

Original Article

**Skrining In Silico Potensi Essential oil Lengkuas Merah
sebagai Agen Antibakteri melalui Mekanisme Inhibisi
Enzim β -ketoacyl-ACP Synthase III (FabH)**

Septiatun Khasanah¹, Purbowatiningrum Ria Sarjono¹, Mukhammad Asy'ari^{1*}

¹Departemen Kimia, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro. Jl. Prof. Sudarto SH,
Tembalang, Semarang 50275

*Corresponding author: asyari@live.undip.ac.id

Received: 26 Mei 2024 / Accepted: 26 Juni 2024

Available online: 30 Juni 2024

Abstrak

Enzim FabH (Fatty Acid β -Ketoacyl ACP Synthase III) berperan penting dalam kehidupan bakteri yaitu sebagai biokatalis dalam biosintesis asam lemak. Inhibisi enzim FabH menyebabkan terhambatnya biosintesis asam lemak sehingga tidak terbentuk lipid bilayer membran sel, dan akhirnya menyebabkan kematian sel bakteri. Pada penelitian in silico dan in vitro enzim FabH sering menjadi protein target dari senyawa antibakteri. Beberapa senyawa Essential Oil (EO) dalam lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) terbukti memiliki aktivitas antibakteri, tapi mekanisme antibakterinya belum diketahui. Pada penelitian ini telah dilakukan tahapan skrining dan prediksi mekanisme antibakteri senyawa bioaktif EO lengkuas merah dalam menghambat enzim FabH. Berdasarkan skrining in silico awal menggunakan parameter Rule of Five (RO5) Lipinski dan nilai binding affinity berhasil diperoleh 2 senyawa bioaktif yang berpotensi sebagai antibakteri terbaik yaitu α -selinene dan β -cariophyllene. Hasil docking acak menunjukkan adanya kecenderungan senyawa bioaktif menempati kluster 3 pada permukaan protein FabH. Mekanisme inhibisi senyawa bioaktif diprediksi terjadi pada kluster 3 dan membentuk 3 jalur menuju sisi aktif enzim FabH. Berdasarkan hasil docking terarah menunjukkan bahwa α -selinene memiliki pola posisi, orientasi dan interaksi terbaik pada sisi aktif enzim FabH. Kekuatan interaksi α -selinene pada enzim FabH bakteri Gram positif (-7,4 kkal/mol) lebih kuat daripada Gram negatif (-6,9 kkal/mol). Berdasarkan nilai binding affinity yang lebih negatif dan kemampuan menghambat substrat lebih baik maka α -selinene diprediksi memiliki potensi sebagai agen antibakteri lebih kuat daripada β -cariophyllene. Berdasarkan hasil analisis boxplot dan statistika deskriptif menunjukkan bahwa nilai rata-rata binding affinity α -selinene lebih negatif dan pola distribusi lebih homogen dan representatif daripada β -cariophyllene.

Kata Kunci: antibakteri, essential oil, lengkuas merah, β -ketoacyl-ACP synthase III (FabH), molecular docking.

1. Pendahuluan

Enzim FabH (*Fatty Acid β -Ketoacyl ACP Synthase III*) merupakan enzim yang berperan penting dalam proses biosintesis asam lemak di dalam sel bakteri. Jalur biosintesis asam lemak ini menjadi salah satu target penghambatan dari senyawa obat antibakteri melalui mekanisme inhibisi terhadap enzim FabH. Jika enzim FabH terhambat maka proses biosintesis asam lemak akan terganggu sehingga bakteri akan lisis atau mati [1]. Beberapa penelitian di bidang biologi molekuler sudah menggunakan enzim FabH sebagai target dari obat antibakteri. Alam (2016) [2] dan Frojuello dkk. (2016) [3] melaporkan bahwa enzim FabH dapat dijadikan sebagai target dari senyawa obat antibakteri.

Komponen bioaktif lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) adalah minyak atsiri (*essential oil*) sekitar 97,69 % [4]. Mayachiew dan Devahastin, 2008 telah melaporkan bahwa beberapa senyawa turunan EO seperti 1.8 cineol, chavicol, α -pinen dan linalool memiliki aktivitas antibakteri tinggi. Burt (2004) menunjukkan bahwa senyawa geraniol, β -caryophyllene, dan camphor terlibat pada mekanisme kematian sel bakteri [5]. Rialita dkk. (2015) melaporkan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) terhadap bakteri patogen secara berturut-turut adalah *B. cereus* > *E. coli* > *S. typhimurium* > *P. Aeruginosa* [6]. Mekanisme senyawa antibakteri dapat terjadi melalui beberapa

Doi:

cara yaitu merusak dinding sel, menghambat produksi ATP, menghambat jalur biosintesis asam lemak dan inhibisi reaksi enzimatis [7,8].

Essential oil sebagai agen antibakteri banyak diterapkan sebagai pengawet alami dalam proses pengendalian kontaminasi makanan. Pengawet alami memiliki sifat dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri patogen yang mengkontaminasi bahan pangan [5]. Sifatnya yang aman sebagai bahan pangan menjadikannya memiliki status GRAS (*Generally Recognize As Safe*) [9]. Ketersediaan lengkuas di Indonesia yang mencapai 58.186,488 ton per tahun (BPS 2012) menjadikan lengkuas merah menjadi salah satu sumber EO yang potensial [6].

Penelitian secara *in vitro* tentang sifat antibakteri senyawa *essential oil* di dalam lengkuas merah sudah banyak dilakukan tetapi penjelasan tentang mekanisme interaksinya masih belum banyak diketahui. Banyaknya senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri maka perlu skrining secara *in silico* menggunakan parameter *Rule of Five* (RO5) Lipinski, *binding affinity* dan interaksi molekuler. Penentuan interaksi dan nilai *binding affinity* dilakukan dengan metode *molecular docking* menggunakan program Autodock vina. Pola interaksi ligan-protein dianalisis berdasarkan data *docking* acak menggunakan metode *clustering*. Penentuan posisi, orientasi dan nilai *binding affinity* ligan-ligan di dalam sisi aktif dilakukan berdasarkan data *docking* terarah. Data dianalisis secara visual (2-dimensi dan 3-dimensi). Analisis data *binding affinity* dan RMSD diolah dengan program statistika deskriptif. Pemilihan senyawa bioaktif sebagai kandidat obat antibakteri didasarkan pada senyawa bioaktif dengan *binding affinity* paling negatif. Analisis terhadap pola interaksi ligan-ligan pada area di sekitar sisi aktif akan mendapatkan prediksi mekanisme jalur masuk ligan menuju sisi aktif enzim FabH.

2. Metode Penelitian

2.1. Alat dan Bahan

Alat: Alat yang digunakan adalah perangkat keras: Komputer, perangkat lunak: Autodock vina yang terintegrasi dalam perangkat lunak PyRx 0.8 Tools, USCF Chimera 1.11.12, Ligplot+ dan SigmaPlot 13.0, Marvin Sketch, Open Babael GUI, program web server: <http://www.chemspider.com/>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>, <http://www.scfbio-iitd.res.in>, <http://swissmodel.expasy.org>, <http://MolProbity.biochem.duke.edu/index.php>

Bahan: Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah file struktur 3-dimensi protein dan ligan yang terdiri dari: **Protein:** β -ketoacyl-ACP synthase III (FabH) bakteri Gram negatif dengan kode pdb 1HNH (*open*) dan Rantai A 1HN9 (*close*). Kode pdb bakteri Gram positif adalah Rantai A 3IL5 (*open*) dan Rantai A 3IL7 (*close*). **Ligan:** - Ligan standar: CoA, B82, Ciprofloxacin, ligan sampel: *a-pinene*, *Chavicol*, *1,8-cineole*, *Linalool*, *Nerol*, *Geraniol*, *a-selinene*, β -*caryophyllene*, *ar-curcumene*

2.2. Cara Kerja

2.2.1 Preparasi dan Validasi Struktur 3-dimensi Protein FabH

Struktur dari protein FabH bakteri Gram positif (*Enterococcus faecalis*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*) dapat didownload melalui situs www.rcsb.org/pdb. Validasi struktur dilakukan dengan cara masuk ke web MolProbity untuk mendapatkan struktur 3D kode pdb: 1HNH, 1HN9, 3IL5 dan 3IL7.

2.2.2 Preparasi dan Validasi Struktur 3-dimensi ligan

Preparasi ligan dilakukan dengan mengunduh struktur ligan dari <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>; <http://www.chemspider.com> kedua web tersebut menyediakan berbagai struktur bahan alam dalam 3 dimensi.

2.2.3 Uji Simulasi Molecular Docking

Terdapat 2 perlakuan *docking* yaitu *docking* acak dan *docking* terarah. Program yang digunakan adalah Autodock Vina yang terintegrasi dengan program Pyrx Tool. Hasil dari *docking* adalah *binding affinity* (BA) dan nilai RMSDUB/LB.

2.2.4 Analisis dan Visualisasi

Analisis dan visualisasi dilakukan pada data hasil *docking* ligan-protein berupa pengelompokan data (klaster) pada permukaan protein. Nilai *binding affinity* (BA), Root Mean Square Deviation (RMSD) dan statistika deskriptif di analisis menggunakan program USCF Chimera 1.11.2, LIGPLOT + dan program statistik menggunakan program Sigmaplot 13.0.

3. Hasil dan Pembahasan

3.1. Skrining Potensi Antibakteri Senyawa Essensial Oil dalam Lengkuas Merah

Skrining potensi antibakteri senyawa bioaktif (ligan) dilakukan berdasarkan aturan Lipinski, nilai *binding affinity* dan interaksi molekuler bioaktif-protein. Hasil skrining awal berdasarkan aturan Lipinski *Rule of Five* (RO5) menunjukkan bahwa bahwa semua ligan sampel memenuhi syarat aturan Lipinski seperti disajikan pada Tabel III.1.

Senyawa ligan yang memenuhi aturan RO5 Lipinski menunjukkan adanya kemiripan dengan sifat senyawa obat yaitu dapat larut dalam darah dan menembus membran sel. Persyaratan aturan lipinski meliputi jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 , berat molekul ≤ 500 , dan $\log P$ -0,4 – 5 [10, 11].

Doi:

Tabel III.1: Hasil perhitungan Rule of Five (RO5) Lipinski dari ligan sampel

No	Ligan	BM ¹	Log P	DIH ²	AIH ³	RM ⁴
1.	<u><i>α-pinene</i></u>	132	1,84	0	0	38,23
2.	<u>Chavicol</u>	134	2,12	1	1	42
3.	Camphor	152	2,4	0	1	44,24
4.	<i>1,8-cineole</i>	154	2,74	0	1	45,53
5.	Linalool	154	2,67	1	1	49,49
6.	Nerol	154	2,67	1	1	49,5
7.	Geraniol	154	2,67	1	1	49,5
8.	<i>α-selinene</i>	204	4,72	0	0	66,74
9.	<i>β-caryophyllene</i>	206	4,8	0	0	66,77
10.	<i>ar-curcumene</i>	202	4,85	0	0	68,25

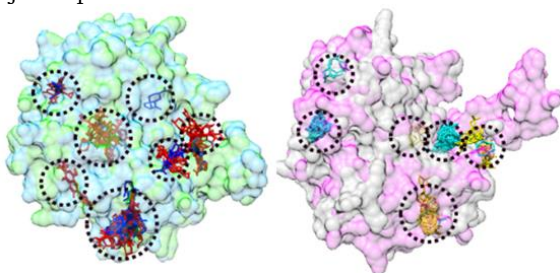
Keterangan:

¹= Berat molekul (g/mol), ²= Donor ikatan hidrogen (Hydrogen bond donor), ³= Akseptor ikatan hidrogen (Hydrogen bond acceptor), ⁴= Refractory molar

Hasil skrining selanjutnya menunjukkan bahwa *α-selinene* dan *β-caryophyllene* memiliki nilai *binding affinity* lebih negatif dan jumlah interaksi molekuler lebih banyak dibandingkan dengan ligan-ligan lainnya. Nilai *binding affinity* dan jumlah interaksi molekuler ligan-protein pada bakteri Gram negatif adalah *α-selinene* -6,9 kkal/mol dan berinteraksi hidrofobik dengan 12 residu aktif; *β-caryophyllene* -6,7 kkal/mol dan berinteraksi hidrofobik dengan 10 residu aktif. Pada bakteri Gram positif *α-selinene* -7,4 kkal/mol dan berinteraksi hidrofobik dengan 12 residu aktif; *β-caryophyllene* -7,4 kkal/mol dan berinteraksi hidrofobik dengan 11 residu aktif.

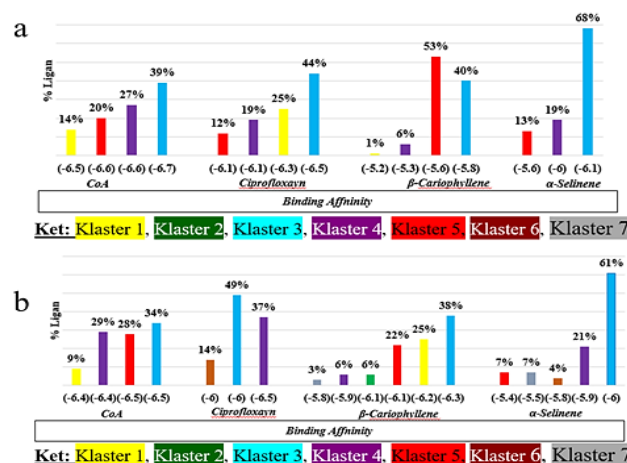
3.2. Pola Interaksi Ligan-Protein Hasil Docking Acak pada Single Chain FabH

Pola interaksi ligan-protein ditentukan berdasarkan metode klustering yaitu pengelompokkan berdasarkan posisi interaksi ligan-ligan hasil docking acak pada permukaan protein. Pola kluster dari ligan-ligan pada permukaan protein single chain FabH untuk bakteri Gram negatif dan Gram positif membentuk 7 dan 6 kluster seperti disajikan pada Gambar III.1.



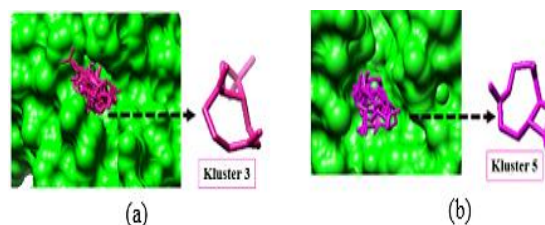
Gambar III.1 Posisi kluster docking acak ligan-protein bakteri (a). Gram negatif (b). Gram positif

Berdasarkan Gambar III.2 menunjukkan bahwa mayoritas ligan sampel menempati posisi kluster 3 baik pada protein *open* maupun *close*.



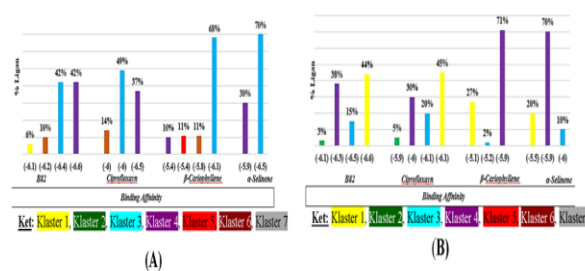
Gambar III.2 Pola kluster ligan pada FabH struktur (a) *open* dan (b) *close* bakteri Gram negatif.

Berbeda dengan ligan *β-cariophyllene* yang lebih banyak berada pada kluster 5 protein *open*. Perbedaan tersebut dikarenakan bentuk molekul *β-cariophyllene* yang lebih lebar (Gambar III.3).



Gambar III.3 Penempatan ligan pada kluster 3 & 5 FabH *open* bakteri Gram negatif, (a). *α-selinene* (b). *β-cariophyllene*.

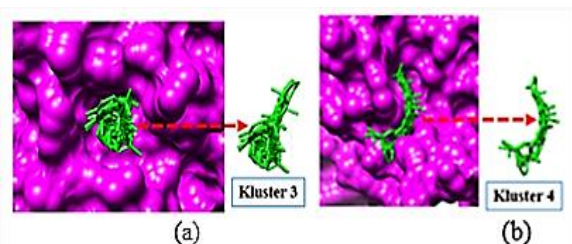
Hasil analisis pola kluster pada bakteri Gram positif menunjukkan bahwa mayoritas ligan



Gambar III.4 Pola kluster ligan pada FabH struktur (A) *open* dan (B) *close* bakteri Gram positif.

menempati kluster 3 pada FabH *open* dan kondisi sebaliknya terjadi pada FabH *close* (Gambar III.4).

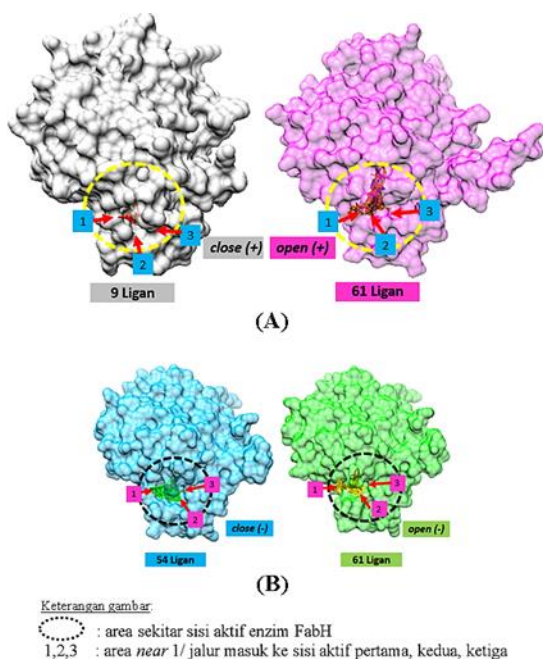
Perbedaan pola kluster tersebut dikarenakan struktur FabH *open* lebih terbuka dibandingkan *close* (Gambar III.5).



Gambar III.5 Penempatan *a-selinene* pada kluster 3 dan 4 permukaan enzim FabH (a). *open* dan (b). *close* bakteri Gram positif.

3.3. Prediksi Mekanisme Interaksi Ligan-Protein di Jalur Menuju Sisi Aktif

Prediksi mekanisme interaksi ligan-protein di jalur menuju sisi aktif merupakan tahap awal dalam memprediksi mekanisme inhibisi enzim FabH. Prediksi dilakukan berdasarkan hasil pengamatan terhadap posisi ligan di area sekitar sisi aktif (*near*) dan tumpang tindih (*overlap*) dengan residu sisi aktif. Hasil analisis terhadap posisi ligan-ligan pada area di sekitar sisi aktif FabH struktur *close* dan *open* menunjukkan adanya 3 jalur masuk.



Gambar III.6 Mekanisme interaksi ligan *a-selinene* di jalur menuju sisi aktif enzim FabH bakteri (A). Gram positif (B). Gram negatif.

Pada bakteri Gram positif perbandingan jumlah ligan yang dapat masuk ke sisi aktif pada struktur *close* dan *open* berbeda secara signifikan yaitu 9 dan 61 ligan, (Gambar III.6.a), hal ini dikarenakan konformasi sisi aktifnya berbeda. Adapun, hasil pada bakteri Gram negatif menunjukkan jumlah ligan yang mirip yaitu 54 dan 61 ligan (Gambar III.6.b).

Berdasarkan data posisi-orientasi terbaik dan nilai *binding affinity* paling negatif ligan-ligan di sekitar sisi aktif protein FabH jumlah ligan yang

dapat masuk ke sisi aktif banyak dan *binding affinity* yang negatif (Tabel III.1 dan Tabel III.2) dapat disimpulkan bahwa *a-selinene* terbaik dan diprediksikan penghambatan bakteri memiliki interaksi yang kuat.

Tabel III.1 Data posisi-orientasi dan *binding affinity* ligan-ligan di sekitar sisi aktif protein FabH bakteri Gram negatif

Posisi	<i>a-selinene</i>		<i>β-cariophyllene</i>	
	<i>close</i>	<i>open</i>	<i>close</i>	<i>open</i>
<i>Overlap</i>	9	10	10	9
	-6,5*	-6,9*	-6,5*	-6,7*
<i>Near</i>	45	51	34	27
	-5,9*	-5,9*	-5,8*	-5,6*
Jumlah	54	61	44	36

Tabel III.2 Data posisi-orientasi dan *binding affinity* ligan-ligan di sekitar sisi aktif protein FabH bakteri Gram positif

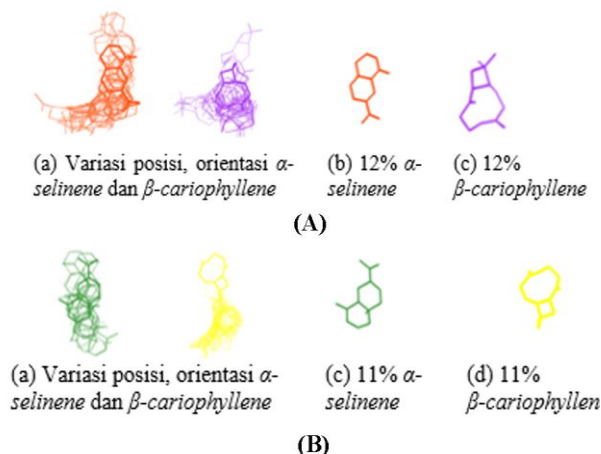
Posisi	<i>a-selinene</i>		<i>β-cariophyllene</i>	
	<i>close</i>	<i>open</i>	<i>close</i>	<i>open</i>
<i>Overlap</i>	8	9	2	9
	-6,0*	-7,4*	-5,2*	-7,4*
<i>Near</i>	1	54	0	52
	-6*	-6,3*	-	-5,9*
Jumlah	9	63	2	61

Keterangan: (*) = (kkal/mol)

3.4. Posisi, Orientasi dan Binding Affinity Interaksi Ligan-Protein pada Sisi Aktif

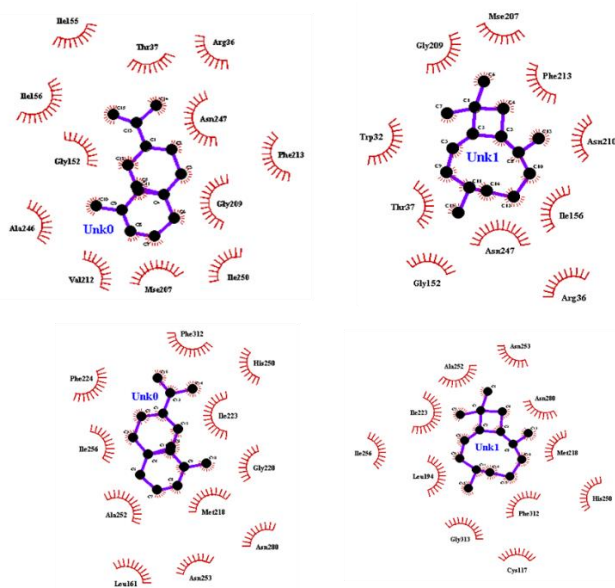
Berdasarkan hasil *docking* terarah menunjukkan bahwa *a-selinene* merupakan ligan terbaik karena memiliki variasi posisi dan orientasi lebih homogen dibandingkan *β-cariophyllene*. Variasi posisi dan orientasi *a-selinene* dan *β-cariophyllene* ditunjukkan oleh bentuk ligan dengan garis tipis yang sesuai dengan variasi nilai RMSD (*Root Mean Square Deviation*) dari ligan-ligan hasil *docking* terarah (Gambar III.8.1.a dan III.8.2.a). Posisi dan orientasi terbaik *a-selinene* dan *β-cariophyllene* pada FabH bakteri Gram negative dan Gram positif sama yaitu sekitar 11-12% (Gambar III.8.1.b.c dan III.8.2. (Gambar III.8.1.b;c dan III.8.2.b;c).

Penggambaran struktur 2-dimensi juga menunjukkan bahwa *a-selinene* distabilkan oleh adanya interaksi hidrofobik dengan residu-residu di sisi aktif FabH (Gambar III.8).



Gambar III.7 Posisi dan orientasi ligan pada sisi aktif FabH *open* bakteri (A). Gram negatif dan (B). Gram positif.

Analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa meskipun α -selinene dan β -cariophyllene memiliki nilai binding affinity dan jumlah residu aktif hampir sama, tapi α -selinene mampu berinteraksi dengan residu-residu aktif yang sama dengan substrat enzim FabH yaitu 2-((4-bromo-3-((diethylamino)sulfonyl) benzoyl)amino)benzoic acid (kode: B82).



Gambar III.8 Interaksi α -selinene dengan residu-residu di sisi aktif FabH.

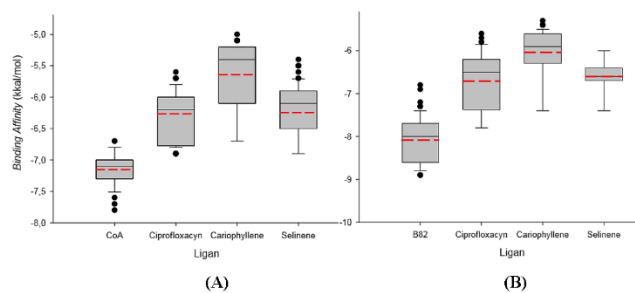
Hasil analisis menunjukkan bahwa α -selinene memiliki potensi antibakteri lebih baik karena mampu menghambat pengikatan substrat B82 (Tabel III.3).

Tabel III.3: Nilai *binding affinity* dan interaksi molekuler

L-P	BA*	Interaksi Hidrofobik (Jumlah residu aktif)		
A	-6,9	Arg36	Thr37	Ile156
		Arg247	Gly209	Phe213
		Gly209	Ala246	Gly152
		Ile155	Val212	Ile250
		(12 residu aktif)		
B	-6,7	Arg36	Trp32	Asn210
		Asn247	Ile156	Mse207
		Gly209	Thr37	Gly152
		Phe312		
		(10 residu aktif)		
C	-7,4	Phe312,	His250	Ile223
		Gly220,	Met218	Asn280
		Ala252,	Ile256	Phe224
		Asn253	Leu161	
		(11 residu aktif)		
D	-7,4	Ile223	Ile256	Leu194
		Gly313	Cys117	Phe312
		His250	Asn253	Asn280
		Met218	Ala252	
		(11 residu aktif)		

Ket: L=Ligan, P=Protein, (*)=(kcal/mol), A=1HNH- α -selinene, B=IHNH- β -cariophyllene, C=3IL5- β -cariophyllene, D= 3IL5- α -selinene

Berdasarkan hasil analisis boxplot menunjukkan bahwa persebaran data-data nilai *binding affinity* α -selinene terkonfirmasi lebih negatif (posisi boxplot lebih rendah) dari pada β -cariophyllene (Gambar III.9). Hasil tersebut menunjukkan bahwa α -selinene memiliki interaksi lebih kuat.



Gambar III.9 Analisis boxplot pola distribusi data nilai binding affinity interaksi ligan-protein open (a). Gram negatif dan (b). Gram positif

Hasil analisis statistika deskriptif RMSD pada protein *open* bakteri Gram positif menunjukkan bahwa α -selinene memiliki nilai standar deviasi dan standar error yang lebih kecil daripada β -cariophyllene (Tabel III.4). Hasil tersebut menunjukkan bahwa α -selinene mengalami perubahan posisi dan orientasi yang lebih homogen dan representatif. Kondisi sebaliknya terjadi pada bakteri Gram negatif (Tabel III.5).

Doi:

Tabel III.4: Analisis deskriptif nilai RMSD protein *open* Gram positif

	CoA	Cipro	β -cario	<i>a-sel</i>
	<u>RMSD ub</u>			
SD	1,089	3,131	2,800	1,814
SE	0,123	0,472	0,304	0,211
	<u>RMSD lb</u>			
SD	0,788	1,790	1,861	0,809
SE	0,0887	0,270	0,202	0,094

Ket: SD = Standar deviasi, SE = Standar error**Tabel III. 5:** Analisis deskriptif nilai RMSD protein *open* Gram negatif

	CoA	Cipro	β -cario	<i>a-sel</i>
	<u>RMSD ub</u>			
SD	2,416	2,385	1,603	1,983
SE	0,392	0,267	0,175	0,237
	<u>RMSD lb</u>			
SD	1,536	1,365	0,848	1,001
SE	0,249	0,155	0,0926	0,120

Ket: SD = Standar deviasi, SE = Standar error

4. Kesimpulan

Hasil skrining *in silico* awal berdasarkan perhitungan *Rule of Five* (RO5) Lipinski dan nilai binding affinity dari 10 ligan sampel diperoleh 2 ligan yang berpotensi sebagai antibakteri yaitu α -selinene dan β -cariophyllene. Hasil analisis docking secara acak pada single chain menunjukkan adanya kecenderungan ligan menempati klaster 3 pada protein FabH. Mekanisme inhibisi FabH oleh senyawa EO (ligan) diprediksi terjadi di klaster 3 dan melalui 3 jalur menuju sisi aktif FabH. α -selinene merupakan ligan yang memiliki pola posisi, orientasi dan interaksi terbaik pada sisi aktif FabH. Pola interaksi α -selinene pada bakteri Gram positif lebih kuat daripada Gram negatif dengan nilai binding affinity -7,4 kkal/mol dan -6,9 kkal/mol. Berdasarkan nilai binding affinity negatif dan jumlah interaksi molekuler banyak maka α -selinene diprediksi sebagai agen antibakteri terkuat terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Berdasarkan hasil analisis boxplot dan statistika deskriptif menunjukkan bahwa nilai rata-rata binding affinity α -selinene lebih negatif dan pola distribusi relatif lebih homogen dan representatif daripada β -cariophyllene.

Daftar Pustaka

1. Mckinney, D. C., Eyermann, C. J. Gu, R. Hu, J., Kazmirski, S. L., Lahiri, S. D., dan Breault, G., 2016, Antibacterial FabH Inhibitors with Mode of Action Validated in *Haemophilus influenzae* by

in vitro Resistance Mutation Mapping, *Infectious Diseases*, American

2. Alam, M. S., Jebin, S., Rahman, M. M., dan Bari, L., 2016, Original article: Biological and Quantitative-Sar Evaluation, *EXCLI Journal*, 15, 350–361
3. Projuello, M., Bernstorff, C., Miyata, M., dan Augusto, O., 2016, New antibacterial agents: Hybrid bioisoster derivatives as potential E. coli FabH inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26, 3988–3993
4. Santos, G. K. N., Dutra, K. A., Barros, R. A., Claudio, A. G., Lira, D. D., Gusmão, N. B., dan Navarro, D. M. A. F., 2012, Essential oils from *Alpinia purpurata* (Zingiberaceae): Chemical composition, oviposition deterrence, larvicidal and antibacterial activity, *Industrial Crops and Product*, 40, 254–260
5. Burt, S., 2004, *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review*, *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223–253
6. Rialita, T., Rahayu, W.P., Nuraida, L., dan Nurtama, B., 2015, Aktivitas Antimikroba Minyak Esensial Jahe Merah (*Zingiber Officinale* Var. *Rubrum*) Dan Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata* K. Schum) Terhadap Bakteri Patogen Dan Perusak Pangan, *Agritech*, 35, 43–5
7. Nazzaro, F., Fratianni, F., dan Martino, L. De., 2013, Effect of Essential oils on Pathogenic Bacteria, *Pharmaceuticals*, 6, 1451–1474
8. Dzidic, S., Suskovic, J., dan Kos, B., 2008, Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects, *Antibiotic Resistance in Bacteria, Food Technol Biotechnol*, 46 (1), 11–21
9. Ibrahim, S., 2010, Antimicrobial herb and spice compounds in food, *Food Control*, 1199–1218
10. Almi, Z., Belaidi, S., Lanez, T., dan Tchouar, N., 2014, Structure Activity Relationships ,QSAR Modeling and Drug-like calculations of TP inhibition of 1, 3, 4-oxadiazoline-2-thione Derivatives, *Internationan Letter of Chemistry, Physick and Astronomy*, 37, 113–124
11. Lipinski, C. A., et.al, (2001), Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3–2