambar 2. Mekanisme reaksi dari modifikasi gugus fungsi senyawa eugenol

Uji Aktivitas Antimikroba

Uji Antibakteri



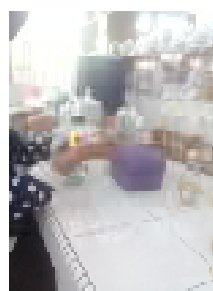
Pembuatan media MHA dan MHB



Diremajaan isolat bakteri dengan media MHB selama 24 jam



Pengamatan hasil uji aktivitas antibakteri

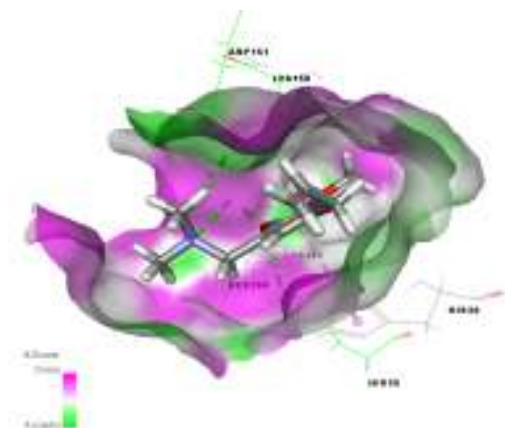


Dilakukan pengujian aktivitas antibakteri pada bakteri *E.coli* dan bakteri *S. Aureus*

PEMBAHASAN

Docking Molekul

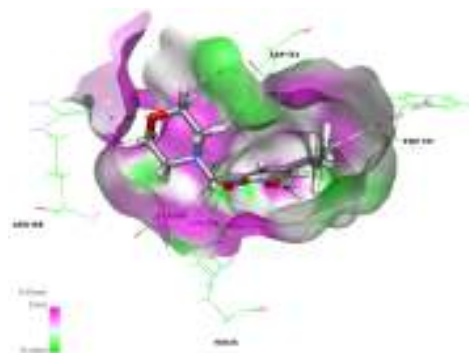
Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan bakteri *Staphylococcus aureus* yang mengalami resistensi terhadap antibiotika metisilin. Antibiotik metisilin ini dipilih sebagai molekul target dalam proses *docking* karena memiliki mekanisme penting dalam biosintesis folat yang diperlukan dalam sintesis DNA. Hasil *docking* molekul dari protein 2X3F.pdb dapat dilihat pada gambar 3.



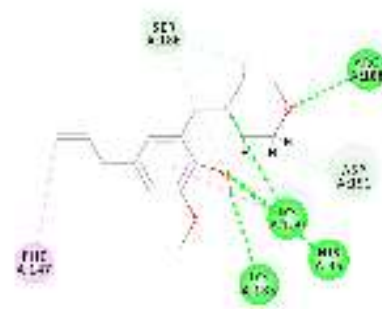
(ED) Eugenol dimetilamina 3D



(ED) Eugenol dimetilamina 2D



(EM) Eugenol morfolin 3D



(EM) Eugenol morfolin 2D

Gambar 3. Interaksi ikatan hidrogen simulasi proses *docking* senyawa ED dan EM kedalam sisi aktif protein methicillin-resistant *staphylococcus aureus* Sar2676 2X3F.pdb

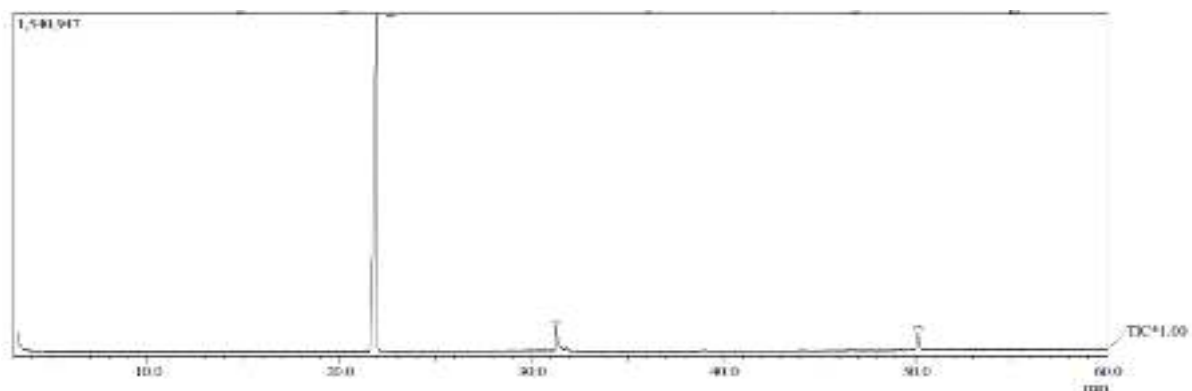
Sintesis Senyawa *Mannich*-Eugenol

Tabel 1. Hasil proses sintesis turunan senyawa *Mannich*-eugenol

NO.	Sampel	Berat (gram)	Bentuk	Warna
1	Eugenol	1,550	Cairan	Kuning bening
2	Eugenol Dimetilamina	1,527	Cairan	Merah bata
3	Eugenol Morfolin	1,554	Cairan	Kuning muda

Analisa GC-MS

Karakterisasi hasil sintesis senyawa *Mannich*-eugenol terhadap amina sekunder (morfolin dan dimetilamina)



Gambar 4. Spektra hasil analisa MS senyawa *Mannich*-eugenol terhadap amina sekunder (morfolin dan dimetilamina).

Dari gambar dapat dilihat puncak puncak spektra yang membuktikan keberadaan senyawa modifikasi dari proses sintesis *Mannich*-eugenol terhadap amina sekunder (morfolin dan dimetilamina).

Uji Aktivitas Antimikroba

Uji Aktivitas Antibakteri

Tabel 2. Hasil pengujian antibakteri terhadap bakteri *E.Coli* dari hasil sintesis turunan senyawa *Mannich*-eugenol

Sampel Uji	Sisi 1	Sisi 2	Sisi 3	Sisi 4	Rata-Rata	Diameter Zona Bening (mm)
Kloramfenikol	15,1	17,1	16,5	16,4	16,5	11,5
Kontrol Negatif	—	—	—	—	—	—
Eugenol 25%	13,4	13,6	13,7	13,3	13,5	8,0
Eugenol 50%	15,9	14,5	16,7	15,3	15,6	10,1
Eugenol 75%	16,1	18,1	16,1	15,8	15,6	11,5
Eugenol D 25%	15,6	18,1	16,2	16,7	16,7	11,2
Eugenol D 50%	18,3	17,6	18,4	17,7	18,0	12,5
Eugenol D 75%	19,8	18,9	20,8	19,4	19,8	14,3
Eugenol M 25%	18,6	19,3	19,0	18,4	18,8	13,3
Eugenol M 50%	20,6	19,9	20,3	19,7	20,2	14,7
Eugenol M 75%	25,5	25,9	5,3	25,1	25,5	20,0

Dari hasil uji aktivitas antimikroba pada bakteri *E.coli* pada konsentrasi 75% senyawa eugenol memiliki zona bening sebesar 11,5 mm, eugenol dimetilamina sebesar 14,3 mm dan eugenol morfolin sebesar 20,0 mm dengan menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif yang memiliki zona bening sebesar 11,5 mm.

Tabel 3. Hasil pengujian antibakteri terhadap bakteri *S.aureus* dari hasil sintesis turunan senyawa *Mannich-eugenol*

Sampel Uji	Sisi 1	Sisi 2	Sisi 3	Sisi 4	Rata Rata	Diameter Zona Bening (mm)
Kloramfenikol	24,4	24,4	24,4	24,4	24,4	18,4
Kontrol Negatif	–	–	–	–	–	–
Eugenol 30%	12,1	12,1	12,3	12,1	12,2	6,2
Eugenol 40%	13,3	13,6	13,4	13,4	13,4	7,4
Eugenol 50%	15,3	15,8	15,3	15,3	15,4	9,4
Eugenol 60%	18,2	18,2	18,2	18,2	18,2	12,2
Eugenol D 30%	17,4	17,4	17,4	17,4	17,4	11,4
Eugenol D 40%	18,1	18,1	18,1	18,1	18,1	12,1
Eugenol D 50%	19,1	19,1	19,1	19,1	19,1	13,1
Eugenol D 60%	21,1	21,2	21,2	21,2	21,2	15,2
Eugenol M 30%	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	13,6
Eugenol M 40%	21,2	21,2	21,2	21,2	21,2	15,2
Eugenol M 50%	21,3	21,3	21,3	21,3	21,3	15,3
Eugenol M 60%	24,6	24,6	24,6	24,6	24,6	18,6

Dari hasil uji aktivitas antimikroba pada bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 60% senyawa eugenol memiliki zona bening sebesar 12,2 mm, eugenol dimetilamina sebesar 15,2 mm dan eugenol morfolin sebesar 18,6 mm dengan menggunakan kloramfenikol sebagai kontrol positif yang memiliki zona bening sebesar 18,4 mm. Hal ini membuktikan bahwa dengan mensubstitusikan amina sekunder ke dalam senyawa eugenol dapat meningkatkan aktivitas antimikrobanya bahkan melebihi kontrol positif yang digunakan.

KESIMPULAN

Memodifikasi senyawa eugenol dengan mensubstitusikan senyawa amina sekunder terbukti dapat meningkatkan aktivitas antimikroba dan berpotensi sebagai bahan dasar obat baru.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, Dan Pendidikan Tinggi Direktorat Jenderal Pembelajaran Dan Kemahasiswaan atas pendanaan

penelitian ini dalam hibah Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) bidang penelitian pendanaan tahun 2019.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrao, PH. Pizi RB. De Souza TB. Silva NC. Fregnan AM. Silva FN. Coelho LF. Malaquias LC. Dias AL. Dias DF. Veloso MP. Carvalho DT. 2014. Synthesis and biological evaluation of new eugenol mannich bases as promising antifungal agents. Universidade Federal De Alfenas. *Chem Biol Drug Des.* 86 :459-465
- Al-Sharif I, Remmal A, Aboussekhra A. 2013. Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation. *BMC Cancer* 13 : 600.
- Banencia F, Courreges MC. 2000. In vitro and in vivo activity of eugenol on human herpesvirus. *Phytother Res.* 14: 495-500
- Chaieb K, Zmantar T, Ksouri R, Hajlaoui H, Mahdouani K. 2007. Antioxidant properties of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* and its antifungal activity against a large number of clinical *Candida* species. *Mycoses* 50: 403-406.
- Gaber M. Hoda A. El-Ghamry. Mohammed A. 2017. Pd (II) and Pt (II) chalcone complexes. Synthesis, spectral characterization, molecular modeling, biomolecular docking, antimicrobial and antitumor activities. *J. Photochem. Photobiol.* In Press, *Corrected Proof*
- Hemaiswary S. 2009. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against gram negative bacteria. *Phytomedicine* 16 : 997-1005
- Khatkar A. Nanda A. Kumar P. Narasimhan B. 2017. Synthesis, antimicrobial evaluation and QSAR studies of gallic acid derivatives. *India. Arabian Journal Of Chemistry* 10:2870-2880
- Koh T, Murakami Y, Tanaka S, Machino M, Onuma H. 2013. Changes Of Metabolic Profiles In An Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Induced By Eugenol. *In Vivo* 27: 233-243.
- Mahapatra S.K. Raja MR. Srinivasan V. Selvaraj S. 2014. Phytopharmacological approach of free radical scavenging and anti-oxidative potential of eugenol and *ocimum gratissimum* linn. *Asian Pac J Trop Med* 7s1: S391-397.
- Majeed H, Antoniou J, Fang Z. 2014. Apoptotic effects of eugenol-loaded nanoemulsions in human colon and liver cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 15: 9159-9164.
- Syahri J. Yuanita E. Nurohah BA. Armunanto R. Purwono B. 2017. Chalcone analogue as potent anti-malarial compounds against *plasmodium falciparum*: synthesis, biological evaluation, and docking simulation study. *Asian Pac J Trop Biomed.* 7: 675-679.
- Syahri, J., Yuanita, E., Nurohmah, B.A., Wathon, M.H., Syafri, R., Armunanto, R., Purwono, B. 2017. Xanthone as antimalarial: QSAR analysis, synthesis, molecular docking and in-vitro antimalarial evaluation. *Orient. J. Chem.* 33, 29-40.
- World Health Organization. 2015, *Antimicrobial Resistance Report 2015*, WHO Press, Geneva, Switzerland.
- Yogalakshmi B. 2010. Investigation Of Antioxidant, Anti-Inflammatory And Dna-Protective Properties Of Eugenol In Thioacetamide-Induced Liver Injury In Rats. *Toxicology* 268: 204-212