

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Enhalus acoroides merupakan tumbuhan laut yang banyak mengandung senyawa bioaktif atau metabolit sekunder seperti tanin, saponin, triterpenoid, flavonoid, dan steroid yang memiliki aktivitas antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri. Banyak metabolit sekunder dari lamun yang telah diketahui aktif secara biologis dan merupakan biomedis penting yang dapat digunakan sebagai obat. Untuk itu, penelitian ini bertujuan mengetahui tingkat toksisitas dari ekstrak kental pada senyawa tanaman lamun (*Enhalus acoroides*), mengidentifikasi kandungan senyawa tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) hasil ekstraksi, dan mengetahui kemampuan senyawa yang terkandung dalam tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) sebagai obat anti tuberculosis melalui pendekatan penambatan secara *docking in silico*.

Pada penelitian ini dilakukan beberapa tahapan yaitu pembuatan simplisia *Enhalus acoroides* dengan ukuran 30-35 mesh, pembuatan ekstrak sampel *Enhalus acoroides* dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut metanol selama 3x24 jam yang kemudian dilakukan pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dan penguapan pelarut. Selanjutnya, ekstrak kental *Enhalus acoroides* dilakukan uji toksisitas *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk mengetahui keaktifan kandungan metabolit sekunder melalui nilai LC₅₀. Lalu filtrat *Enhalus acoroides* dilakukan pengujian kualitatif flavonoid dengan uji fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis serta pengujian *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) untuk mengidentifikasi kandungan senyawa-senyawa metabolit sekunder yang berada pada filtrat *Enhalus acoroides*.

Potensi keaktifan sebagai senyawa obat dilakukan pendekatan penambatan molekul melalui metode *Docking in Silico* dengan beberapa protein bakteri mTB target. Hal ini ditujukan untuk memprediksi interaksi senyawa *Enhalus acoroides* dengan protein target atau reseptor, protein target yang terikat pada senyawa obat akan berubah fungsi dan aktifitasnya (Pitaloka et al., 2019; Rochmat et al., 2020).

Ikatan senyawa - protein target ditandai dengan nilai kekuatan ikatan (*binding affinity*) dalam satuan kkal/mol.

4.1 Ekstraksi *Enhalus acoroides*

Sebelum dilakukan ekstraksi, terlebih dahulu dilakukan pembuatan simplisia *Enhalus acoroides*. Pertama-tama sampel basah *Enhalus acoroides* ditimbang dan dicuci dengan menggunakan air mengalir sampai tidak terdapat lendir dan kotoran-kotoran lain. Lalu dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3-7 hari hingga sampel tidak mengalami perubahan massa dan memiliki kadar air kurang dari 10%. Pengeringan dilakukan hingga kadar air kurang dari 10% bertujuan untuk mencegah tumbuhnya bakteri dan jamur pada tahap penyimpanan (Dharma dkk., 2020). Jumlah kadar air yang rendah membuat bahan akan lebih tahan disimpan dalam jangka waktu yang relatif lama sehingga kemungkinan rusak karena jamur pada saat penyimpanan sangat kecil. Apabila kandungan air yang terkandung dalam suatu bahan berkisar antara 3-7%, maka kestabilan optimum bahan akan tercapai, dengan demikian pertumbuhan mikroba dapat dikurangi sehingga dapat memperpanjang masa simpan tanaman kering (Manuhuttu dan Saimima, 2021).

Selain itu, pengeringan hingga kadar air kurang dari 10% merupakan syarat mutu sebagaimana tercantum dalam Materia Medika Indonesia dan Farmakope Herbal Indonesia yang disahkan dalam Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional dan Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Pengeringan dilakukan di bawah sinar matahari karena menghindari rusaknya senyawa yang ada pada sampel.

Kemudian simplisia *Enhalus acoroides* dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 30 dan 35 *mesh*. Untuk memperluas area kontak antara sampel dengan pelarut ekstraksi maka digunakan sampel berupa serbuk halus. Pengecilan ukuran partikel simplisia berpengaruh terhadap jumlah senyawa yang akan terekstrak. Semakin kecil ukuran partikel

simplisia yang diekstrak, maka luas permukaan kontak dengan pelarut semakin besar, sehingga senyawa yang kepolarannya sama dengan pelarut akan terekstrak atau tertarik lebih optimal (Wilantari dkk., 2018). Simplisia *Enhalus acoroides* yang didapatkan dapat dilihat pada Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Simplisia *Enhalus acoroides*

Metode ekstraksi maserasi dilakukan pada 135 g simplisia *Enhalus acoroides* menggunakan pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 (w/v) pada gelas beker 1000 ml tertutup yang dilakukan secara berulang selama 3x24 jam pada suhu ruang. Metode ekstraksi maserasi digunakan karena prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, relatif mudah dan murah, terhindar dari rusaknya komponen senyawa yang tidak tahan panas, dan terjadinya kontak antara sampel dengan pelarut yang cukup lama memudahkan pelarut untuk mengikat senyawa yang ada pada sampel (Susanty, 2016). Pemilihan pelarut metanol didasarkan pada sifat polaritasnya yang cocok untuk mengekstraksi *Enhalus acoroides* yang lebih banyak mengandung senyawa aktif yang bersifat polar dibandingkan non polar (Noor dkk., 2022). Penelitian sebelumnya oleh Permana dkk (2020) telah menunjukkan bahwa metanol merupakan pelarut terbaik yang mampu mengekstraksi kandungan senyawa bioaktif secara maksimal pada sampel daun lamun *Enhalus acoroides* dengan rendemen sebesar 20,1%. Penelitian lain yang dilakukan oleh Nurafni dan Rinto (2018) menghasilkan rendemen yang lebih tinggi ketika *Enhalus acoroides* diekstraksi menggunakan pelarut metanol yaitu sebesar 9,55%. Pada penelitian yang dilakukan oleh Dewi dkk (2018) juga menghasilkan rendemen yang lebih tinggi yaitu sebesar 1,125% dan 1,1725%, ketika *Enhalus*

acoroides diekstraksi menggunakan pelarut metanol. Metode ekstraksi maserasi yang dilakukan dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Ekstraksi Maserasi *Enhalus acoroides*

Pemisahan antara filtrat dan residu (padatan) dilakukan dengan penyaringan secara langsung menggunakan kertas saring. Hasil filtrat yang didapatkan dari ekstraksi maserasi sebanyak 2,42 L. Setelah itu filtrat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dan dilakukan penguapan pelarut sehingga diperoleh ekstrak kental 0,6 g dengan rendemen sebesar 0,4%. Ekstrak *Enhalus acoroides* yang terbentuk dapat dilihat pada Gambar 4.3. Proses evaporasi dengan *rotary evaporator* dilakukan pada suhu 40°C karena komponen bioaktif yang ingin diambil yaitu flavonoid tidak tahan terhadap suhu tinggi di atas 50°C dan pada suhu yang lebih tinggi akan terjadi perubahan struktur serta menghasilkan ekstrak yang rendah (Yuliantari dkk., 2017). Hal ini didukung oleh penelitian yang dilakukan Angraini dkk (2023) dimana ekstrak yang dihasilkan dari proses evaporasi pada suhu 40°C lebih banyak yaitu 45,62 gram dengan persen rendemen 15,21% dibandingkan dengan ekstrak yang diperoleh dari proses evaporasi dengan suhu 65°C yang hanya 37,2 gram dengan persen rendemen 12,40%.



Gambar 4.3 Ekstrak *Enhalus acoroides*

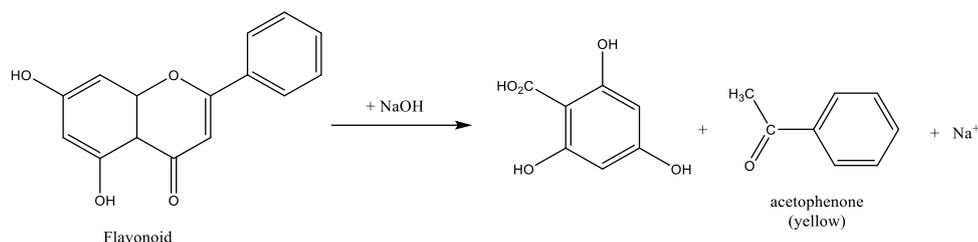
4.2 Identifikasi Senyawa Flavonoid Melalui Uji Fitokimia

Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa fenolik yang berpotensi untuk dijadikan obat untuk pencegahan penyakit karena memiliki aktivitas antiinflamasi, antikanker, antibakteri dan antioksidan (Guven dkk., 2019). Selain itu mekanisme flavonoid sebagai antioksidan memiliki kemampuan menangkap radikal bebas (Yadnya Putra dkk., 2020). Proses identifikasi senyawa flavonoid melalui uji fitokimia dilakukan dengan dua metode yaitu menambahkan 2-4 tetes NaOH 10% pada 1 ml filtrat *Enhalus acoroides* dan 2-4 tetes H₂SO₄ pada 1 ml filtrat *Enhalus acoroides*. Lalu dikocok dengan kuat sampai terjadi perubahan warna menjadi kuning, jingga, merah ataupun coklat yang menandakan keberadaan senyawa flavonoid.



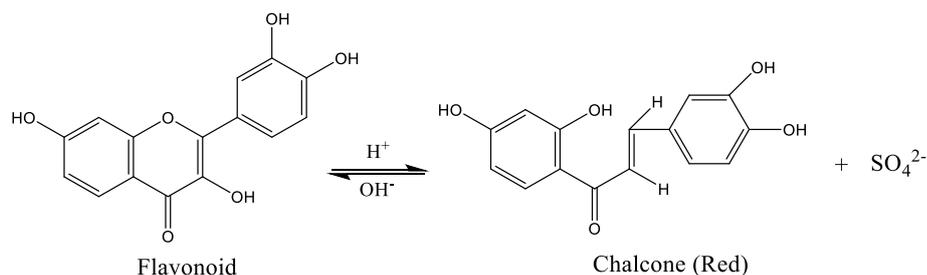
Gambar 4.4 Hasil Uji Fitokimia *Enhalus acoroides*

Pereaksi NaOH 10% digunakan untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya flavonoid, yaitu golongan fenol (Nurjannah dkk., 2022). Berdasarkan Gambar 4.4 menunjukkan bahwa *Enhalus acoroides* positif mengandung flavonoid karena terjadi perubahan warna hijau muda menjadi kuning setelah ditetesi NaOH 10%. Diperoleh juga hasil positif menggunakan pereaksi NaOH 10% pada penelitian yang dilakukan oleh Nurjannah dkk (2022), hasil positif dikarenakan ekstrak mengalami perubahan warna yang mengindikasikan terbentuknya senyawa asetofenon saat sampel direaksikan dengan NaOH. Senyawa kristin yang merupakan turunan dari senyawa flavon pada penambahan NaOH 10% mengalami penguraian oleh basa kuat menjadi molekul seperti asetofenon yang berwarna kuning karena adanya pemutusan ikatan pada struktur isoprene (Kusnadi & Devi, 2017). Adapun reaksi yang terjadi antara flavonoid dengan NaOH dapat dilihat pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Reaksi Flavonoid dengan NaOH (Fransina dkk., 2019)

Selain itu, hasil positif juga ditunjukkan oleh perubahan warna hijau muda menjadi warna coklat kehitaman setelah ditetesi H_2SO_4 (pekat). Hal ini menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara H_2SO_4 (pekat) dan flavonoid yang menyebabkan terbentuknya senyawa kompleks yang menimbulkan warna merah tua sampai coklat kehitaman pada sampel (Asih, 2009). Adapun reaksi yang terjadi antara flavonoid dengan H_2SO_4 dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Reaksi Flavonoid dengan H_2SO_4 (Kusnadi & Devi, 2017)

4.3 Karakterisasi Senyawa Berdasarkan Panjang Gelombang Maksimum

Pengujian panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan spektrofotometri UV-Vis untuk menentukan kromofor dalam sampel *Enhalus acoroides*. Kromofor merupakan gugus fungsional dalam suatu molekul yang memiliki kemampuan menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu dalam spektrum ultraviolet (UV) dan cahaya tampak (Vis). Identifikasi senyawa flavonoid menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis mampu memberikan serapan dan spektrum sinar tampak dari gugus aromatik terkonjugasi (Helmidanora Rusdiati dkk., 2020). Sumber UV dan *Visible* adalah dua sumber sinar yang berbeda yang digunakan pada instrumen ini. Panjang gelombang pada daerah *ultraviolet* (UV)

adalah 180-380 nm sedangkan pada daerah *visible* adalah 380-780 nm (Warono dan Syamsudin, 2019). Adapun rentang serapan spektrum flavonoid pada UV-Vis dapat dilihat pada Tabel 4.1.

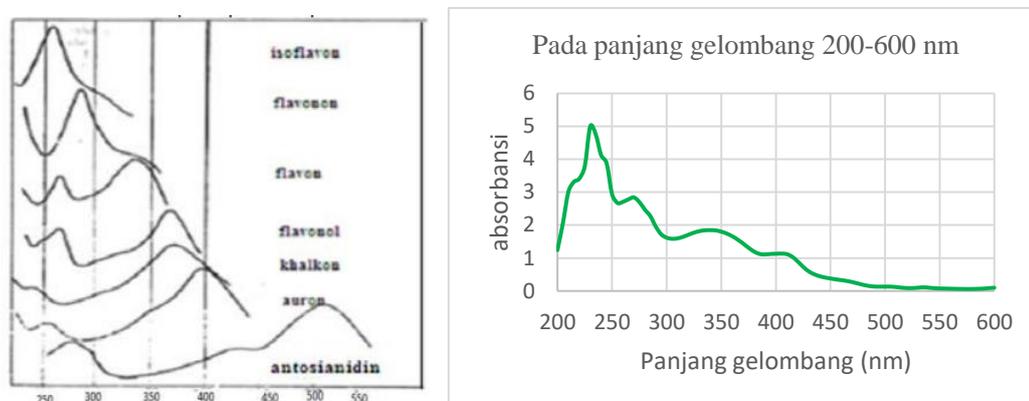
Tabel 4.1 Rentang Panjang Gelombang Flavonoid (Markham, 1988)

No	Jenis Flavonoid	Pita I (nm)	Pita II (nm)
1.	Flavon	310 – 350	250 – 280
2.	Flavonol (3-OH tersubstitusi)	330 – 360	250 – 280
3.	Flavonol (2-OH bebas)	350 – 385	250 – 280
4.	Isoflavon	310 – 330 bahu kira- kira 320 puncak	245 – 275
5.	Flavanon dan dihidroflavonol	300 – 330 bahu	275 – 295
6.	Kalkon	340 – 390	230 – 270
7.	Auron	380 – 430	230 – 270 (kekuatan rendah)
8.	Antosianidin dan antosianin	465 – 560	270 – 280

Pengujian ini dilakukan pada rentang panjang gelombang 200-600 nm, dengan cara memasukkan campuran filtrat *Enhalus acoroides* dan metanol 1:2 (v/v) pada kuvet. Dari Pengujian yang dilakukan, didapatkan hasil yang dapat dilihat pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Data Panjang Gelombang Serapan Maksimum *Enhalus acoroides*

Pelarut	λ maks (nm)	absorbansi
Metanol	231,682	5,000
	268,953	2,845
	339,070	1,847

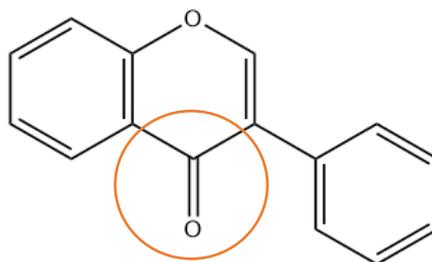


(a)

(b)

Gambar 4.7 Perbandingan Spektrum UV-Vis Senyawa Flavonoid Berdasarkan (a) Markham, 1988 dengan (b) Hasil Spektrofotometri Uv-Vis *Enhalus acoroides*

Gambar 4.7 (b) menunjukkan pola penyerapan sampel pada rentang panjang gelombang yang diamati yaitu 200-600 nm, terdapat tiga puncak penyerapan dengan pola penyerapan sampel yang memiliki kemampuan untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang tertentu. Puncak-puncak penyerapan yang teramati menunjukkan adanya senyawa atau molekul tertentu dalam sampel. Hasil analisis didapatkan penyerapan pada panjang gelombang 231,682 nm (Pita II), 268,953 nm (Pita II), dan 339,070 nm (Pita I) yang menunjukkan bahwa *Enhalus acoroides* mengandung senyawa flavonoid golongan Isoflavon. Hal tersebut dapat dilihat dari Gambar 4.7 (b) yang memiliki bentuk hasil spektrum mirip dengan spektrum Isofavon pada Gambar 4.7 (a). Selain puncak-puncak penyerapan, grafik tersebut juga menunjukkan intensitas absorbansi. Intensitas absorbansi menunjukkan seberapa besar cahaya yang diserap oleh sampel pada panjang gelombang tertentu. Nilai absorbansi tertinggi berada pada puncak penyerapan pertama yaitu 5. Hal ini menunjukkan bahwa sampel memiliki kemampuan terbaik untuk menyerap cahaya pada panjang gelombang 231,682 nm. Adapun pada Gambar 4.8 menunjukkan bahwa struktur isoflavon memiliki kromofor pada ikatan rangkap terkonjugasi, seperti pada gugus karbonil berupa keton yang memiliki ikatan rangkap dua (*double bond*) antara atom C dengan atom O.



Gambar 4.8 Struktur Isoflavon

4.4 Pengujian Toksisitas BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*)

Uji toksisitas BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) atau uji toksisitas akut adalah pengujian efek toksik yang ditimbulkan oleh ekstrak tumbuhan terhadap sel (sitotoksik) berupa larva udang *Artemia salina Leach*. Metode BSLT (*Brine Shrimp Lethality Test*) dipilih karena sering digunakan untuk pra-skrining terhadap senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tumbuhan dengan sederhana, waktu uji cepat, murah, mudah, tidak memerlukan peralatan khusus, dan hasilnya dapat dipercaya dan representatif (Kurniawan & Meri, 2021). Parameter toksisitas ditunjukkan pada jumlah kematian larva udang *Artemia salina Leach* akibat pemberian konsentrasi ekstrak dalam jumlah tertentu yang dinyatakan dengan nilai LC_{50} . Pengujian ini dilakukan dengan membuat larutan uji yang berisi ekstrak yang terlarut dalam air laut konsentrasi tertentu. Setelah itu memasukkan sebanyak 15 ekor larva udang *Artemia salina Leach* dalam setiap tabung reaksi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam.

Tabel 4.3 Perhitungan LC_{50} Ekstrak Daun *Enhalus acoroides* dengan Metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT)

Konsentrasi Ekstrak (ppm)	Log Konsentrasi	Larva Uji (Ekor)	Larva Mati (ekor)	Mortalitas (%)	Probit	LC_{50} (ppm)
0	0	15	0	0	0	128,22
25	1,4	15	1	7	3,52	
50	1,7	15	5	33	4,56	

100	2	15	6	40	4,75
200	2,3	15	9	60	5,25
500	2,7	15	13	87	6,13

Dari Tabel 4.3 menunjukkan bahwa sampel dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100, 200, dan 500 ppm pada ekstrak daun *Enhalus acoroides* menghasilkan nilai LC₅₀ sebesar 128,22 ppm dengan interpretasi toksik (Meyer dkk., 1982). Senyawa bioaktif biasanya bersifat toksik jika memiliki nilai LC₅₀ di bawah 150 ppm (Kurniawan & Ropiqa, 2021). Sifat toksik ekstrak tumbuhan akan semakin tinggi ketika pada konsentrasi semakin kecil dapat mematikan lebih dari 50% dari hewan uji (Frizqia dkk, 2020). Oleh karena itu, ekstrak *Enhalus acoroides* dapat dianggap memiliki bioaktivitas tinggi dan toksik karena memiliki nilai LC₅₀ yang rendah. Sifat toksik ekstrak tumbuhan pada hewan uji berupa larva udang *Artemia salina Leach* berkaitan dengan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Uji toksisitas ekstrak daun pandan laut (*Pandanus odorifer*) dengan metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina Leach* menghasilkan nilai LC₅₀ sebesar 4,3557 ppm dengan tingkat toksik sangat kuat dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* (Puspasari dkk, 2020). Secara visual, seperti pada Gambar 4.9, larva udang yang mati akan tenggelam ke dasar larutan dan menjadi hancur.



Gambar 4.8 Kondisi Larva Setelah 24 Jam Inkubasi

Mekanisme kematian dari larva udang *Artemia salina Leach* diduga terkait dengan fungsi senyawa yang terlarut dalam ekstrak lamun yang dapat menghambat daya makan larva (*antifeedant/food dodgers*). Cara kerja senyawa ini adalah dengan bertindak sebagai peracun lambung (*stomach poison*). Dengan demikian, jika

senyawa tersebut masuk ke dalam tubuh larva, maka alat pencernaannya akan terganggu. Selain itu, senyawa tersebut dapat menghambat reseptor rasa pada area mulut larva. Hal ini mengakibatkan larva gagal mendapatkan rangsangan pengecap, sehingga tidak mampu mengenali makanannya dan pada akhirnya larva akan kelaparan dan mati (Orto & Rantesalu, 2020). Adapun data perbandingan nilai LC₅₀ pada obat anti tuberkulosis komersial dapat dilihat pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Nilai LC₅₀ Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

Nama OAT	LC ₅₀	Referensi
Isoniazid	1000 µg/ml pada konsentrasi 500 µg/ml	Fatima dkk (2013)
Rifampicin	325 µg/ml pada konsentrasi 500 µg/ml	Fatima dkk (2013)
Pyrazinamide	9500 µg/ml pada konsentrasi 500 µg/ml	Fatima dkk (2013)
Ethambutol	8500 µg/ml pada konsentrasi 500 µg/ml	Fatima dkk (2013)
Streptomycin	180 mg/l – 487 mg/l	Safety Data Sheet
<i>Enhalus acoroides</i>	128,22 mg/l	Percobaan

Berdasarkan Tabel 4.4 dapat disimpulkan bahwa nilai LC₅₀ pada ekstrak *Enhalus acoroides* memiliki nilai yang lebih kecil dibandingkan dengan nilai LC₅₀ pada obat anti tuberkulosis yang sudah digunakan dalam pengobatan tuberkulosis.

4.5 Identifikasi Senyawa pada *Enhalus Acoroides* dengan Uji Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS)

Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) adalah teknik yang menggabungkan sifat kromatografi gas-spektrometri massa untuk mengidentifikasi berbagai zat dalam sampel uji termasuk hidrokarbon, alkohol, asam, ester, alkaloid, steroid, senyawa amino dan nitro, dan sebagainya. Komponen fitokimia yang terdapat dalam sampel diidentifikasi dengan membandingkan spektrum dengan basis data *National Institute of Standard and Technology* (NIST) yang memiliki 62.000 pola. Persentase luas setiap komponen dihitung dengan membandingkan luas puncak rata-ratanya dengan luas total. Spektrum senyawa tidak dikenal

dibandingkan dengan spektrum senyawa yang diketahui yang tersimpan dalam NIST *Library* (Amudha dkk., 2018). Komponen fitokimia *Enhalus acoroides* beserta waktu retensi, rumus molekul, berat molekul, dan konsentrasi (%) dapat dilihat pada Tabel 4.5.

Tabel 4.5 Hasil Analisis GC-MS (Amudha, dkk., 2018)

<i>Retention Time</i>	Nama komponen	Rumus Molekul	Berat Molekul	<i>Peak (%)</i>
13.89	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	$C_{14}H_{22}O$	206	1,94
17.16	<i>1-Nonadecene</i>	$C_{19}H_{38}$	266	10,06
17.16	<i>1-Octadecene</i>	$C_{18}H_{36}$	252	10,06
17.67	<i>2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-</i>	$C_{18}H_{36}O$	268	7,87
18.33	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	$C_{15}H_{24}O$	220	2,09
21.05	<i>n-Tetracosanol-1</i>	$C_{24}H_{50}O$	354	11,48
21.05	<i>Behenyl alcohol</i>	$C_{22}H_{46}O$	326	11,48
24.35	<i>17-Pentatriacontene</i>	$C_{35}H_{70}$	490	4,84
25.85	<i>Tetratetracontane</i>	$C_{44}H_{90}$	618	4,17
33.18	<i>Lanosterol</i>	$C_{30}H_{50}O$	426	2,70
33.78	<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	$C_{20}H_{16}N_2O_2$	316	6,34

Berdasarkan Tabel 4.5, fitokomponen yang paling banyak teridentifikasi pada *Enhalus acoroides* adalah *1-nonadecene* (17.15%), *n-tetracosanol-1* (11.48%), *1-octadecene* (10.06%), *2-pentadecanone* (7.87%), *behenyl alcohol* (7.33%), *17-pentatriacontane* (4.84%), *triacontane* (4.25%), *tetratetracontane* (4.17%), dan *butylated hydroxytoluene* (2.09%) (Amudha dkk., 2018).

Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)- atau *2,4-Di-tert-butylphenol (2,4-DTBP)* adalah metabolit sekunder toksik yang umum dihasilkan oleh berbagai

kelompok organisme (Zhao, 2020). Sebagai senyawa alami, *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)*- memiliki banyak fungsi untuk pengobatan seperti aktivitas antioksidan, antivirus, antibakteri, dan antijamur. *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)*- adalah senyawa siklik tidak jenuh yang memainkan peran penting dalam pembersihan radikal bebas dan juga merupakan antioksidan yang baik. (Prakash & Vuppu, 2014).

Hasil penelitian yang dilakukan Yoon dkk (2005) menunjukkan bahwa 2,4-DTBP memiliki aktivitas antioksidan yang signifikan dalam uji TBARS yang dimediasi oleh tembaga (IC₅₀: 8.20 mM), uji oksidasi yang dimediasi oleh AAPH (IC₅₀: 9.9 mM), dan uji oksidasi yang dimediasi oleh SIN-1 (29% pada 5.0 mM). Dengan menggunakan uji MTT dan *plaque reduction assay*, terbukti bahwa 2,4-DTBP memiliki aktivitas *anti-virus coxsackie B-3* (CVB-3) dan anti-virus herpes tipe 2 (HSV-2) (Leila dkk., 2019). Senyawa 2,4-DTBP yang diisolasi dari *Bacillus licheniformis* termofilik ini menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap dua bakteri yang resisten terhadap banyak antibiotik (*multidrug resistance*), yaitu *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* (Aissaoui dkk., 2018). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Ren dkk (2019) menunjukkan bahwa senyawa ini merupakan senyawa aktif untuk aktivitas antijamur dari *Pseudomonas fluorescens* TL-1.

1-Nonadecene adalah asam lemak rantai panjang yang masing-masing menunjukkan aktivitas antijamur (Rukachaisirikul dkk., 2004). *1-Nonadecene* menunjukkan luas area terbesar (11,83%) dalam uji aktifitas antibakteri terhadap *B. subtilis*, *S. aureus* dan *E.coli* dengan zona hambat ekstrak etil asetat dan ekstrak kloroform berturut turut adalah 7,15 dan 6,10 mm (Anindyawati, 2017). *1-Octadecene* adalah senyawa yang dapat menjadi agen antimikroba dan antijamur yang efektif (Amudha dkk., 2018). *1-Octadecene* dari ekstrak aseton *Spirulina platensis* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri patogen *S. aureus* dan *S.typhimurium* (Kumar dkk., 2011). Disamping itu, senyawa *1-Octadecene* yang diekstrak menggunakan diklorometan dari tanaman *Thesiumhumile Vahl* berpotensi sebagai antibakteri, antioksidan dan antikanker (Belakhdar dkk., 2015).

Fitokomponen *2-pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-* memiliki aktivitas hipokolesterolemia, antioksidan, dan aktivitas pelumasan (Kumar dkk., 2010) *Butylated Hydroxytoluene* (BHT) merupakan zat kimia berupa molekul bioaktif lipofilik dan turunan fenol yang biasa digunakan sebagai antioksidan dalam formulasi kosmetik dan sebagai bahan tambahan dan pengawet makanan (Aprilia dkk., 2018; Fahim dkk., 2023). Telah diketahui sebelumnya bahwa BHT dapat melindungi dari banyak kanker. BHT mengurangi kemungkinan terkena kanker payudara, limfoma, tumor hati dan adenoma paru (Sun dkk., 2020; Wattenberg, 1986). Penelitian yang dilakukan oleh Fahim dkk (2023) menunjukkan bahwa BHT yang ditambahkan ke makanan manusia dan hewan, dapat menurunkan kejadian kanker yang disebabkan oleh senyawa kimia sebagaimana dibuktikan dengan menangkal efek buruk DEN (*diethylnitrosamine*), yaitu senyawa kimia yang dapat menyebabkan kanker hati atau *hepatocellular carcinoma* (HCC). Selain itu juga melindungi hati dari cedera dan karsinogenesis. BHT menurunkan biomarker HCC, stres oksidatif, dan peroksidasi lipid serta meningkatkan aktivitas enzim antioksidan dan mengaktifkan sinyal apoptosis. Penelitian lain yang dilakukan oleh Abdaly dkk (2021) menyimpulkan bahwa BHT yang dipanaskan dengan dosis 250 dan 500 mg/kg mempunyai efek toksik terhadap aktivitas motorik dan neurobehavioral, serta perubahan histopatologis pada otak, jantung, dan paru-paru.

n-Tetracosanol-1 adalah senyawa alkohol yang memiliki aktivitas antibakteri (Rukachaisirikul dkk., 2004). Penelitian yang dilakukan oleh Tiji dkk (2021) menunjukkan bahwa terdapat aktivitas antimikroba pada komponen *17-Pentatriacontene*. Selain itu, pada penelitian yang dilakukan oleh Albratty dkk (2021) menunjukkan bahwa ekstrak *petroleum ether* dari *Sargassum tenerrimum J.* menunjukkan aktivitas antibakteri karena adanya senyawa *17-pentatriacontene*. Fitokomponen *Tetratetracontane* memiliki antioksidan serta aktivitas sitoprotektif (Amudha dkk., 2018).

Lanosterol adalah *triterpenoid tetracyclic* yang merupakan *lanosta-8,24-dien* yang disubstitusi oleh gugus beta-hidroksi pada posisi 3beta. *Lanosterol* adalah senyawa yang menjadi asal semua steroid. Senyawa ini memiliki peran sebagai metabolit bakteri, metabolit tanaman, metabolit manusia, metabolit *Saccharomyces*

cerevisiae dan metabolit tikus (Pubchem, 2023). Mengacu pada bidang farmasi, lanosta-8.24-dien-3-ols digunakan sebagai agen anti inflamasi, anti kanker, dan/atau analgesik melalui penghambatan enzim tertentu yang aktivitasnya terkait dengan proliferasi jenis kanker tertentu (Pianowski dkk., 2016).

4.6 Identifikasi Senyawa pada *Enhalus Acoroides* dengan Uji Liquid

Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) merupakan teknik yang menggabungkan analisis kromatografi cair dengan kemampuan analisis deteksi spektrometri massa untuk mengidentifikasi berbagai zat dalam sampel uji dengan memisahkan komponen-komponen sampel berdasarkan perbedaan kepolarannya (Dianti dkk, 2022). Komponen fitokimia yang terdapat dalam sampel diidentifikasi oleh detector spectrometer dengan membandingkan antara ion molekuler dan ion fragmen (Anggriani dkk, 2017). Komponen fitokimia *Enhalus acoroides* beserta waktu retensi, rumus molekul, berat molekul, dan area grup dapat dilihat pada Tabel 4.6.

Tabel 4.6 Hasil Analisis LC-MS

<i>Retention Time</i>	Nama komponen	Rumus Molekul	Berat Molekul	<i>Group Areas</i>
22.62	<i>Levonorgestrel</i>	C ₂₁ H ₂₈ O ₂	312,2089	5,21x10 ⁸
19.15	<i>Ebelactone B</i>	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	352,2614	5,55x10 ⁸
22.97	<i>Cannabinol</i>	C ₂₁ H ₂₆ O ₂	310,1922	6,62x10 ⁸
9.50	<i>Astragalin</i>	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448,1006	8,41x10 ⁸
18.17	<i>Bisphenol B</i>	C ₁₆ H ₁₈ O ₂	242,1307	7,94x10 ⁸
22.47	<i>Linoleoyl Ethanolamide</i>	C ₂₀ H ₃₇ NO ₂	323,2824	5,59x10 ⁸
17.39	<i>N,N-Bis(2-hydroxyethyl)dodecanamide</i>	C ₁₆ H ₃₃ NO ₃	287,2460	5,32x10 ⁸
18.84	<i>Palmitoleic Acid</i>	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,2246	4,66x10 ⁸
10.35	<i>Isoferulic acid</i>	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,0579	4,73x10 ⁸
9,86	<i>Azelaic acid</i>	C ₉ H ₁₆ O ₄	188,1049	4,62x10 ⁸

Tabel 4.6 menunjukkan adanya fitokomponen yang terdeteksi pada area grup tertentu. *Ebelactone B* adalah senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antioksidan dan berpotensi memberikan manfaat kesehatan manusia seperti perlindungan terhadap stres oksidatif dan kemampuan antiinflamasi. *Levonorgestrel* adalah salah satu jenis progestin atau hormon progesteron sintetis. *Cannabinol* adalah senyawa memiliki aktivitas farmakologis yang terkait dengan sistem endokannabinoid dalam tubuh manusia.

Astragalin merupakan golongan senyawa flavonoid yang dapat digunakan sebagai imunomodulator alami bagi tubuh manusia (Gede dkk, 2021). Selain itu senyawa astragalin pada *genus Phyllanthus* memiliki aktivitas sebagai anti virus Hepatitis B dengan menghambat replikasi virus melalui penghambatan pembentukan kapsid yang dibentuk dimer-dimer protein inti virus Hepatitis B (Firdayani dkkz, 2017).

Bisphenol B merupakan senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok bisfenol yang banyak digunakan untuk pembuatan plastik, termasuk epoxy resin, polikarbonat, dan sejenisnya. *Linoleoyl Ethanolamide* merupakan senyawa yang termasuk dalam kelompok senyawa *N-acylethanolamines* (NAEs). Senyawa ini merupakan turunan asam lemak omega-6 esensial, yaitu asam linoleat. *Linoleoyl Ethanolamide* dapat digunakan pada berbagai proses biologi seperti untuk meredakan rasa sakit, peradangan, dan fungsi sistem syaraf (Pujamada dkk, 2022).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)dodecanamide merupakan jenis senyawa turunan amida yang menggabungkan dua molekul 2-hydroxyethyl (etanolamina) dengan molekul dodecanamide melalui ikatan N,N. Strukturnya mengandung gugus amida (CONH₂) dan gugus hidroksi (OH). Senyawa ini biasanya digunakan sebagai surfaktan atau agen pemulsifikasi dalam berbagai aplikasi industri, seperti produk perawatan pribadi dan produk pembersih.

Palmitoleic Acid merupakan zat antioksidan yang mengandung asam lemak omega 7 yang bermanfaat untuk menyembuhkan luka. Selain itu Palmitoleic acid memiliki aktivitas antibakteri karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *E. coli*, *B. subtilis* dan *S. Auerus* (Kumalasari, 2015). *Isoferulic Acid* merupakan salah satu asam klorogenik (CGA) yang memiliki potensi

antioksidan berupa senyawa hidrokarbon aromatis dan eter yang memiliki ikatan rangkap dan gugus hidroksi (Nevi dkk, 2012).

Azelaic Acid atau asam azelat merupakan zat aktif yang dapat membunuh beberapa jenis bakteri patogen dan perusak pangan seperti *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* dan juga mempunyai sifat antioksidan (Kaimudin, 2022). Selain itu asam azelat juga dapat digunakan pada kosmetik pencerah kulit karena sifatnya yang selektif dalam menekan pigmentasi kulit yang diinduksi oleh sinar UV. Asam azelat merupakan suatu agen pemutih yang dapat menghambat produksi melanin dan aktivitas *tyrosinase* (Vicanova dan Pavel, 2009).

4.7 Karakteristik Sifat Senyawa Obat

Evaluasi kandidat obat umumnya dilakukan melalui analisis sifat kemiripan dengan obat (*drug-likeness*) dan profil penyerapan, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME). Evaluasi sifat mirip obat secara umum dilakukan berdasarkan aturan Lipinski (*rule of five*) sedangkan prediksi ADME dapat memberikan beberapa informasi, salah satunya yaitu mengenai bioavailabilitas oral yang menjadi karakteristik farmakokinetik dan farmakodinamik dari sebuah molekul obat (Kalita dkk., 2019).

Aspek farmakokinetik dan farmakodinamik yang diwakili oleh sifat absorpsi, distribusi, metabolisme, dan ekskresi (ADME) merupakan syarat penting suatu obat dapat menuju targetnya. Profil ADME suatu senyawa obat sangat mempengaruhi bagaimana obat tersebut bekerja di dalam tubuh, khususnya yang diberikan melalui oral (Arief & Hairunnisa, 2022). Prediksi sifat farmakokinetik bertujuan untuk melihat bagaimana senyawa obat mempengaruhi organisme. Parameter yang ditinjau meliputi absorpsi (proses penyerapan obat), distribusi (penyebaran obat), metabolisme (cara kerja obat), dan ekskresi (proses pembuangan obat setelah dimetabolisme) (Malau & Sianturi, 2019). Proses-proses tersebut menentukan seberapa cepat dan berapa lama obat akan ada di organ sasaran.

Patokan dalam memprediksi kesesuaian sifat ADME suatu senyawa, salah satunya yang paling populer adalah Lipinski *rule of five* yang dirumuskan oleh

Christopher A. Lipinski (Arief & Hairunnisa, 2022). Adapun aturan Lipinski tersebut adalah suatu senyawa obat dapat diberikan melalui oral apabila (1) berat molekul kurang dari 500 Da (2) nilai Log P kurang dari 5, (3) jumlah donor ikatan hidrogen kurang dari 5, (4) jumlah akseptor ikatan hidrogen kurang dari 10, dan (5) tidak memiliki lebih dari 9 ikatan rotasi bebas (Lipinski, dkk., 1997). Pemenuhan syarat RO5 bertujuan untuk membantu menambah tingkat keberhasilan percobaan (Khaerunissa dkk, 2020).

Tabel 4.7 Lipinski *Rule of Five*

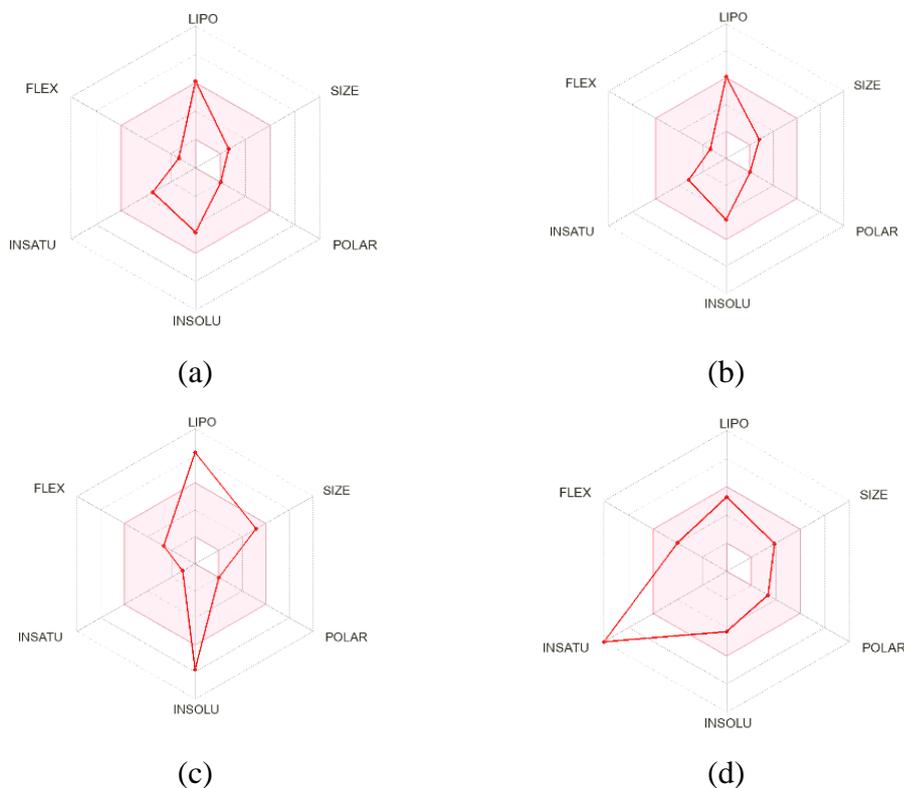
No	Compound	MW ≤500 da	Hydrogen Bond Donor < 5	Hydrogen Bond Acceptors <10	Log P ≤ 5	Rotatable Bond ≤ 9
Senyawa hasil GC-MS						
1.	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)-</i>	310	1	1	6,139001	2
2.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	220	1	1	4,295619	2
3.	<i>Lanosterol</i>	426	1	1	8,479104	4
4.	<i>Benzamide, N, N'-1,4- phenylenebis</i>	316	2	4	4,191198	6
Senyawa hasil LC-MS						
1.	<i>Astragalin</i>	448,38	7	11	-0,24	4
2.	<i>Bisphenol B</i>	242,31	2	2	3,81	3
3.	<i>Levonorgestrel</i>	312,45	1	2	3,95	1
4.	<i>Cannabinol</i>	310,43	1	2	4,23	4

Hasil uji *drug-likeness* tersaji pada Tabel 4.7 yang meliputi beberapa aspek sesuai dengan aturan Lipinski menunjukkan hanya dua senyawa hasil GC-MS yang

memenuhi seluruh aturan tersebut yaitu senyawa *Butylated hydroxytoluene* dan *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis*. Berdasarkan data pada Tabel 4.7 terdapat dua senyawa hasil GC-MS yang tidak memenuhi nilai koefisien Log P sesuai aturan Lipinski yaitu senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* dan *Lanosterol* karena memiliki nilai koefisien Log P > 5. Nilai Log P menyatakan koefisien kelarutan lemak/air, yang berkisar dari -0,4 hingga 5. Semakin tinggi nilai Log P, semakin bersifat hidrofobik molekul tersebut (Effendi dkk., 2023). Molekul yang memiliki nilai log P terlalu besar ($\log P > 5$) akan sulit larut dalam air karena sifatnya sangat hidrofobik atau non-polar (Curie dkk., 2022).

Kelarutan suatu senyawa calon obat sangat menentukan keberhasilannya dalam mencapai sisi aktif target atau protein. Jika suatu senyawa bersifat hidrofilik atau mudah larut dalam air, maka akan sulit menembus membran yang tersusun atas lapisan-lapisan lipid. Sebaliknya, jika senyawa bersifat hidrofobik, maka akan sulit diedarkan oleh cairan tubuh (Savjani dkk., 2012). Molekul yang sukar larut dalam air memiliki tendensi bersifat toksik karena tertahan lama di dalam membran dan tidak mampu menembus keluar, sehingga tidak terdistribusi secara optimal di dalam tubuh (Syahputra dkk., 2014).

Selain itu, berdasarkan Tabel 4.7 juga dapat diketahui bahwa tiga senyawa hasil LC-MS memenuhi seluruh aturan Lipinski yaitu *Bisphenol B*, *Levonorgestrel* dan *Cannabinol*. Sementara itu, senyawa hasil LC-MS yang tidak memenuhi aturan Lipinski yaitu hanya senyawa *Astragalin* dengan aturan yang tidak terpenuhi adalah jumlah *Hydrogen Bond Donor* dan *Acceptor*. *Hydrogen Bond Donor* dan *Acceptor* memainkan peran penting dalam transportasi membran, interaksi obat-protein, distribusi, dan kelarutan dalam air (Tijjani dkk., 2022). Senyawa yang memiliki *Hydrogen Bond Donor* > 5 akan berpindah ke pelarut yang memiliki ikatan hidrogen kuat (seperti air) daripada ke lingkungan lipofilik yang ada di membran sel, dengan alasan yang sama, senyawa yang memiliki *Hydrogen Bond Acceptors* > 10 mempengaruhi permeabilitas dengan berinteraksi secara positif dengan pelarut yang memiliki ikatan hidrogen kuat seperti air (Lipinski dkk., 1997).

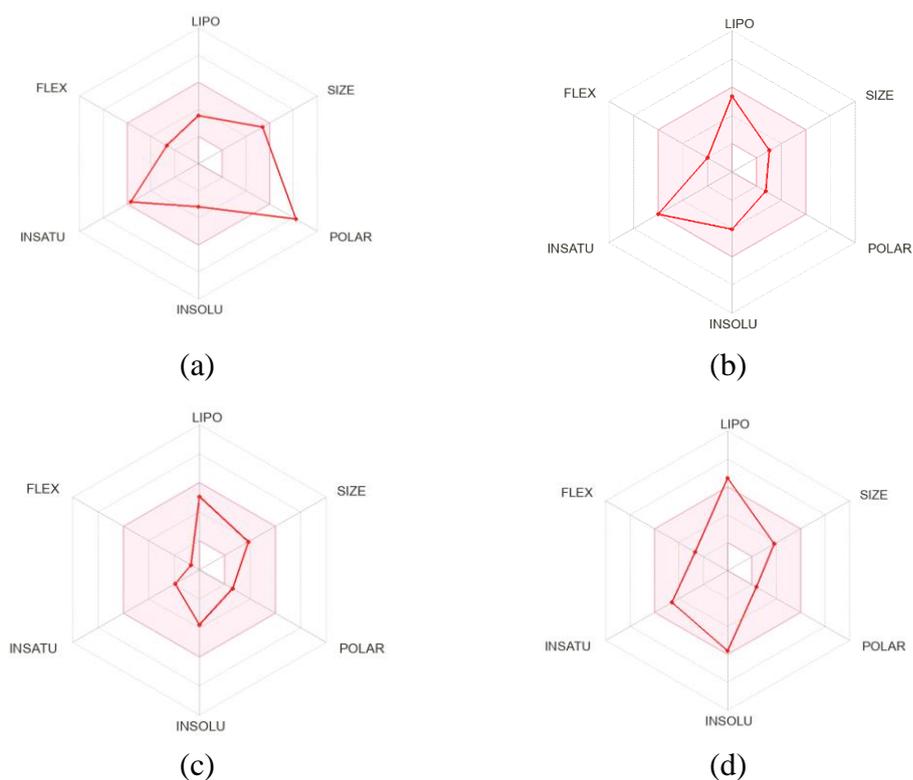


Gambar 4.9 *Bioavailability Radar* Senyawa Hasil Analisis GC-MS
 (a) *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* (b) *Butylated hydroxytoluene*
 (c) *Lanosterol* (d) *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis*

Bioavailibilitas menunjukkan antara hubungan dosis obat dan jumlah relatif obat yang dikirim ke aliran darah. Suatu senyawa dikatakan dapat diserap secara baik oleh tubuh apabila memiliki nilai bioavailibilitas sama besar dengan 0,55 (Daina dkk., 2017). Parameter radar bioavailibilitas divisualisasikan secara 2D pada Gambar 4.9. Area merah yang terdapat pada radar bioavailibilitas menunjukkan kisaran optimum suatu senyawa sebagai obat oral dengan memperhitungkan enam sifat fisikokimia, antara lain (1) *Lipophilicity* (LIPO), yaitu kemampuan senyawa untuk larut dalam lemak (lipofilisitas) dengan parameter berupa nilai XLOGP3 berkisar antara -0,7 hingga +5,0, (2) ukuran molekul (SIZE) sekitar 150-500 g/mol, (3) *Polarity* (POLAR) yaitu polaritas senyawa dengan nilai *Topological Polar Surface Area* (TPSA) sekitar 20-130Å sebagai parameter, (4) *Solubility* (INSOLU), dengan nilai $\log S < 6$ sebagai parameter kelarutan, (5) *Flexibility* (FLEX), dengan

jumlah ikatan yang bisa diputar (*rotatable bond*) < 9 sebagai parameter fleksibilitas, dan (6) *Saturation* (INSATU), dengan fraksi karbon hibridisasi $sp^3 > 0,25$ sebagai parameter saturasi (Daina dkk., 2017).

Berdasarkan Gambar 4.9, diketahui bahwa senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* dan *Butylated hydroxytoluene* memenuhi seluruh parameter sifat fisikokimia senyawa yang akan dijadikan obat oral karena berada di area merah muda radar bioavailabilitas. Sementara itu, senyawa *Lanosterol* dan *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* terdapat beberapa parameter yang berada di luar area merah muda radar bioavailabilitas. Sifat fisikokimia yang tidak terpenuhi untuk senyawa *Lanosterol* yaitu *Lipophilicity* (LIPO) dengan nilai XLOGP3 sebesar 8,91 dan *Solubility* (INSOLU) dengan nilai Log S sebesar -7,83. Sementara itu, untuk senyawa *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* sifat fisikokimia yang tidak terpenuhi yaitu *Saturation* (INSATU) dengan nilai fraksi karbon hibridisasi sp^3 sebesar 0.



Gambar 4.10 Bioavailability Radar Senyawa Hasil Analisis LC-MS

(a) *Astragalol* (b) *Bisphenol B*

(c) *Levonorgestrel* (d) *Cannabinol*

Berdasarkan Gambar 4.10, diketahui bahwa senyawa *Bisphenol B* dan *Levonorgestrel* memenuhi seluruh parameter sifat fisikokimia senyawa yang akan dijadikan obat oral karena berada di area merah muda radar bioavailabilitas. Sementara itu, senyawa *Astragalin* dan *Cannabinol* terdapat beberapa parameter yang berada di luar area merah muda radar bioavailabilitas. Sifat fisikokimia yang tidak terpenuhi untuk senyawa *Astragalin* yaitu *Polarity* (POLAR) dengan nilai *Topological Polar Surface Area* (TPSA) sebesar 190.28Å. Untuk senyawa *Cannabinol*, sifat fisikokimia yang tidak terpenuhi yaitu *Lipophilicity* (LIPO) dengan nilai XLOGP3 sebesar 6,11.

4.8 Penambatan Molekul Secara *in Silico*

Metode komputasi diterapkan pada tahap awal proses desain obat dengan menggunakan teknologi terbaru untuk melengkapi analisis eksperimental. Salah satu metodenya adalah *molecular docking* yang dapat memprediksi ikatan ligan-reseptor secara kuantitatif yang hasilnya dapat memberikan urutan berdasarkan afinitas pengikatan (*binding affinity*). Analisa hasil *molecular docking* meliputi nilai *binding affinity* dan interaksi ligan dengan residu protein yang menunjukkan konformasi masing-masing ligan (Alfian dkk, 2021). Model reseptor yang dijadikan target penambatan molekul adalah 1W66.

Enzim yang terlibat dalam proses lipoylasi dan asam lipoat, yang penting untuk mengaktifkan beberapa kompleks protein yang berpartisipasi dalam proses utama metabolisme, telah dikaitkan dengan pertumbuhan dan kemampuan penyebab penyakit beberapa bakteri, termasuk *Mycobacterium tuberculosis*. Salah satu enzim ini adalah Lipoate protein ligase B (LipB) (PDB ID: 1W66), juga dikenal sebagai *octanoyl-[acyl carrier protein]-protein acyltransferase*. Enzim ini bertanggung jawab untuk memindahkan asam oktanoat dari satu molekul ke molekul lain (domain lipoyl) dalam bentuk ikatan khusus (*thioester bond*) yang melibatkan koenzim *4'-phosphopantetheine* sebagai bagian dari *acyl carrier protein* (ACP). Ekspresi LipB mengalami peningkatan signifikan pada pasien yang terkena *multi-drug resistant M. tuberculosis*. Belum ada mekanisme pengganti yang teridentifikasi mampu mengambil peran LipB dalam metabolisme tuberkulosis. Hal

ini menunjukkan bahwa LipB memiliki peran penting dalam pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dan dapat dijadikan target dalam penelitian obat anti-TB baru (Billones dkk, 2013).

Tabel 4.8 Hasil Penambatan Molekul Kontrol Positif dengan Reseptor 1W66

Ligan (Kontrol Positif)	<i>Binding Affinity</i> (kkal/mol)
Isoniazid	-4,3
Rifampicin	-7
Pyrazinamide	-5
Ethambutol	-4,2
Streptomycin	-6,5

Berdasarkan Tabel 4.8 menunjukkan bahwa dari lima senyawa yang digunakan dalam pengobatan tuberkulosis, hanya Rifampicin dan Streptomycin yang digunakan sebagai kontrol positif dalam pengujian terhadap reseptor 1W66. Nilai *binding affinity* yang rendah pada Rifampicin dan Streptomycin menunjukkan bahwa keduanya lebih mudah terikat pada reseptor-reseptor tersebut dibandingkan dengan Isoniazid, Pyrazinamide, dan Ethambutol. Semakin rendah nilai *binding affinity* maka energi yang dibutuhkan semakin rendah dan afinitas ikatan semakin tinggi sehingga interaksi antara ligan dan reseptor akan lebih stabil, begitupun sebaliknya (Naufa dkk., 2022; Ningrat, 2022; Manalu, 2021; Alfian dkk., 2021).

Parameter yang digunakan untuk menganalisis dan memvalidasi hasil penambatan molekul diantaranya yaitu *Root Mean Square Deviation* (RMSD), metode penambatan molekul dikatakan valid jika $RMSD < 2 \text{ \AA}$. RMSD merupakan parameter yang digunakan untuk mengevaluasi proses penambatan molekul yang dijalankan sesuai atau tidak, dan menggambarkan seberapa besar perubahan konformasi ligan sebelum dan sesudah validasi dilakukan (Naufa dkk., 2022). Nilai RMSD menunjukkan ketepatan atau keabsahan hasil penambatan molekul (Kiran dkk., 2020; Pandey dkk., 2020). Nilai RMSD menjelaskan nilai penyimpangan dari kesalahan yang terjadi saat melakukan *docking*. Semakin kecil nilai RMSD menunjukkan bahwa penyimpangan kesalahan dalam melakukan *docking* kecil, begitupun sebaliknya (Alfian dkk, 2021). Nilai RMSD yang didapat ada dua yaitu

RMSD *lower bound* (RMSD lb.) dan RMSD *upper bound* (RMSD ub.) Hasil penambatan molekul dari 11 senyawa dan kontrol positif yang digunakan, yaitu mode 0, yang secara otomatis memiliki nilai RMSD 0.000, berarti metode penambatan molekul yang dilakukan telah terbukti *valid*.

Berdasarkan proses penambatan molekul diperoleh energi ikatan (*binding affinity*) dapat dilihat pada Tabel 4.9 sebagai parameter kestabilan konformasi antara ligan dengan reseptor dan jumlah ikatan interaksi antara ligan dan protein target (reseptor).

Tabel 4.9 Hasil Penambatan Molekul Senyawa pada *Enhalus acoroides* dengan reseptor 1W66

Ligan GC-MS	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)	Ligan LC-MS	<i>Binding Affinity</i> (kcal/mol)
<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	-6,2	<i>Astragalin</i>	-7,8
<i>1-Nonadecene</i>	-3,5	<i>Levonorgestrel</i>	-7,1
<i>1-Octadecene</i>	-4,3	<i>Cannabinol</i>	-6,9
<i>2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-</i>	-4,6	<i>Bisphenol B</i>	-6,3
<i>Butylated hydroxytoluene</i>	-5	<i>Isoferulic acid</i>	-5,7
<i>n-Tetracosanol-1</i>	-3,6	<i>Linoleoyl Ethanolamide</i>	-5,5
<i>Behenyl alcohol</i>	-4,5	<i>Ebelactone B</i>	-5,4
<i>17-Pentatriacontene</i>	-3,7	<i>Palmitoleic acid</i>	-5
<i>Lanosterol</i>	-7,5	<i>Azelaic acid</i>	-4,8
<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	-6,8	<i>N,N-Bis(2-hydroxyethyl) dodecanamide</i>	-4,6

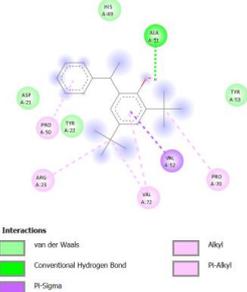
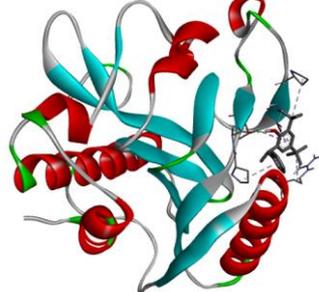
Dari Tabel 4.9 dapat diketahui bahwa interaksi 1W66 dengan Ligan GC-MS yaitu *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-*, *Butylated hydroxytoluene*, *Lanosterol*, dan *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* memiliki nilai *binding affinity*

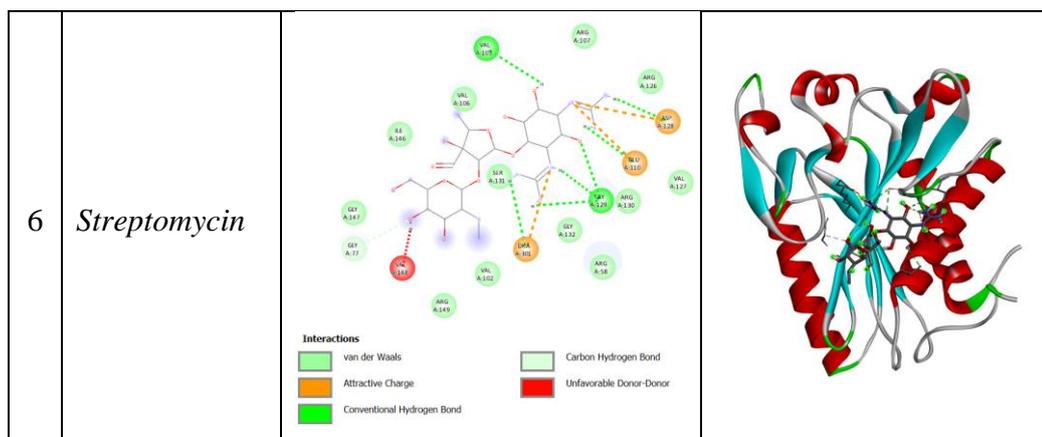
paling rendah yaitu berturut-turut -6,2; -5; -7,5 dan -6,8 kkal/mol. Selain itu dapat diketahui juga bahwa interaksi 1W66 dengan Ligan LC-MS yaitu *Astragalin*, *Levonorgestrel*, *Cannabinol*, dan *Bisphenol B* memiliki nilai *binding affinity* paling rendah yaitu berturut-turut -7,8; -7,1; -6,9 dan -6,3 kkal/mol.

Berdasarkan Tabel 4.8 dan Tabel 4.9 nilai afinitas senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astragalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* terhadap reseptor 1W66 lebih rendah dibanding kontrol positif yaitu Rifampicin dan Streptomycin yang bernilai -7 dan -6,5 kkal/mol, yang berarti kelima senyawa tersebut memiliki ikatan lebih kuat terhadap reseptor 1W66 dibandingkan kontrol positif. Hasil tersebut menunjukkan bahwa beberapa senyawa dalam *Enhalus acoroides* berinteraksi dengan situs aktif protein 1W66, artinya memiliki kemampuan lebih baik daripada Rifampicin dan Streptomycin untuk menghambat aktivitas 1W66, sehingga diprediksi berpotensi sebagai kandidat obat anti tuberkulosis.

Data interaksi ligan dan protein ditampilkan dengan menggunakan *Discovery Studio Visualizer* untuk melihat residu asam-asam amino yang terlibat dan ikatan yang terjadi antara senyawa yang diteliti dengan target protein. Visualisasi 2D dan 3D interaksi antara Ligan GC-MS dengan reseptor 1W66 dapat dilihat pada Tabel 4.10.

Tabel 4.10 Visualisasi 2D & 3D Interaksi Ligan GC-MS dengan Reseptor 1W66

No	Ligan	Binding Visualization	
		2D Image	3D Image
1	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>		



Tabel 4.11 Hasil Interaksi Asam Amino Ligan GC-MS pada Reseptor 1W66

No.	Nama Senyawa	Interaksi Asam Amino
1.	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	Van der Waals: ASP21, TYR22, TYR53, HIS49 Conventional hydrogen bond: ALA51 Pi-sigma: VAL52 Alkyl: PRO70, VAL72, ARG23 Pi Alkyl: PRO50
2.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	Van der Waals: GLY78, GLY77, GLY147, ILE146, SER131 Pi-sigma: VAL106 Alkyl: VAL148, VAL103 Pi Alkyl: VAL102
3.	<i>Lanosterol</i>	Van der Waals: GLY78 , VAL148, GLY77, ARG149 , ASP75, ARG76, VAL102, VAL106, VAL103, ARG126, ARG107, GLY129 , ASP128, ARG130, SER131, VAL127 Carbon Hydrogen Bond: GLU110
4.	<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	Van der Waals: ARG126 , GLU110, VAL148, ILE146, DKA301, GLY147, GLY77, GLY78, VAL102, VAL127, SER131, GLY129 , ASP128 Conventional Hydrogen Bond: ARG130 Pi Alkyl: ARG107, VAL103, VAL106

5.	Rifampicin (Kontrol Positif)	Van der Waals: ARG107, ARG126, VAL103, GLY129, ARG58, DKA301, ARG130, GLY78, VAL106, GLY147, ARG149, VAL150 Conventional hydrogen bond: SER131, VAL148 Carbon Hydrogen Bond: GLY77, GLU110 Pi Alkyl: VAL102
6.	Streptomycin (Kontrol Positif)	Van der Waals: ARG107, ARG126, VAL127, ARG130, GLY132, ARG58, SER131, VAL102, ARG149, GLY147, ILE146, VAL106 Conventional hydrogen bond: GLY129, VAL103 Carbon Hydrogen Bond: GLY77 Attractive Charge: ASP128, GLU110, DKA301 Unfavorable Donor-Donor: VAL148

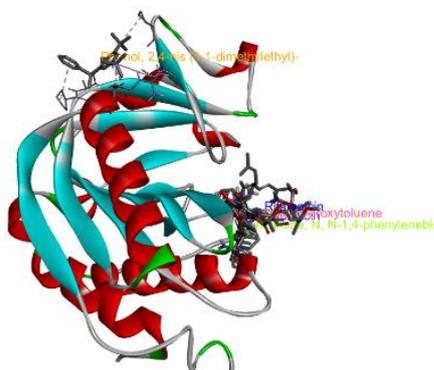
Keterangan: Residu Asam Amino yang Sama dengan Kontrol Positif merupakan data yang ditebalkan

Visualisasi interaksi penambatan molekul seperti yang ditampilkan pada Tabel 4.10 dan interpretasi interaksi asam amino seperti pada Tabel 4.11 dilakukan untuk melihat hasil penambatan berupa interaksi ligan dengan protein. Interaksi kimia yang terbentuk dari hasil penambatan molekul dapat digunakan untuk melihat kestabilan interaksi. Hasil penambatan molekul senyawa pada *Enhalus acoroides* dengan reseptor IW66 didapatkan beberapa interaksi asam amino seperti interaksi Van der Waals, ikatan hidrogen (*Conventional Hydrogen Bond* dan *Carbon Hydrogen Bond*), interaksi hidrofobik (ikatan Pi-Alkyl dan Alkyl) serta Pi-Sigma, *Attractive Charge*, dan *Unfavorable Donor-Donor*.

Interaksi Van der Waals dapat terjadi pada residu bermuatan maupun residu yang tidak bermuatan akibat gaya tarik menarik listrik yang relatif lemah akibat kepolaran molekul yang permanen atau terinduksi (Arwansyah dkk, 2014). Ikatan hidrogen adalah ikatan yang terjadi antara atom hidrogen dari suatu molekul dengan molekul lain yang lebih elektronegatif. Ikatan hidrogen merupakan jenis ikatan antar molekul yang paling kuat dan stabilitasnya tinggi (Arunan dkk., 2011). Ikatan

hidrogen melibatkan interaksi antara atom hidrogen dengan atom elektronegatif seperti O₂, Cl₂, dan F (Singh & Tripathi, 2020).

Interaksi hidrofobik adalah interaksi antara molekul non polar yang tidak mampu membentuk ikatan hidrogen dengan molekul air. Ikatan hidrofobik merupakan ikatan lemah namun masih lebih kuat dibanding interaksi Van der Waals (Otto dan Engberts, 2003). Interaksi hidrofobik dapat menentukan stabilitas ligan terhadap reseptor dan meminimalkan interaksi residu nonpolar dengan air (Neni dkk, 2022). Ikatan yang bersifat *unfavourable*, seperti ikatan *unfavourable bump* dan *unfavourable donor-donor* mampu mempengaruhi kestabilan aktivitas obat maupun ligan yang terikat. Terbentuknya ikatan yang bersifat *unfavourable* pada kompleks protein-ligan dapat mengurangi kestabilan kompleks tersebut karena tipe ikatan ini menunjukkan gaya tolak yang terjadi antara 2 molekul dan atom (Dhorajiwala dkk., 2019).



Gambar 4.11 Visualisasi 3D Ligan GC-MS dengan *Binding Affinity* Terkecil terhadap Reseptor 1W66

Interaksi residu asam amino yang sama dengan senyawa pembanding atau kontrol positif dapat dikatakan memiliki kemampuan aktivitas biologis yang sama dengan senyawa pembanding tersebut (Prasetiawati dkk., 2021). Senyawa pada *Enhalus acoroides* yang memiliki ikatan yang sama dengan senyawa pembanding (kontrol positif) yakni Rifampicin pada asam amino GLU110 adalah senyawa Lanosterol, sehingga diprediksi bahwa senyawa tersebut memiliki mekanisme kerja yang sama dengan Rifampicin. Senyawa tersebut bersama Rifampicin sama-sama membentuk interaksi dengan ikatan hidrogen, yaitu *Carbon Hydrogen Bond*.

Senyawa aktif dapat dikatakan memiliki ikatan yang kuat dengan reseptor target jika memiliki ikatan kuat melalui ikatan hidrogen dan dapat berikatan pada sisi aktif dengan salah satu residu asam amino yang sama (Wibisono & Martino, 2023).

Selain ikatan hidrogen, juga terbentuk interaksi Van der Waals pada residu asam amino yang sama antara *Lanosterol* dengan Rifampicin yaitu pada GLY78, ARG149, VAL106, VAL103, ARG126, ARG107, GLY129, dan ARG130. Ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik dan interaksi Van der Waals merupakan ikatan yang berperan penting pada hasil penambatan molekul dalam menentukan stabilitas ligan terhadap reseptor (Arwansyah dkk., 2014; Ratu dkk., 2021). Interaksi Van der Waals yang terbentuk pada senyawa *Lanosterol* juga memiliki kesamaan dengan Streptomycin (kontrol positif) pada residu asam amino ARG149, VAL102, VAL106, ARG126, ARG107, ARG130, SER131, VAL127.

Selain senyawa *Lanosterol*, senyawa *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* juga memiliki kesamaan dengan Streptomycin pada residu asam amino ARG126, GLY147, VAL102, VAL127, dan SER131 dengan interaksi yang terbentuk yaitu interaksi Van der Waals. Dengan interaksi yang sama, senyawa *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* memiliki kesamaan dengan kontrol positif lainnya yaitu Rifampicin pada residu asam amino ARG126, DKA301, GLY147, GLY78, dan GLY129.

Senyawa *Butylated Hydroxytoluene* membentuk interaksi Van der Waals yang sama dengan Rifampicin pada residu asam amino GLY147, sedangkan kesamaan dengan Streptomycin pada residu asam amino GLY147, ILE146, dan SER131. Selain kesamaan pada interaksi Van der Waals, juga terjadi interaksi hidrofobik dengan terbentuknya ikatan Pi-Alkyl yang sama dengan Rifampicin pada residu asam amino VAL102.

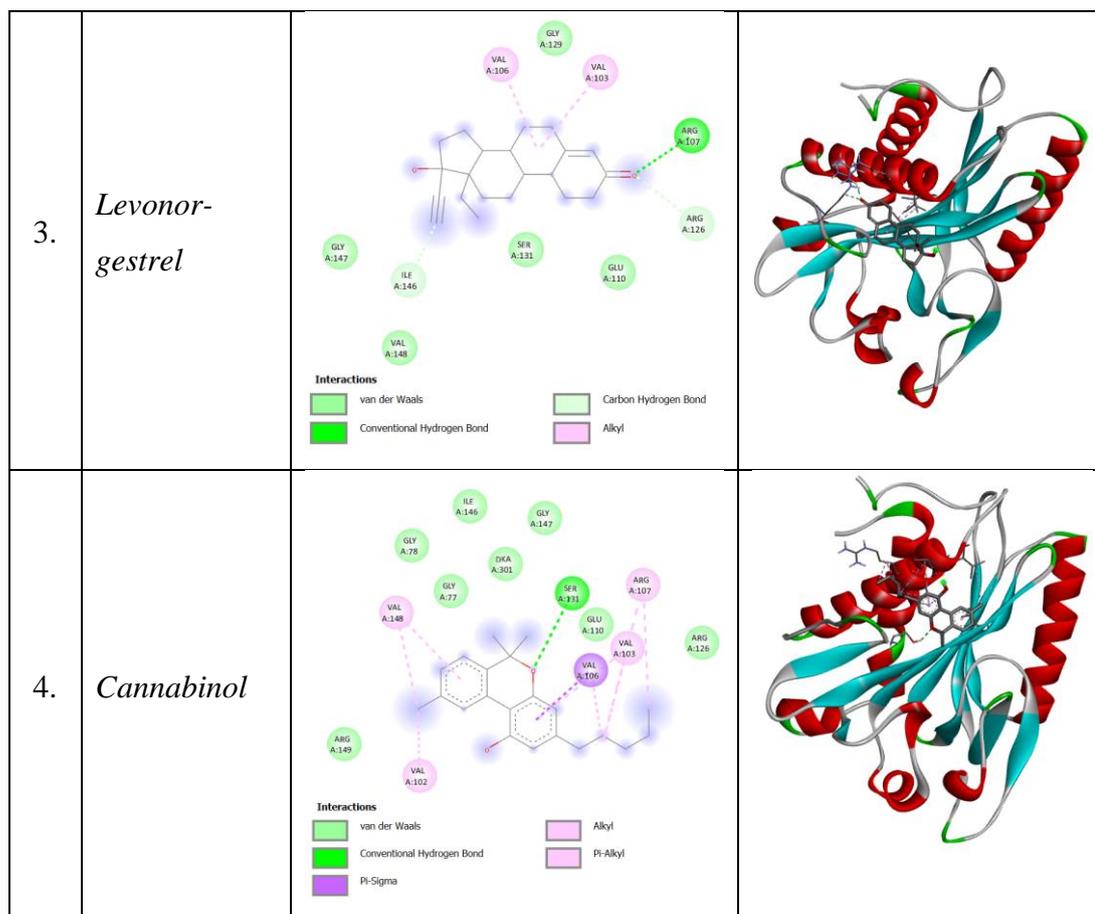
Dari keempat senyawa pada *Enhalus acoroides* hasil GC-MS, hanya senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* yang tidak memiliki kesamaan interaksi dengan kedua senyawa yang dijadikan kontrol positif. Senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* membentuk 4 interaksi Van der Waals, 1 Conventional hydrogen bond, 1 ikatan Pi-sigma, 3 ikatan Alkyl dan 1 ikatan Pi Alkyl.

Banyaknya kesamaan residu asam amino antara senyawa aktif yaitu *Butylated Hydroxytoluene*, *Lanosterol*, dan *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* dengan pembanding (*Rifampicin* dan *Streptomycin*) dapat terlihat dari Gambar 4.11, dimana senyawa tersebut berada pada posisi ikatan yang sama dengan kontrol positif yang menandakan adanya kemiripan jenis interaksi dan ikatan pada protein target. Semakin tinggi kemiripan residu asam amino menunjukkan probabilitas yang tinggi dimana ligan senyawa aktif akan memiliki jenis interaksi yang serupa dengan ligan pembanding (Pratama dkk., 2018).

Visualisasi 2D dan 3D interaksi antara Ligan LC-MS dengan reseptor 1W66 dapat dilihat pada Tabel 4.12.

Tabel 4.12 Visualisasi 2D & 3D Interaksi Ligan LC-MS dengan Reseptor 1W66

No	Ligan	Binding Visualization	
		2D Image	3D Image
1.	<i>Astragalin</i>		
2.	<i>Bisphenol B</i>		



Tabel 4.13 Hasil Interaksi Asam Amino Ligan GC-MS pada Reseptor 1W66

No.	Nama Senyawa	Interaksi Asam Amino
1.	<i>Astragalin</i>	Van der Waals: GLY147, VAL103, ILE146, GLY78, ARG107, DKA301, ARG126, ASP128, ARG130, GLY129, ARG58, VAL102 Conventional hydrogen bond: VAL148, SER131 Carbon hydrogen bond: GLY77 Pi-Anion: GLU110 Pi Alkyl: VAL106
2.	<i>Bisphenol B</i>	Van der Waals: SER131, GLY147, GLY78, GLY77, DKA301, VAL148, VAL102, ARG107, ARG126, GLU110 Conventional hydrogen bond: ILE146

		Pi-sigma: VAL106 Alkyl: VAL103
3.	<i>Levonorgestrel</i>	Van der Waals: GLY129 , GLU110, SER131 , VAL148, GLY147 Conventional hydrogen bond: ARG107 Carbon Hydrogen Bond: ARG126, ILE146 Alkyl: VAL103, VAL106
4.	<i>Cannabinol</i>	Van der Waals: GLY147 , DKA301 , GLY77, ILE146 , GLY78 , ARG149 , GLU110, ARG126 Conventional hydrogen bond: SER131 Pi Sigma: VAL106 Alkyl: VAL103, VAL148 Pi Alkyl: VAL102 , ARG107
5	Rifampicin (Kontrol Positif)	Van der Waals: ARG107, ARG126, VAL103, GLY129, ARG58, DKA301, ARG130, GLY78, VAL106, GLY147, ARG149, VAL150 Conventional hydrogen bond: SER131, VAL148 Carbon Hydrogen Bond: GLY77, GLU110 Pi Alkyl: VAL102
6.	Streptomycin (Kontrol Positif)	Van der Waals: ARG107, ARG126, VAL127, ARG130, GLY132, ARG58, SER131, VAL102, ARG149, GLY147, ILE146, VAL106 Conventional hydrogen bond: GLY129, VAL103 Carbon Hydrogen Bond: GLY77 Attractive Charge: ASP128, GLU110, DKA301 Unfavorable Donor-Donor: VAL148

Keterangan: Residu Asam Amino yang Sama dengan Kontrol Positif merupakan data yang ditebalkan

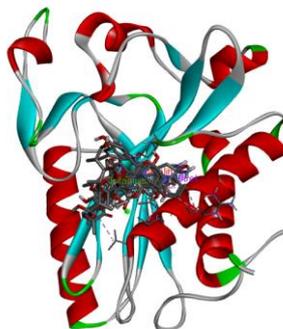
Visualisasi interaksi penambatan molekul seperti yang ditampilkan pada Tabel 4.12 dan interpretasi interaksi asam amino seperti pada Tabel 4.13 dilakukan

untuk melihat hasil penambatan berupa interaksi ligan LC-MS dengan protein 1W66. Didapatkan beberapa interaksi asam amino seperti interaksi Van der Waals, ikatan hidrogen (*Conventional Hydrogen Bond* dan *Carbon Hydrogen Bond*), interaksi hidrofobik (ikatan Pi-Alkyl dan Alkyl) serta Pi-Sigma.

Berdasarkan Tabel 4.13 dapat diketahui bahwa senyawa pada *Enhalus acoroides* hasil analisis LC-MS yaitu *Astragalin* memiliki ikatan yang sama dengan senyawa kontrol positif Rifampicin, senyawa tersebut bersama Rifampicin sama-sama membentuk interaksi dengan ikatan hidrogen, yaitu *Conventional Hydrogen Bond* pada asam amino SER131 dan VAL148, serta *Carbon Hydrogen Bond* pada asam amino GLY77, sehingga diprediksi bahwa senyawa tersebut memiliki mekanisme kerja yang sama dengan Rifampicin. Begitupun dengan senyawa *Cannabinol* yang memiliki kesamaan dengan Rifampicin melalui *Conventional Hydrogen Bond* pada asam amino SER131. Senyawa aktif dapat dikatakan memiliki ikatan yang kuat dengan reseptor target jika memiliki ikatan kuat melalui ikatan hidrogen dan dapat berikatan pada sisi aktif dengan salah satu residu asam amino yang sama (Wibisono & Martino, 2023).

Selain ikatan hidrogen, juga terbentuk interaksi Van der Waals pada residu asam amino yang sama antara *Astragalin* dengan Rifampicin dan Streptomycin yaitu pada residu asam amino GLY147, VAL103, ILE146, GLY78, ARG107, DKA301, ARG126, ARG130, GLY129, ARG58, dan VAL102. Sementara itu, pada senyawa *Cannabinol* interaksi Van der Waals yang sama dengan Rifampicin dan Streptomycin terjadi pada residu asam amino GLY147, DKA301, ILE146, GLY78, ARG149, ARG126. Selain interaksi Van der Waals, pada senyawa *Cannabinol* juga terbentuk ikatan Pi-Alkyl yang sama dengan Rifampicin pada residu asam amino VAL102.

Selain senyawa *Astragalin* dan *Cannabinol*, senyawa *Bisphenol B* juga memiliki kesamaan dengan Rifampicin dan Streptomycin pada residu asam amino SER131, GLY147, GLY78, DKA301, VAL102, ARG107, dan ARG126 dengan interaksi yang terbentuk yaitu interaksi Van der Waals. Interaksi yang sama juga terbentuk pada senyawa *Levonogestrel* dengan residu asam aminonya yaitu GLY129, SER131, dan GLY147.



Gambar 4.12 Visualisasi 3D Ligan LC-MS dengan *Binding Affinity* Terkecil terhadap Reseptor 1W66

Terlihat pada gambar 4.12 keempat senyawa pada *Enhalus acoroides* hasil analisis LC-MS memiliki posisi ikatan yang sama dengan Rifampicin dan Streptomycin pada sisi aktif protein 1W66, yang menandakan bahwa adanya kesamaan interaksi dengan kontrol positif. Sehingga bisa dikatakan bahwa keempat senyawa pada *Enhalus acoroides* hasil analisis LC-MS memiliki kesamaan bioaktivitas seperti kontrol positif.

Dari kesesuaian karakteristik senyawa obat pada *Enhalus acoroides* dengan Lipinski *rule of five* dan *bioavailability radar*, serta hasil penambatan molekul dengan protein target atau reseptor 1W66. Senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astragalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* memiliki afinitas ikatan yang tinggi terhadap reseptor 1W66 dengan nilai *binding affinity* yang lebih rendah dibanding Rifampicin dan Streptomycin yaitu sebesar -7,5; -6,8; -7,8; -7,1 dan -6,9 kkal/mol secara berurutan, yang berarti kelima senyawa tersebut memiliki ikatan lebih kuat terhadap reseptor 1W66 dibandingkan kontrol positif. Selain itu, kelima senyawa tersebut memiliki kemiripan dengan kontrol positifnya yaitu berupa posisi *surface* atau area yang sama, yang menunjukkan adanya aktivitas senyawa yang sama dengan kontrol positif dan terikat pada asam amino yang sama, sehingga bisa dikatakan memiliki mekanisme kerja obat yang sama pula. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astragalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* memiliki kemampuan lebih baik dalam menghambat aktivitas reseptor 1W66 dan berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat obat anti tuberkulosis.