

LAPORAN PENELITIAN

**EFIKASI VIRTUAL EKSTRAK TANAMAN LAMUN
(*ENHALUS ACOROIDES*) SEBAGAI INHIBITOR PROTEIN
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS LIPOATE PROTEIN
LIGASE B (MtbLipB) MELALUI TEKNIK PENAMBATAN
MOLEKUL SECARA *IN SILICO***



Disusun oleh:

KINTAN NUZULA RAMDHANI KAMIL (3335200051)

NABILA RAHMANI SYAWALIA (3335200093)

**JURUSAN TEKNIK KIMIA – FAKULTAS TEKNIK
UNIVERSITAS SULTAN AGENG TIRTAYASA
CILEGON – BANTEN**

2023

LAPORAN PENELITIAN
EFIKASI VIRTUAL EKSTRAK TANAMAN LAMUN (*ENHALUS*
ACOROIDES*) SEBAGAI INHIBITOR PROTEIN *MYCOBACTERIUM
***TUBERCULOSIS* LIPOATE PROTEIN LIGASE B (MtbLipB) MELALUI**
TEKNIK PENAMBATAN MOLEKUL SECARA *IN SILICO*

disusun oleh:

KINTAN NUZULA RAMDHANI KAMIL 3335200051

NABILA RAHMANI SYAWALIA 3335200093

Telah Disetujui oleh Dosen Pembimbing dan Telah Dipertahankan Dihadapan Dewan
Penguji

Pada Tanggal 13 Oktober 2023

Dosen Pembimbing I



Agus Rochmat, S.Sk., M.Farm.

NIP.197406182005011002

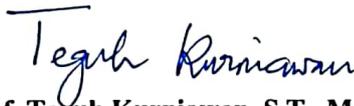
Dosen Pembimbing II



Meri Yulvianti, S.Pd., M.Si.

NIP 197707032010122002

Dosen Penguji 1



Prof. Teguh Kurniawan, S.T., M.T., P.hD

NIP. 198305062006041002

Dosen Penguji 2



Dr. Widya Ernayati K., S.Si., M.Si

NIP.197910132009122001

Mengetahui

Ketua Jurusan Teknik Kimia



Prof. Dr. Jayanudin, S.T., M.Eng

NIP:197808112005011003

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

NAMA : KINTAN NUZULA RAMDHANI KAMIL

NIM : 3335200051

JURUSAN : TEKNIK KIMIA

JUDUL : EFIKASI VIRTUAL EKSTRAK TANAMAN LAMUN (*ENHALUS ACOROIDES*) SEBAGAI INHIBITOR PROTEIN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* LIPOATE PROTEIN LIGASE B (MtbLipB) MELALUI TEKNIK PENAMBATAN MOLEKUL SECARA *IN SILICO*

Bersedia

Dengan ini menyatakan bahwa penelitian dengan judul tersebut di atas adalah benar karya saya sendiri dengan arahan dari pembimbing dan tidak ada duplikasi dengan karya orang lain kecuali yang telah disebutkan sumbernya.

Apabila di kemudian hari terbukti terdapat plagiat dalam penelitian ini, maka saya bersedia menerima sanksi sesuai peraturan perundangan-undangan yang berlaku.

Cilegon, 12 Juli 2024



Kintan Nuzula Ramdhani Kamil

ABSTRAK

EFIKASI VIRTUAL EKSTRAK TANAMAN LAMUN (*ENHALUS ACOROIDES*) SEBAGAI INHIBITOR PROTEIN *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* LIPOATE PROTEIN LIGASE B (MtbLipB) MELALUI TEKNIK PENAMBATAN MOLEKUL SECARA *IN SILICO*

Oleh:

KINTAN NUZULA RAMDHANI KAMIL (3335200051)

NABILA RAHMANI SYAWALIA (3335200093)

Tuberkulosis merupakan penyakit nomor satu menular paling berbahaya di dunia yang dipicu oleh adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan senyawa metabolit sekunder *Enhalus acoroides* sebagai obat anti tuberkulosis melalui pendekatan secara *docking in silico*. Metode penelitian yang dilakukan melibatkan tahap pembuatan simplisia *Enhalus acoroides*, ekstraksi maserasi *Enhalus acoroides*, uji toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), uji kualitatif flavonoid dengan fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis, dan penambatan molekul secara *In Silico*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol *Enhalus acoroides* memiliki sifat toksik dengan nilai LC₅₀ sebesar 128,22 ppm dan mengandung senyawa flavonoid (isoflavon). Selain itu, senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astargalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* yang diisolasi dari *Enhalus acoroides* menunjukkan aktivitas anti tuberkulosis yang lebih baik dibandingkan Rifampicin dan Streptomycin berdasarkan analisis *docking molekuler* terhadap reseptor 1W66 dengan nilai *binding affinity* sebesar -7,5; -6,8; -7,8; -7,1 dan -6,9 kkal/mol secara berurutan. Temuan ini mengindikasikan bahwa *Enhalus acoroides* memiliki potensi sebagai sumber bahan alam untuk pengembangan obat anti tuberkulosis.

Kata Kunci: *Enhalus acoroides*, Flavonoid, Penambatan molekul, Tuberkulosis

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT penulis sampaikan atas segala rahmat, taufik, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan penelitian ini yang berjudul “Efikasi Virtual Ekstrak Tanaman Lamun (*Enhalus acoroides*) Sebagai Inhibitor Protein *Mycobacterium Tuberculosis* Lipoate Protein Ligase B (MtbLipB) Melalui Teknik Penambatan Molekul Secara *In Silico*”. Penulis juga mengucapkan terima kasih atas bimbingan dan dukungan yang diberikan sampai laporan penelitian ini terselesaikan kepada:

1. Keluarga penulis yang sudah memberikan doa serta dukungan baik secara moral maupun material kepada penulis.
2. Bapak Prof. Dr. Jayanudin, S.T., M.Eng. selaku ketua Jurusan Teknik Kimia FT UNTIRTA yang telah banyak memberikan motivasi.
3. Ibu Dr. Rahmayetty, S.T., M.T. sebagai Koordinator Penelitian Jurusan Teknik Kimia Universitas Sultan Ageng Tirtayasa yang telah banyak memberikan motivasi.
4. Bapak Agus Rochmat, S.Si., M.Farm. dan Ibu Meri Yulvianti, S.Pd., M.Si. selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk mengarahkan dan membimbing penulis dalam menyelesaikan laporan penelitian ini.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan penelitian ini tidak terlepas dari kesalahan. Oleh karena itu, penulis menerima kritik dan saran yang membangun untuk perbaikan laporan ini. Semoga laporan ini dapat bermanfaat dengan baik.

Cilegon, 06 Oktober 2023

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
ABSTRAK	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Ruang Lingkup	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tuberkulosis (TBC).....	4
2.2 Mekanisme penularan Tuberkulosis	5
2.3 Mekanisme Obat Anti Tuberkulosis.....	6
2.4 Tanaman Lamun	6
2.4.1 <i>Enhalus acoroides</i>	7
2.4.2 Kandungan <i>Enhalus acoroides</i>	8
2.5 Ekstraksi	12
2.6 Pelarut.....	13
2.7 Uji Hayati Senyawa Metabolit Sekunder <i>Enhalus acoroides</i>	15
2.7.1 Uji Toksisitas dengan metode BSLT.....	15

2.7.2 Uji Kualitatif Flavonoid	16
2.7.3 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS.....	18
2.7.4 Penambatan Molekul secara <i>in Silico</i>	19

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian.....	23
3.1.1 Pembuatan Simplisia <i>Enhalus acoroides</i>	23
3.1.2 Pembuatan Ekstrak sampel <i>Enhalus acoroides</i>	24
3.1.3 Uji Toksisitas (BSLT- <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	25
3.1.4 Uji Kualitatif Flavonoid	25
3.1.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS.....	26
3.1.6 Penambatan Molekul secara <i>in Silico</i>	26
3.2 Prosedur Penelitian	28
3.2.1 Pembuatan Simplisia <i>Enhalus acoroides</i>	28
3.2.2 Ekstraksi Maserasi.....	29
3.2.3 Uji Toksisitas (BSLT- <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>).....	29
3.2.4 Uji Kualitatif Flavonoid	30
3.2.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS.....	30
3.2.6 Penambatan Molekul secara <i>In Silico</i>	30
3.3 Alat dan Bahan	31
3.3.1 Alat	31
3.3.2 Bahan	31
3.4 Metode Pengumpulan dan Analisis Data.....	32

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi <i>Enhalus acoroides</i>	34
4.2 Identifikasi Senyawa Flavonoid Melalui Uji Fitokimia	37

4.3	Karakterisasi Senyawa Berdasarkan Panjang Gelombang Maksimum	38
4.4	Pengujian Toksisitas BSLT (<i>Brine Shrimp Lethality Test</i>)	41
4.5	Identifikasi Senyawa pada <i>Enhalus Acoroides</i> dengan Uji <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (GC-MS)	43
4.6	Identifikasi Senyawa pada <i>Enhalus Acoroides</i> dengan Uji <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> (LC-MS).....	47
4.7	Karakteristik Sifat Senyawa Obat.....	49
4.8	Penambatan Molekul Secara <i>in Silico</i>	54

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1	Kesimpulan	68
5.2	Saran	68

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak <i>Enhalus acoroides</i>	9
Tabel 2.2 Jurnal Kandungan <i>Enhalus acoroides</i>	9
Tabel 2.3 Jurnal Penggunaan Pelarut pada Ekstraksi <i>Enhalus acoroides</i>	13
Tabel 2.4 Toksisitas menurut kategori LC ₅₀	15
Tabel 2.5 Jurnal Tingkat Toksisitas <i>Enhalus acoroides</i>	15
Tabel 2.6 Jurnal Uji Fitokimia	16
Tabel 2.7 Protein <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
Tabel 4.1 Rentang Panjang Gelombang Flavonoid.....	39
Tabel 4.2 Data Panjang Gelombang Serapan Maksimum <i>Enhalus acoroides</i>	39
Tabel 4.3 Perhitungan LC ₅₀ Ekstrak Daun <i>Enhalus acoroides</i> dengan Metode <i>Brine Shrimp Lethality Test</i> (BSLT).....	41
Tabel 4.4 Nilai LC ₅₀ Obat Anti Tuberkulosis.....	43
Tabel 4.5 Hasil Analisis GC-MS (Amudha, dkk., 2018)	44
Tabel 4.6 Hasil Analisis LC-MS	47
Tabel 4.7 Lipinski <i>Rule of Five</i>	50
Tabel 4.8 Hasil Penambatan Molekul Kontrol Positif dengan Reseptor 1W66...	55
Tabel 4.9 Hasil Penambatan Molekul Senyawa pada <i>Enhalus acoroides</i>	56
Tabel 4.10 Visualisasi 2D & 3D Interaksi Ligan GC-MS dengan Reseptor 1W66	57
Tabel 4.11 Hasil Interaksi Asam Amino Ligan GC-MS pada Reseptor 1W66....	59
Tabel 4.12 Visualisasi 2D & 3D Interaksi Ligan LC-MS dengan Reseptor 1W66	63
Tabel 4.13 Hasil Interaksi Asam Amino Ligan GC-MS pada Reseptor 1W66....	64

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Penularan TBC (Hermina Hospital, 2023) Error! Bookmark not defined.	
Gambar 2.2 <i>Enhalus acoroides</i>	8
Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Simplisia <i>Enhalus acoroides</i>	23
Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak sampel <i>Enhalus acoroides</i>	24
Gambar 3.3 Diagram Alir Uji Toksisitas (BSLT- <i>Brine Shrimp Lethality Test</i>) .	25
Gambar 3.4 Diagram Alir Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid	25
Gambar 3.5 Diagram Alir Uji Kualitatif Flavonoid dengan Spektrofotometri UV-Vis	26
Gambar 3.6 Diagram Alir Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS.....	26
Gambar 4.1 Simplisia <i>Enhalus acoroides</i>	35
Gambar 4.2 Ekstraksi Maserasi <i>Enhalus acoroides</i>	36
Gambar 4.3 Ekstrak <i>Enhalus acoroides</i>	36
Gambar 4.4 Hasil Uji Fitokimia <i>Enhalus acoroides</i>	37
Gambar 4.5 Reaksi Flavonoid dengan NaOH (Fransina dkk., 2019).....	38
Gambar 4.6 Reaksi Flavonoid dengan H ₂ SO ₄ (Kusnadi & Devi, 2017)	38
Gambar 4.7 Perbandingan Spektrum UV-Vis Senyawa Flavonoid Berdasarkan (a) Markham, 1988 dengan (b) Hasil Spektrofotometri Uv-Vis <i>Enhalus acoroides</i> ..	40
Gambar 4.8 Kondisi Larva Setelah 24 Jam Inkubasi	42
Gambar 4.9 <i>Bioavailability Radar</i> Senyawa Hasil Analisis GC-MS.....	52
Gambar 4.10 <i>Bioavailability Radar</i> Senyawa Hasil Analisis LC-MS.....	53
Gambar 4.11 Visualisasi 3D Ligan GC-MS dengan <i>Binding Affinity</i> Terkecil terhadap Reseptor 1W66	61
Gambar 4.12 Visualisasi 3D Ligan LC-MS dengan <i>Binding Affinity</i> Terkecil terhadap Reseptor 1W66	67

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tuberkulosis (TBC) merupakan suatu penyakit menular yang menyerang paru-paru dan disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Menurut *World Health Organization* (WHO), tuberkulosis masih menjadi salah satu penyebab utama kematian di seluruh dunia dengan peringkat di atas HIV/AIDS. Pada tahun 2021 Indonesia berada pada urutan ketiga dengan jumlah penderita tuberkulosis tertinggi di dunia setelah India dan Cina (WHO, 2022). Di Indonesia terdapat 969.000 pengidap TBC dengan 144.000 kasus kematian dan 28.000 pengidap TBC yang mengalami resistan obat (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2022). Provinsi Banten berada dalam urutan kelima pada tahun 2022 dengan jumlah 23.343 kasus penderita TBC (DataBoks, 2022).

Sementara itu, pengobatan tuberkulosis yang umum dilakukan adalah dengan memberikan obat anti tuberkulosis berupa antibiotik. Pengobatan tuberkulosis terdiri dari dua tahap, yaitu tahap intensif dan tahap lanjutan. Pada tahap intensif digunakan jenis Isoniazid, Rifampisin, Pirasinamid, dan Etambutol sedangkan pada tahap lanjutan digunakan Isoniazid dan Rifampisin (Rizwani, 2017). Pengobatan ini umumnya harus dilakukan secara teratur selama 6 bulan. Namun, terdapat beberapa efek samping yang ditimbulkan seperti mual, muntah, nyeri perut, nyeri sendi, demam, kurang nafsu makan, urin berwarna jingga, gangguan kulit seperti gatal-gatal, ruam kulit dan terparah adalah hepatotoksik (Verencia, 2022). Sehingga, saat ini banyak dilakukan pencarian senyawa baru yang dapat dijadikan obat alternatif dalam penanganan tuberkulosis.

Indonesia memiliki lautan dengan keanekaragaman hayati yang sangat melimpah. Dengan habitat luas, tumbuhan laut juga memiliki keunikan biokimia yang dapat menghasilkan metabolit yang tidak biasa. Untuk itu terdapat kandidat tumbuhan laut sebagai pengembangan agen antibakteri baru. Salah satu yang dapat dimanfaatkan adalah tanaman lamun (*Enhalus acoroides*). Tanaman lamun

(*Enhalus acoroides*) adalah tumbuhan laut yang mengandung senyawa aktif seperti tanin, saponin, triterpenoid, flavonoid, dan steroid (Permana dkk., 2020). Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri (Purnama dan Brahmana, 2018; Jumaetri, 2020; Yusuf dkk., 2021).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Purnama dan Brahmana (2018) menyatakan bahwa pada ekstrak tumbuhan lamun (*Enhalus acoroides*) dengan penggunaan pelarut etil asetat dan n-heksana memiliki bioaktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Stapillococcus aureus*, dan *Bacillus subtilis*. Adapun penelitian yang dilakukan oleh Qi, dkk (2008) menjelaskan bahwa tumbuhan lamun (*Enhalus acoroides*) dari Cina mengandung senyawa bioaktif seperti flavonoid dan steroid yang berpotensi sebagai agen antibakteri terhadap beberapa bakteri laut.

Selain itu pada penelitian yang dilakukan oleh Desy Setyoningrum dkk (2020) menunjukkan bahwa tumbuhan lamun (*Enhalus acoroides*) memiliki senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai agen antibakteri alami dari laut. Pada penelitian Ali dkk (2012) menjelaskan bahwa akar tumbuhan lamun (*Enhalus acoroides*) dari India memiliki senyawa antibakteri seperti alkaloid, flavonoid, fenol, saponin dan tanin. Ekstrak metanol dari *S. Isoetifolium* yang diuji terhadap 17 patogen manusia dan 5 patogen ikan menunjukkan aktivitas antibakteri yang cukup besar.

Dengan adanya aktivitas senyawa antibakteri tersebut, maka pada penelitian ini digunakan tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) melalui pendekatan *docking molecular* untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa yang paling efektif sebagai agen antibakteri untuk mengatasi tuberkulosis.

1.2 Rumusan Masalah

Identifikasi senyawa tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) sebagai obat anti tuberkulosis dilakukan dengan uji toksisitas BSLT untuk mengetahui tingkat toksisitas dan keaktifan suatu senyawa tersebut. Selanjutnya, senyawa metabolit sekunder dalam tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) sebagai agen antimikroba

mTB dapat diduga melalui interaksi dengan protein mTB dengan pendekatan secara *docking in silico*.

1.3 Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dilakukannya penelitian ini, sebagai berikut:

1. Mengetahui tingkat toksisitas dari ekstrak kental pada senyawa tanaman lamun (*Enhalus acoroides*).
2. Mengidentifikasi kandungan senyawa aktif pada tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) hasil ekstraksi maserasi.
3. Mengetahui kemampuan senyawa aktif dalam tanaman lamun (*Enhalus acoroides*) sebagai obat anti tuberkulosis melalui pendekatan penambatan secara *docking in silico*.

1.4 Ruang Lingkup

Penelitian ini menggunakan bahan daun lamun (*Enhalus acoroides*) dengan metode ekstraksi maserasi. Dilakukan pula pengujian terhadap kereaktifan senyawa melalui uji kualitatif flavonoid dengan fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis, uji toksisitas dengan *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT), dan penambatan molekul secara *in silico*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Organik dan Laboratorium Kimia Dasar Universitas Sultan Tirtayasa serta Laboratorium Terpadu IPB University Bogor.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tuberkulosis (TBC)

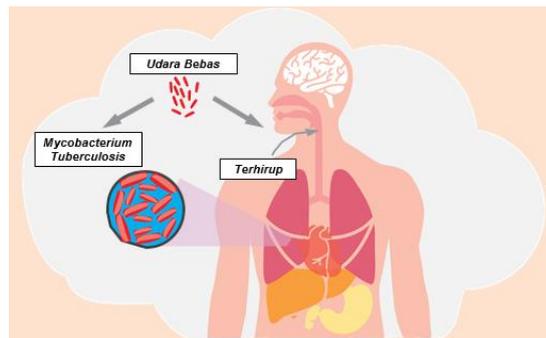
Tuberkulosis (TBC) merupakan penyakit nomor satu menular paling berbahaya di dunia yang dipicu oleh adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (Vidyastari, dkk., 2019). Berdasarkan data WHO, pada tahun 2021 terdapat 10,6 juta kasus TBC di seluruh dunia dengan 1,38 juta kematian yang disebabkan oleh penyakit ini. Selain itu, terdapat sebanyak 187.000 kematian terkait TBC terjadi pada individu yang juga terinfeksi *Human Immunodeficiency Virus* (HIV).

Indonesia menduduki peringkat kedua di dunia dalam jumlah kasus tuberkulosis (TBC) tertinggi, dengan persentase sebesar 9,2%. Peringkat pertama dipegang oleh India dengan persentase 28%, dan peringkat ketiga ditempati oleh China dengan persentase 7,4% (WHO, 2022). Berdasarkan data dari Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, pada tahun 2022 terdapat 969.000 pengidap TBC dengan 144.000 kasus kematian dan 28.000 pengidap TBC yang mengalami resisten obat. Di Indonesia, prevalensi TBC terbagi menjadi tiga wilayah yaitu Sumatera sebesar 33%, Jawa dan Bali sebesar 23%, dan Indonesia bagian timur sebesar 44% (Sugiarti, 2018).

Tuberkulosis (TBC) dapat tertular pada semua kelompok usia, tetapi paling banyak diderita oleh usia produktif (15-49 tahun). Pada tahun 2021, tercatat bahwa jumlah kasus baru TBC di Indonesia pada laki-laki sekitar 1,4 kali lebih besar dibandingkan pada perempuan. Persentase kasus baru TBC pada laki-laki (usia \geq 15 tahun) mencapai 53%, sementara pada perempuan (usia \geq 15 tahun) mencapai 38%. Bahkan berdasarkan Survei Prevalensi Tuberkulosis, prevalensi pada laki-laki 3 kali lebih tinggi dibandingkan pada perempuan. Begitu juga yang terjadi di negara-negara lain. (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2018). Hal ini dapat terjadi karena laki-laki lebih sering kontak dengan faktor risiko serta sering mengonsumsi alkohol, merokok dan begadang sehingga menyebabkan sistem imun tubuh tidak baik (WHO, 2018). TBC juga sangat mudah untuk menginfeksi

manusia yang memiliki gizi buruk dengan daya tahan tubuh rendah terutama pada pengidap HIV. Pada tahun 2022 terdapat 56% jumlah kasus penderita TBC yang mengetahui status HIV (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2022)

2.2 Mekanisme penularan Tuberkulosis



Gambar 2.1 Penularan TBC (Hermina Hospital, 2023)

Penularan penyakit Tuberkulosis (TBC) disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang ditularkan ketika seorang penderita TBC berbicara, bersin ataupun batuk, dan secara tidak langsung menyebarkan kuman ke udara dalam bentuk percikan dahak (*droplet nuclei*) yang mengandung *Mt.b* pada orang-orang disekeliling penderita TBC dengan cara menghisap percikan dahak tersebut. Ketikan perderita TBC sekali batuk dapat menghasilkan sekitar 3000 percikan dahak yang mengandung sebanyak 0-3500 *Mt.b* sedangkan ketika sekali bersin dapat mengeluarkan 4500-1.000.000 *Mt.b* (Erni dan Priyastiwi, 2021). Bakteri yang terhirup akan masuk ke dalam paru-paru dan berkumpul hingga berkembang menjadi banyak terutama pada orang yang memiliki daya tahan tubuh rendah dan fisik stres. Kemudian bakteri tersebut menyebar melalui pembuluh darah atau kelenjar getah bening sehingga menyebabkan organ tubuh lain seperti otak, ginjal, saluran pencernaan, tulang, kelenjar getah bening dan lainnya juga ikut terinfeksi, meskipun yang paling banyak adalah organ paru-paru (Kaihena, 2013).

2.3 Mekanisme Obat Anti Tuberkulosis

Saat ini penyakit TBC diobati dengan memberikan Obat Anti Tuberkulosis (OAT) berupa antibiotik yang memiliki tiga mekanisme, yaitu aktivitas membunuh bakteri, aktivitas sterilisasi, dan mencegah resistensi. Pengobatan TBC terbagi menjadi dua tahap, yaitu tahap intensif dan tahap lanjutan. Selama tahap intensif pasien TBC aktif diberikan obat Isoniazid (H), Rifampisin (R), Pirazinamid (Z) dan Etambutol (E). Kemudian tahap lanjutan diberi obat isoniazid dan rifampisin untuk memusnahkan sisa bakteri yang ada (Rizwani, 2017). Tujuan kombinasi tahap tersebut yaitu untuk meminimalkan perkembangan resistensi terhadap streptomisin setelah obat tersebut diperkenalkan pertama kali.

Berbagai obat dalam terapi standar memiliki target populasi *M. tuberculosis* yang berbeda-beda. Isoniazid bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel bakteri TBC. Obat ini mengganggu pembentukan asam *mycolic* yang penting dalam pembentukan dinding sel bakteri, sehingga menyebabkan kerusakan dan kematian bakteri TBC. Rifampisin adalah obat yang sangat efektif dalam pengobatan TBC. Obat ini bekerja dengan menghambat sintesis RNA bakteri TBC. Rifampisin berikatan dengan enzim RNA polimerase bakteri dan menghambat aktivitas enzim ini, mengganggu produksi RNA dan protein yang diperlukan untuk pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Pyrazinamide bekerja dengan mengubah kondisi lingkungan asam di dalam sel bakteri TBC. Perubahan ini menghambat pertumbuhan bakteri dan membuatnya lebih rentan terhadap pengaruh obat lain. Ethambutol menghambat sintesis dinding sel bakteri TBC dengan menghambat enzim arabinosil transferase. Dengan mengganggu pembentukan polisakarida yang penting dalam dinding sel bakteri, Ethambutol menghambat pertumbuhan dan reproduksi bakteri TBC (Chakraborty & Rhee, 2015).

2.4 Tanaman Lamun

Laut tropis mempunyai tiga ekosistem pesisir yang tidak dapat dipisahkan baik secara fungsi maupun fisik, yaitu ekosistem *mangrove*, ekosistem lamun dan ekosistem terumbu karang. Ekosistem lamun adalah salah satu penyusun pantai yang mempunyai peran penting dalam struktur ekologi daerah pesisir, yaitu sebagai

produsen primer (penyedia makanan) di laut dangkal, habitat hidup biota (hewan dan tumbuhan), penahan dan pengikat sedimen, dan pendaur zat hara (Azkab, 1999). Lamun ialah tanaman berbiji tertutup (*angiospermae*) dan berbunga yang memiliki *rhizome* (rimpang), daun, dan akar sejati yang dapat beradaptasi pada lingkungan dengan kadar garam atau salinitas yang tinggi (Kawaroe et al. 2016). Tanaman lamun umumnya dapat tumbuh dengan subur pada wilayah pasang surut terbuka dan perairan pantai yang mempunyai dasar perairan lumpur berpasir, kerikil dan patahan karang mati (Wagey dan Sake, 2013).

Lamun sangat beragam, terdapat kurang lebih 60 jenis lamun yang dikenal di dunia. Dari kurang lebih 60 jenis lamun yang dikenal di dunia, 13 jenis diantaranya tersebar di perairan Indonesia (Hutomo dan Nontji 2014). Hasil penelitian yang dilakukan oleh Satrya, dkk (2012) menunjukkan bahwa terdapat lima jenis lamun pada perairan Banten yang dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik, yaitu *Cymodoceea serrulata*, *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides*, *Halophila ovalis*, dan *Thalassia hemprichii*. Kelima jenis lamun tersebut digolongkan dalam empat genus yang berbeda dan dua famili yang juga berbeda. Genus *Cymodocea* termasuk ke dalam Famili *Cymodocaceae*, sedangkan genus *Enhalus*, *Thalassia*, dan *Halophila* termasuk ke dalam Famili *Hydrocharitaceae*. Dari kelima jenis lamun tersebut, *Enhalus acoroides* paling mendominasi pada perairan Banten, hal tersebut terjadi karena *Enhalus acoroides* mempunyai struktur yang khas dengan ukuran yang cukup besar jika dibandingkan dengan lamun jenis lainnya.

2.4.1 *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides adalah jenis lamun yang dominan di perairan Indonesia. Menurut Den Hartog dan Kuo (2006) dalam Sarinawaty, dkk (2020) *Enhalus acoroides* tersebar luas di sepanjang pesisir Samudera Hindia dan bagian tropis dari wilayah Pasifik bagian barat. Tanaman *Enhalus acoroides* dalam sistematika (taksonomi) tumbuhan diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Filum : *Tracheophyta*

Kelas : Magnoliopsida
Ordo : Alismatales
Famili : Hydrocharitaceae
Genus : *Enhalus*
Spesies : *Enhalus acoroides*



Gambar 2.2 *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides mempunyai akar dengan bentuk seperti tali, jumlahnya banyak dan tidak ada cabang. Memiliki panjang berkisar antara 18,50 – 157,65 mm dan berdiameter antara 3 – 5 mm. Daunnya berbentuk seperti pita dengan tepi yang rata dan ujung yang tumpul, memiliki panjang antara 65 – 160 cm dan lebar antara 1,2 – 2,0 cm. *Enhalus acoroides* tumbuh berpencair dalam kelompok-kelompok kecil yang terdiri atas beberapa individu atau kumpulan individu yang rapat. *Enhalus acoroides* merupakan jenis lamun yang mempunyai morfologi atau ukuran paling besar, helaian daunnya dapat mencapai ukuran lebih dari 1 meter. Jenis ini tumbuh di perairan dangkal sampai kedalaman 4 meter, pada dasar pasir, pasir lumpur atau lumpur (KKP, 2013).

2.4.2 Kandungan *Enhalus acoroides*

Secara ekologis, lamun berbeda dengan tumbuhan darat termasuk senyawa yang dikandungnya. Lingkungan yang berbeda menyebabkan adaptasi biokimia

oleh lamun untuk menghasilkan suatu senyawa yang disebut senyawa bioaktif atau metabolit sekunder (Owolabi, dkk., 2018), seperti tanin, saponin, triterpenoid, flavonoid, dan steroid (Permana, dkk., 2020). Senyawa-senyawa tersebut memiliki aktivitas antimikroba, antioksidan, antiinflamasi, dan antibakteri (Purnama dan Brahmana, 2018; S, Jumaetri, 2020; Yusuf, dkk., 2021). Banyak metabolit sekunder dari lamun yang telah diketahui aktif secara biologis dan merupakan biomedis penting yang dapat digunakan sebagai obat (Tuapattinaya & Rumahlatu, 2019).

Tabel 2.1 Hasil Identifikasi Senyawa Bioaktif Ekstrak *Enhalus acoroides*

Uji Fitokimia	Reaksi Positif	Pelarut		
		Etanol	Metanol	n-Heksan
Alkaloid	Endapan Merah atau Jingga	+	+	-
Flavonoid	Larutan Berwarna Kuning, Jingga, Merah, hingga Coklat Tua	+	+	+
Saponin	Membentuk Buih yang Stabil	+	+	-
Steroid	Larutan Bewarna Hijau Kebiruan	+	+	+
Sumber		Mahmiah, dkk (2023)	Nurafni dan Rinto (2018)	

Tabel 2.2 Jurnal Kandungan *Enhalus acoroides*

No	Judul	Hasil Penelitian	Referensi
1.	Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Lamun (<i>Enhalus acoroides</i>) terhadap	Pemberian ekstrak daun lamun (<i>Enhalus acoroides</i>) menunjukkan efek antiinflamasi terhadap penurunan volume udem mencit, dengan konsentrasi terbaik 125	Yusuf, dkk. (2021)

	Mencit (<i>Mus Musculus</i>) Jantan yang Diinduksi Karagen	mg/kg BB, dimana pada hari pertama yaitu 31,72%, pada hari kedua yaitu 90,29%, dan pada hari ketiga sampai hari ketujuh mengalami persen penurunan rata-rata volume udem sampai batas normal yaitu 100%.	
2.	<i>Phytochemical Analysis and in Vitro Antibacterial Activities of Seagrass Enhalus acoroides Against Staphylococcus aureus</i>	<i>Enhalus acoroides</i> yang diekstrak dengan etanol mengandung beberapa senyawa bioaktif, antara lain: alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, dan saponin. Potensi antibakteri ekstrak <i>Enhalus acoroides</i> dinilai dalam hal zona hambat pertumbuhan bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> dengan menggunakan metode difusi cakram. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak <i>Enhalus acoroides</i> dengan konsentrasi 1600 ppm membentuk zona hambat pertumbuhan bakteri sebesar $11,60 \pm 1,51$ mm (bagian daun) dan $9,73 \pm 0,42$ mm (bagian akar). Nilai tersebut mendekati zona hambat amoksilin sebagai kontrol positif yaitu sebesar 13,1 mm - 14,3 mm.	Setyoningrum, dkk (2020)
3.	<i>Analysis of Flavonoid Levels of</i>	Senyawa flavonoid ditemukan pada sampel daun <i>Enhalus acoroides</i> yang diambil dari tiga lokasi	Tuapattinaya dan

	<i>Enhalus acoroides</i> <i>in Different Coastal Waters in Ambon Island, Indonesia</i>	berbeda, dengan rata-rata kandungan flavonoid dari tiga sampel tersebut yaitu sebesar 0,0192%; 0,1475%; dan 3,5697%	Rumahlatu, (2019)
4.	Bioaktivitas Antibakteri Lamun <i>Thalassia hemprichii</i> dan <i>Enhalus acoroides</i>	Ekstrak <i>Enhalus acoroides</i> dengan pelarut etil asetat terhadap <i>Escherichia coli</i> dan <i>Stapillococcus aureus</i> memiliki MIC sebesar 31,25 µg/mL. Ekstrak <i>Enhalus acoroides</i> dengan pelarut n-heksana terhadap <i>Stapillococcus aureus</i> memiliki nilai MIC sebesar 15,625 µg/mL.	Purnama dan Brahmana (2018)
5.	Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Lamun <i>Enhalus acoroides</i>	Pengujian aktivitas antioksidan dengan metode serapan radikal DPPH, menghasilkan ekstrak metanol memiliki aktivitas antioksidan sedang dengan nilai IC ₅₀ sebesar 115,79 ppm, ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antioksidan lemah dengan nilai IC ₅₀ sebesar 153,39 ppm dan ekstrak n-heksana memiliki aktivitas antioksidan sangat lemah dengan nilai IC ₅₀ 937,31 ppm.	Rumiantin (2011)
6.	<i>In Vitro Antioxidant Activities of Ethanol Extract</i>	Total aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol <i>Enhalus acoroides</i> yaitu sebesar 11,77 mg <i>asorbic acid</i> pada bagian daun dan akar, 11,532	Kannan (2010)

	<i>from Enhalus acoroides (L.F.) Royle</i>	mg <i>ascorbic acid</i> pada bagian rimpang	
--	--	--	--

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses pemisahan zat aktif dari suatu padatan ataupun cairan dengan menggunakan bantuan pelarut berupa air atau pelarut organik. Terdapat berbagai macam metode ekstraksi, salah satunya yaitu metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi yang paling umum digunakan untuk mengambil senyawa aktif dari bahan alami seperti tumbuhan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam bahan alami dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan (Suharto, dkk., 2016). Pada saat proses perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan (Novitasari dan Putri, 2016). Setelah proses perendaman selesai, bahan alami yang telah direndam kemudian diperas untuk mengeluarkan ekstrak yang terkandung di dalamnya. Ekstrak yang dihasilkan kemudian diuapkan untuk menghilangkan pelarutnya dan meninggalkan senyawa aktif yang diinginkan.

Metode ekstraksi maserasi memiliki beberapa keuntungan, seperti prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana dan tidak memerlukan pemanasan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai dan dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Selain itu, metode ini relatif murah dan mudah dilakukan, serta dapat digunakan pada senyawa yang tidak tahan panas. Namun, kekurangan dari metode ini adalah waktu yang dibutuhkan cukup lama, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu kamar (Mukhriani, 2014).

2.6 Pelarut

Pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi maserasi harus sesuai agar dapat memisahkan senyawa yang diinginkan tanpa melarutkan zat lainnya yang tidak diinginkan. Terdapat dua syarat penggunaan pelarut yaitu pelarut yang digunakan merupakan pelarut terbaik untuk bahan yang akan diekstraksi dan pelarut harus dapat terpisah dengan cepat. Pelarut yang biasa digunakan adalah air, eter, etanol atau campuran etanol dan air (Kurniawati, 2019).

Pelarut atau larutan pengestraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa yang diinginkan. Pelarut polar akan cenderung lebih melarutkan solut yang polar dan pelarut non polar akan melarutkan solut yang non polar atau disebut dengan “*like dissolves like*”. Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan banyak faktor antara lain harganya murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat (Saifudin, 2014). Selain itu, juga harus memperhatikan tingkat toksisitas, ketersediaan, rendahnya suhu kritis, dan tekanan kritis untuk meminimalkan biaya operasi serta reaktivitas. (Kurniawati, 2019).

Tabel 2.3 Jurnal Penggunaan Pelarut pada Ekstraksi *Enhalus acoroides*

No	Judul	Hasil Penelitian	Referensi
1.	<i>Seagrass of Enhalus acoroides as a Traditional Body Scrubs in Preventing Malarial Bites by Pahawang Island Community in Indonesia</i>	Rendemen rata-rata pelarut etanol yaitu 5,82%, lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan pelarut heksana yaitu 0,47%. Hal ini menunjukkan bahwa <i>Enhalus acoroides</i> lebih banyak mengandung senyawa aktif yang bersifat polar dibandingkan non polar.	Noor, dkk (2022)
2.	Identifikasi Senyawa Bioaktif	Pelarut terbaik yang mampu mengekstraksikan kandungan	Permana, dkk (2020)

	dan Potensi Aktivitas Antioksidan Lamun <i>Enhalus acoroides</i> (Linn. F)	senyawa bioaktif secara maksimal pada sampel daun lamun <i>Enhalus acoroides</i> adalah metanol dengan rendemen 20,1%. Sementara untuk pelarut etil asetat dan n-heksana kurang dari 1%.	
3.	<i>Phytochemical Compounds of Enhalus acoroides from Wanci Island (Wakatobi) and Talango Island (Madura) Indonesia</i>	Rendemen yang dihasilkan <i>Enhalus acoroides</i> melalui ekstraksi dengan pelarut metanol, yaitu sebesar 1,125% dan 1,1725%; etil asetat yaitu sebesar 0,25% dan 0,125%; dan kloroform yaitu sebesar 0,55% dan 0,8%. Rendemen yang dihasilkan <i>Enhalus acoroides</i> melalui ekstraksi dengan pelarut metanol lebih tinggi, jika dibandingkan dengan pelarut etil asetat dan kloroform.	Dewi, dkk (2018)
4.	Identifikasi Senyawa Bioaktif Jenis-Jenis Lamun Di Perairan Pulau Morotai	Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa ekstraksi dengan pelarut metanol menghasilkan rendemen yang lebih banyak yaitu sebanyak 9,55% dibandingkan n-heksan yang hanya 0,35%.	Nurafni dan Rinto (2018)
5.	Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan Lamun <i>Enhalus acoroides</i>	Rendemen ekstrak kasar tertinggi dihasilkan oleh ekstrak metanol sebesar 6,10%, diikuti ekstrak etil asetat sebesar 0,41% dan ekstrak n-heksana sebesar 0,09%.	Rumiantin (2011)

2.7 Uji Hayati Senyawa Metabolit Sekunder *Enhalus acoroides*

2.7.1 Uji Toksisitas dengan metode BSLT

Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) adalah suatu metode untuk menguji tingkat toksisitas suatu senyawa dalam ekstrak tanaman dan merupakan *bioassay* yang pertama untuk penelitian bahan alam. *Bioassay* adalah suatu pengujian dengan memanfaatkan organisme yang masih hidup untuk mengetahui efektivitas suatu bahan hidup ataupun bahan organik dan anorganik. Metode BSLT menggunakan larva udang *Artemia salina Leach* sebagai hewan yang diuji cobakan dan efek toksik dari suatu senyawa yang diuji ditentukan dalam waktu singkat yaitu selama 24 jam setelah pemberian dosis uji (Meyer, et al. 1982).

Pengujian menggunakan metode BSLT didasari oleh kemampuan senyawa untuk mematikan larva udang *Artemia salina Leach*, dengan menentukan nilai LC_{50} (*Letal Concentration*) dari aktivitas komponen aktif tanaman terhadap larva udang *Artemia salina Leach*. Tingkat toksisitas suatu bahan berdasarkan nilai LC_{50} dapat dilihat pada tabel berikut 2.4.

Tabel 2.4 Toksisitas menurut kategori LC_{50}

Kategori	LC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Sangat toksik	<30
Toksik	30-1000
Tidak toksik	>1000

Sumber: Meyer dkk. (1982)

Tabel 2.5 Jurnal Tingkat Toksisitas *Enhalus acoroides*

No	Judul	Hasil Penelitian	Referensi
1.	<i>In Vitro Citotoxicity Assays of Seagrass (Enhalus acoroides) Methanol Extract from Soropia Coastal</i>	Hasil uji toksisitas menunjukkan bahwa sampel dengan konsentrasi 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm pada ekstrak daun menghasilkan nilai LC_{50} sebesar 404,88 ppm, sedangkan ekstrak batang dan akar	Orno dan Rantesalu (2020)

	<i>Waters in Southeast Sulawesi Province</i>	memiliki nilai LC ₅₀ > 1000 ppm. Pengujian dilanjutkan dengan penambahan konsentrasi ekstrak daun yang terdiri dari 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm. Uji toksisitas menunjukkan nilai LC ₅₀ sebesar 0,7309 yang berarti sangat beracun.	
2.	Komponen Fitokimia dan Toksisitas Senyawa Bioaktif dari Lamun <i>Enhalus acoroides</i> dan <i>Thalassia hemprichii</i> dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta	Uji toksisitas dengan metode BSLT yang dilakukan menunjukkan ekstrak metanol <i>Enhalus acoroides</i> bersifat sangat toksik dengan nilai LC ₅₀ 5,74 ppm, sedangkan ekstrak n-heksana <i>Enhalus acoroides</i> bersifat tidak toksik ditunjukkan dengan nilai LC ₅₀ 1309,42 ppm.	Dewi, dkk (2012)

2.7.2 Uji Kualitatif Flavonoid

Uji kualitatif flavonoid dengan menggunakan metode fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis adalah cara yang umum digunakan untuk mengidentifikasi keberadaan flavonoid dalam suatu sampel.

a. Uji fitokimia

Uji fitokimia melibatkan penggunaan berbagai pereaksi kimia yang dapat bereaksi dengan flavonoid, menghasilkan perubahan warna atau endapan yang khas. Berikut merupakan hasil uji fitokimia flavonoid pada sampel *Enhalus acoroides*.

Tabel 2.6 Jurnal Uji Fitokimia

No	Metode	Hasil	Referensi
1.	Sebanyak 3 mL ekstrak daun dan batang lamun ditambahkan dengan 100 ml air panas, kemudian	Positif: larutan membentuk lapisan amil alkohol	Taminggu & Tahril (2022)

	dididihkan selama 5 menit, lalu disaring. Setelah itu filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan dengan 0,05 g Mg dan HCl pekat lalu dikocok dengan kuat.	dengan warna merah, kuning, atau jingga	
2.	Sebanyak 0,05 g ekstrak kasar daun dan akar lamun ditambahkan dengan bubuk Magnesium (Mg), kemudian ditambahkan larutan amil alkohol sebanyak 0,4 ml, selanjutnya ditambahkan alkohol sebanyak 4 ml dan dihomogenkan.	Positif: larutan membentuk lapisan amil alkohol dengan warna merah, kuning, atau jingga.	Gustavina, dkk (2017)
3.	Sejumlah sampel ditambah 0,1 mg amoniak, 0,4 mL natrium hidroksida dan 4 mL alkohol, kemudian campuran dikocok	Positif: terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan natrium hidroksida	Rahakbauw & Watuguly (2016)

b. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis merupakan metode analisis yang menggunakan panjang gelombang UV dan Visible sebagai area serapan untuk mendeteksi senyawa. Pada umumnya senyawa yang dapat diidentifikasi menggunakan Spektrofotometri UV-Vis adalah senyawa yang memiliki gugus kromofor dan gugus auksokrom. Pengujian dengan Spektrofotometri UV-Vis tergolong cepat jika dibandingkan dengan metode lain (Sahumena, dkk., 2020).

Spektrofotometri UV-Vis berdasar pada hukum Lambert-Beer (Sembiring, dkk., 2019). Prinsip kerja dari alat ini adalah sumber cahaya yang datang merupakan sinar polikromatis yang dilewatkan melalui monokromator, sehingga menjadi sinar monokromatis yang kemudian diteruskan melalui sel yang berisi sampel. Sebagian sinar akan diserap oleh

sel dan sebagian lagi akan diteruskan ke fotosel yang berfungsi untuk mengubah energi cahaya menjadi energi listrik. Energi listrik akan memberikan sinyal pada detektor yang kemudian akan diubah menjadi nilai serapan (absorbansi) dari zat yang dianalisis (Miarti & Legasari, 2022).

2.7.3 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) ialah metode kromatografi gas yang digunakan bersamaan dengan spektrometri massa. Kromatografi gas digunakan untuk mencari senyawa yang mudah diuapkan atau senyawa yang menguap pada kondisi vakum tinggi dan tekanan rendah jika dipanaskan. Sedangkan spektrometri massa digunakan untuk mengidentifikasi dan menentukan bobot molekul, rumus molekul, dan menghasilkan molekul bermuatan dari komponen sampel (Darmapatni et al., 2016).

Menurut Gandjar, I.G. dan Rohman, A., (2012) dalam Candraningrat, dkk., (2021), metode GC-MS merupakan metode dengan mekanisme pemisahan sampel yang dilakukan dengan metode kromatografi gas sedangkan analisis menggunakan MS (*Mass spectroscopy*). Metode GC-MS memiliki sensitivitas yang tinggi, sehingga dapat memisahkan senyawa yang saling bercampur dan mampu menganalisis berbagai senyawa bahkan dalam kadar atau konsentrasi yang rendah.

Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) merupakan kombinasi antara metode analisis *Gas Chromatography* (GC) dan *Mass Spectrometry* (MS). Dalam hal ini *Gas Chromatography* (GC) hanya sebagai pemisah tanpa dilengkapi detektor seperti GC lainnya. Jadi dalam GC-MS yang berperan sebagai detektornya adalah *Mass Spectrometry* (MS). Prinsip kerja GC-MS yaitu sampel yang berupa cairan diinjeksikan ke dalam injector untuk diuapkan. Setelah berubah menjadi uap, sampel dibawa oleh gas pembawa menuju kolom untuk proses pemisahan. Setelah terpisah, masing-masing komponen akan melewati ruang pengion dan akan terjadi ionisasi. Fragmen ion yang dihasilkan akan diterima oleh detektor dan akan dihasilkan spektrum massa.

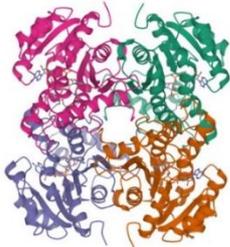
2.7.4 Penambatan Molekul secara *in Silico*

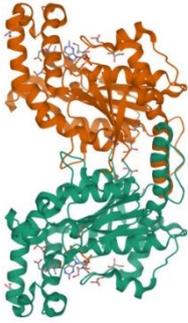
Menurut Pranowo (2019) dalam Pratama, dkk (2017), pemodelan molekul merupakan metode yang digunakan dalam penyelidikan struktur dan sifat molekul menggunakan kimia komputasi dan visualisasi grafis dalam menampilkan ilustrasi 3D pada sistem kimia. Metode komputasi yang digunakan dalam memprediksi pengikatan suatu molekul calon obat dengan sasaran proteinnya, memprediksi afinitas dan aktivitas dari suatu molekul calon obat serta melihat geometri 3D dari senyawa yang terikat pada sisi aktif protein yaitu *docking molecular* (Young et al., 2011; Mukesh & Rakesh, 2011 & Ferreira et al., 2015).

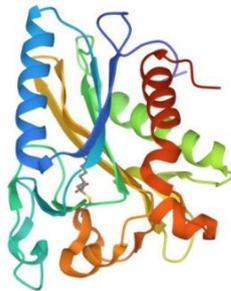
Docking molecular ialah suatu metode berbasis genetika yang dapat digunakan untuk mencari pola interaksi yang paling tepat antara dua molekul, yaitu reseptor dengan ligan. *Docking molecular* bertujuan untuk meniru interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi sarannya pada uji *in-vitro*. *Docking molecular* menjadi dasar untuk penemuan obat secara simulasi komputasi. *Docking molecular* bertujuan untuk mencapai konfigurasi protein dan ligan yang optimal. *Docking molecular* membantu dalam mengkaji obat/ligan atau interaksi reseptor/protein dengan mengidentifikasi situs aktif yang tepat pada protein dan mendapatkan geometri terbaik dari kompleks ligan dengan reseptor (Setiawan & Irawan, 2017).

Penambatan atau *Docking* ialah proses ketika dua molekul dipadankan melalui penambatan dalam ruang tiga dimensi. Saat ini, pendekatan *docking molecular* sering kali dimanfaatkan dalam perancangan obat untuk membantu dalam memahami interaksi antara obat dengan reseptor. Dalam hal ini reseptor ialah sisi aktif dari kerja obat yang berperan terhadap efek farmakologi. Banyak laporan bahwa teknik komputasi dapat mendukung dan membantu desain senyawa untuk mendapatkan inhibitor yang lebih ampuh melalui mekanisme obat reseptor (Thomsen & Christensen (2006) dalam Pratoko (2012)).

Tabel 2.7 Protein *Mycobacterium tuberculosis*

No	Reseptor	Gambar	Fungsi
1.	<p><i>Enoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) Reductase (1BVR)</i></p>		<p>InhA adalah <i>Enoyl-Acyl Carrier Protein (ACP) Reductase</i> di dalam <i>Mycobacterium tuberculosis</i> yang merupakan target untuk pengembangan obat baru terhadap TBC. InhA adalah target pertama obat <i>isoniazid</i> untuk pengobatan infeksi tuberkulosis. Senyawa yang secara langsung bekerja pada InhA, tidak memerlukan aktivasi oleh mikobakteri katalase-peroksidase katG adalah kandidat yang menjanjikan untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh strain yang resisten terhadap <i>isoniazid</i> (Luckner, 2010). Selain itu InhA juga berperan dalam perkembangan parasit malaria. Dimana inhibisi pada enzim tersebut akan menyebabkan biosintesis lemak tipe II pada parasit akan terhenti (Fazri, 2011).</p>

2.	<i>Pantothenate kinase</i> (3AF3)		<p><i>Pantothenate kinase</i> (PanK) adalah enzim target yang berperan penting dalam sistem sintesis asam lemak (FASII) dan biosintetik koenzim A (CoA). <i>Pantothenate kinase</i> (PanK) akan mengkatalisis fosforilasi <i>pantothenate</i> yang bergantung pada ATP, yang merupakan langkah awal dalam biosintetik koenzim A (CoA) dari asam <i>pantothenate</i> (Puranik, dkk., 2018).</p>
3.	<i>Isocitrate dehydrogenase</i> (5KVU)		<p><i>Isocitrate dehydrogenase</i> (IDH) adalah enzim pembatas laju utama dalam siklus krebs yang memainkan peran penting dalam metabolisme energi. Mutasi IDH dapat menghasilkan asam 2-<i>hidroksiglutarat</i> (2-HG) tingkat tinggi sehingga menghambat diferensiasi sel induk glioma. Pada saat yang sama, mutasi IDH dapat meningkatkan regulasi faktor pertumbuhan endotel vaskular (VEGF) untuk mendorong pembentukan lingkungan mikro tumor dan dapat menginduksi faktor <i>hipoksia-inducible factor-1α</i> (HIF-1α) tingkat tinggi untuk</p>

			mendorong invasi glioma (Huang dkk, 2019).
4.	Lipoate Protein Ligase B (MtbLipB) (1W66)		Lipoate protein ligase B (LipB), juga dikenal sebagai <i>octanoyl-[acyl carrier protein]-</i> protein acyltransferase adalah enzim yang mengkatalisis transfer asam oktanoat endogen ke domain lipoil melalui ikatan thioester ke kofaktor <i>4'-phosphopantetheine</i> dari protein pembawa asil (ACP). Lipoate protein ligase B (LipB) dianggap sebagai target obat yang sangat menjanjikan pada <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , karena bakteri tersebut tidak memiliki enzim pengganti yang dapat mengambil alih peran LipB dalam sistem metabolismenya. (Billones dkk, 2013)

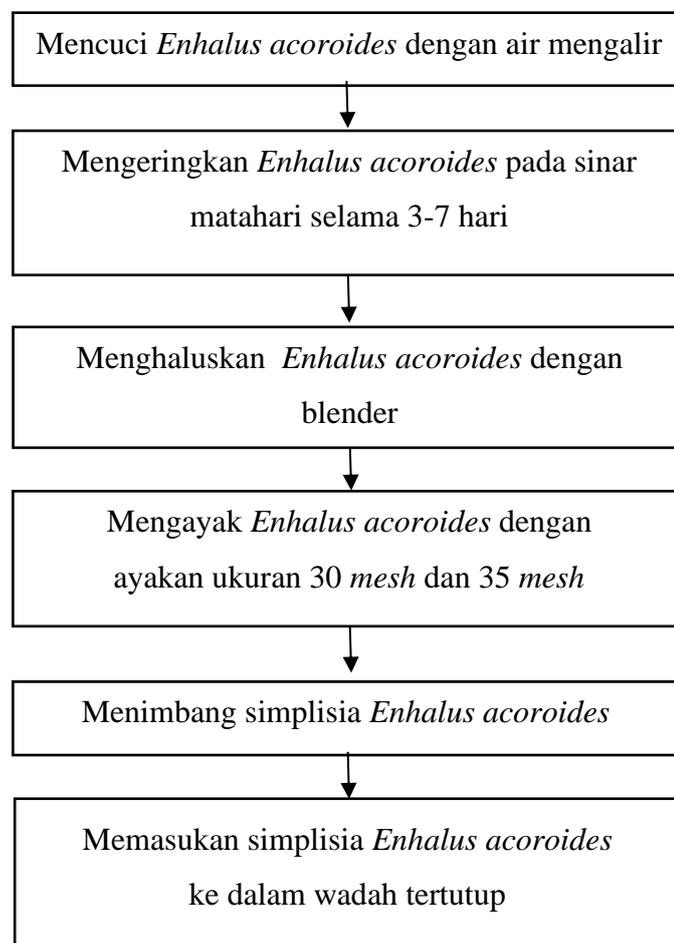
BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Tahapan Penelitian

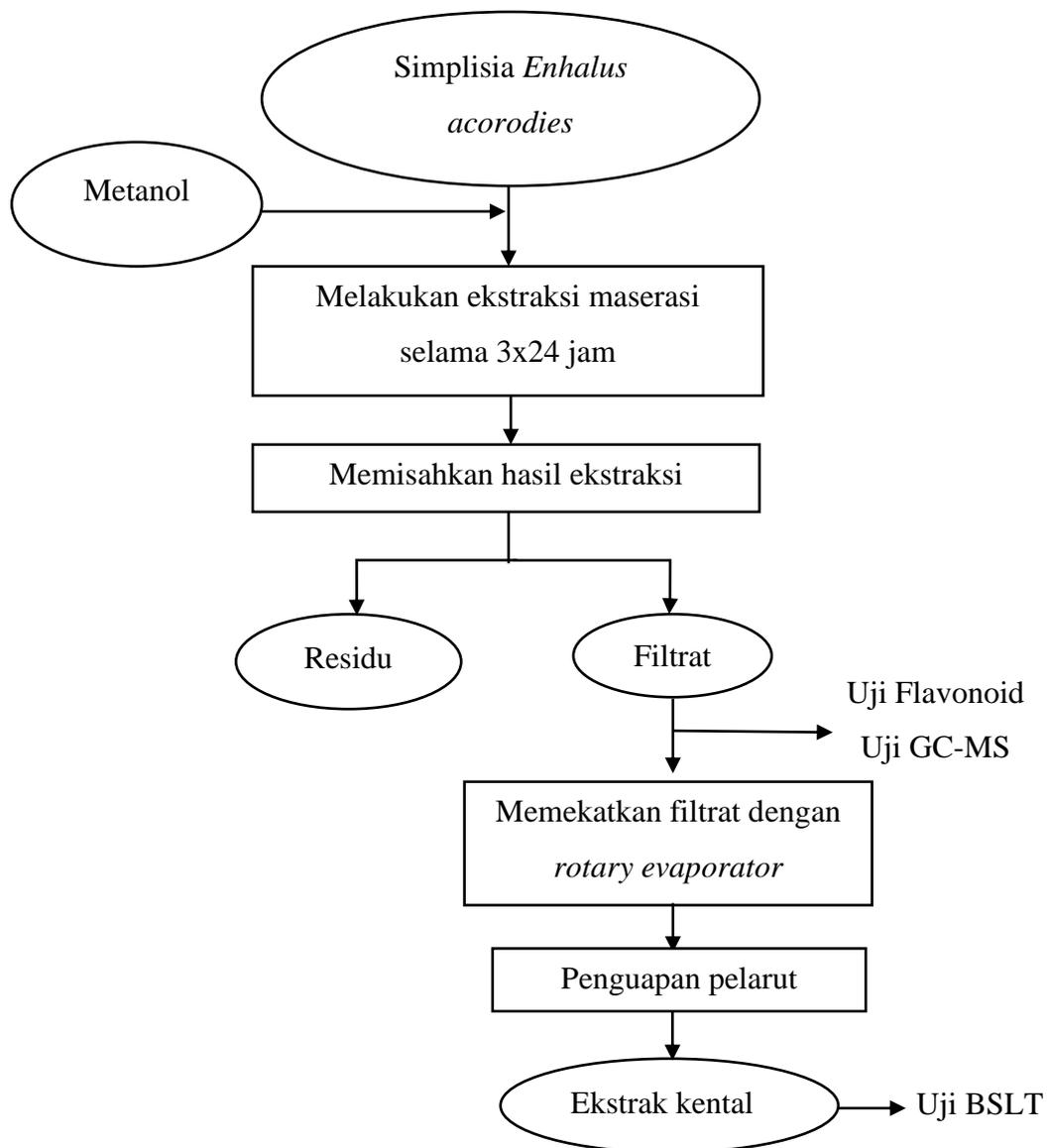
Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahap diantaranya sebagai berikut:

3.1.1 Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*



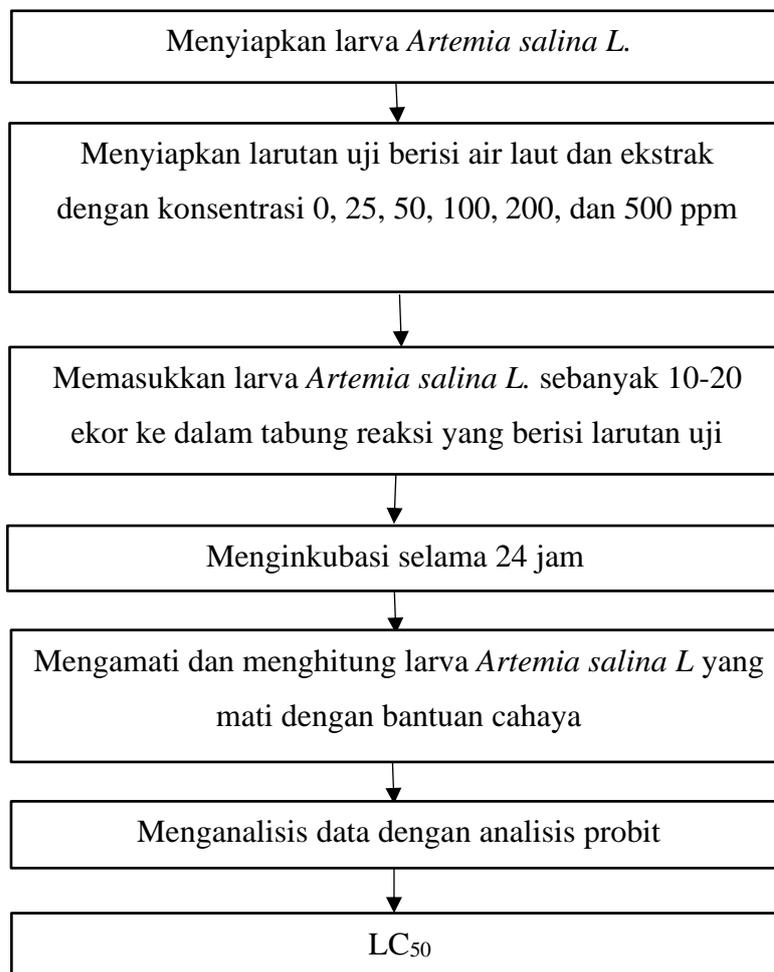
Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*

3.1.2 Pembuatan Ekstrak sampel *Enhalus acorodies*



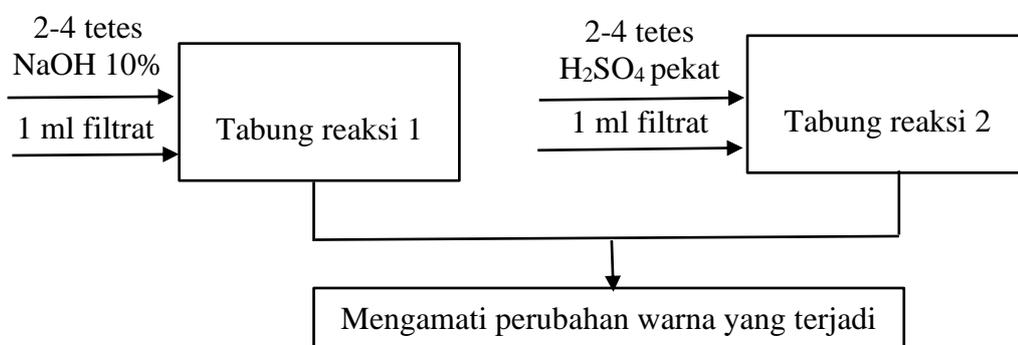
Gambar 3.2 Diagram Alir Pembuatan Ekstrak sampel *Enhalus acorodies*

3.1.3 Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test*)

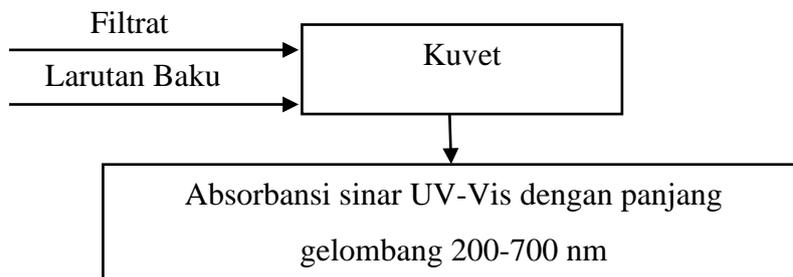


Gambar 3.3 Diagram Alir Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test*)

3.1.4 Uji Kualitatif Flavonoid

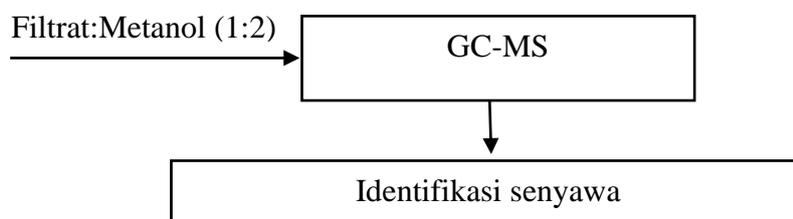


Gambar 3.4 Diagram Alir Uji Fitokimia Senyawa Flavonoid



Gambar 3.5 Diagram Alir Uji Kualitatif Flavonoid dengan Spektrofotometri UV-Vis

3.1.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS

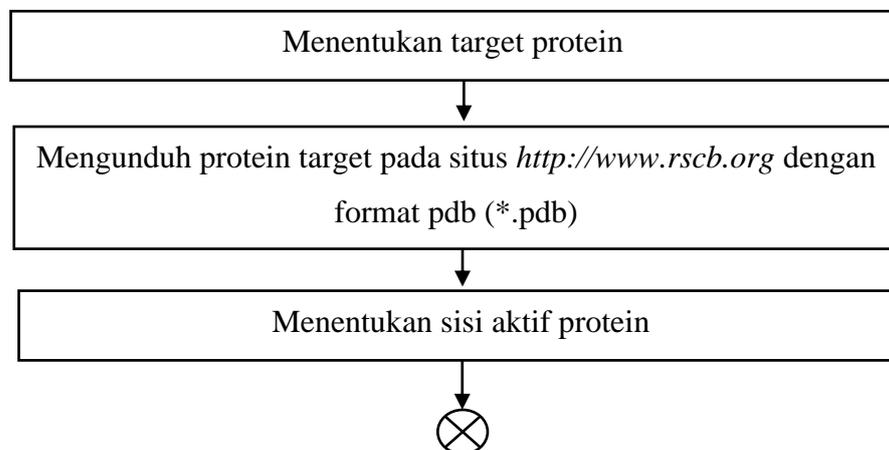


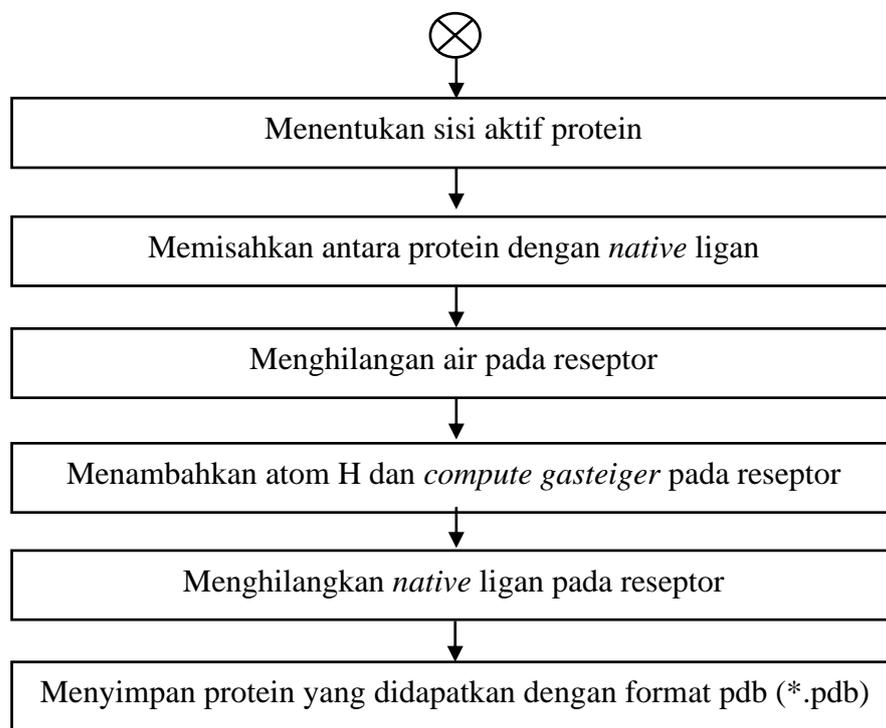
Gambar 3.6 Diagram Alir Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS (Prakash et al., 2010)

3.1.6 Penambatan Molekul secara *in Silico*

Terdapat tiga tahapan pada proses *docking in silico*, yaitu sebagai berikut:

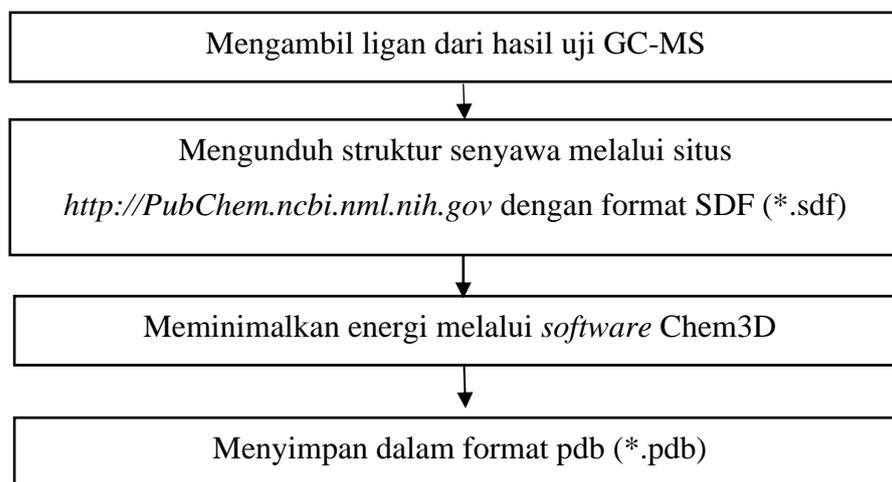
a. Preparasi protein





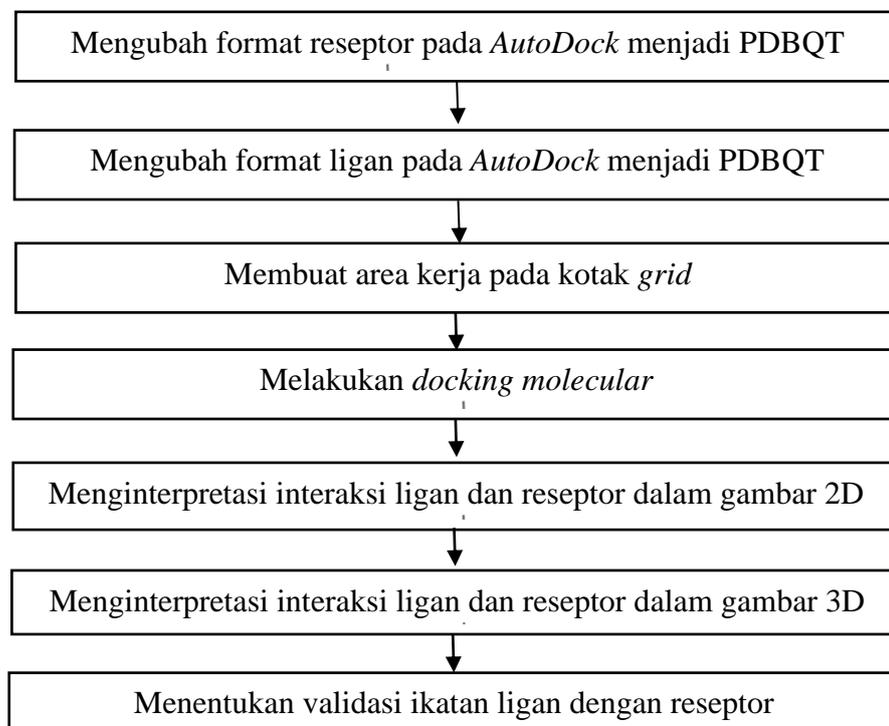
Gambar 3.7 Diagram Alir Preparasi Protein

b. Preparasi Ligan



Gambar 3.8 Diagram Alir Preparasi Ligan

c. *Docking Molecular*



Gambar 3.9 Diagram Alir *Docking Molecular*

3.2 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.2.1 Pembuatan Simplisia *Enhalus acoroides*

Enhalus acoroides dicuci dengan menggunakan air mengalir, lalu dikeringkan di bawah sinar matahari selama 3-7 hari hingga tidak terjadi perubahan massa sampel. Setelah itu, *Enhalus acoroides* dihaluskan dengan menggunakan blender dan diayak dengan menggunakan ayakan ukuran 30 *mesh* dan 35 *mesh*. Lalu simplisia *Enhalus acoroides* yang telah seragam ukurannya ditimbang dan dimasukkan ke dalam wadah tertutup untuk menghindari kontak dengan udara yang dapat mempengaruhi kelembaban dari simplisia.

3.2.2 Ekstraksi Maserasi

Simplisia *Enhalus acoroides* direndam dalam pelarut metanol dengan perbandingan 1:10 pada gelas beker 1000 ml yang dilakukan secara berulang selama 3x24 jam. Kemudian memisahkan antara filtrat dan residu (padatan). Kemudian pada sedikit filtrat dilakukan pengujian kualitatif flavonoid dan GC-MS. Setelah itu filtrat yang didapatkan selama 3 hari dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk diperoleh ekstrak kental. Kemudian dilakukan pengujian toksisitas (BSLT- *Brine Shrimp Lethality Test*).

3.2.3 Uji Toksisitas (BSLT-*Brine Shrimp Lethality Test*)

a. Persiapan larva *Artemia salina L*

Telur *Artemia salina L*. dibuat dengan cara merendamnya dalam air laut. Telur atau benur *Artemia salina L* sebanyak 50 g ditetaskan dalam wadah berisi 3/4 air laut yang separuh bagian wadahnya tertutup. Kemudian telur diinkubasi selama 24 jam di bawah lampu bohlam dan dilengkapi dengan aerator. Telur *Artemia salina L* akan menetas dan menjadi larva setelah 24 jam.

b. Analisis Toksisitas

Larutan uji yang berisi pelarut (air laut) dan ekstrak dengan konsentrasi 0, 25, 50, 100, 200, dan 500 ppm dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu memasukkan sebanyak 10-15 larva *Artemia salina L* dalam setiap tabung reaksi. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dan perhitungan dilakukan setelah 24 jam. Jumlah kematian larva *Artemia salina L* dihitung untuk menentukan nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀). LC₅₀ merupakan penilaian tingkat toksisitas suatu zat terhadap 50% kematian larva. Larva *Artemia salina L* yang didefinisikan telah mati saat tidak bergerak selama 10 detik. Data dianalisis menggunakan analisis Probit untuk mendapatkan nilai LC₅₀ dengan *Microsoft Excel for*

Windows. Analisis dilakukan dengan membandingkan LC_{50} , jika nilai LC_{50} lebih kecil dari 1000 ppm maka dikategorikan beracun.

3.2.4 Uji Kualitatif Flavonoid

Adapun analisis berikutnya yaitu uji flavonoid dengan fitokimia dan spektrofotometri UV-Vis. Proses fitokimia dilakukan dengan mencampurkan 1 ml filtrat dengan 2-4 tetes NaOH 10% dan 2-4 tetes H_2SO_4 . Lalu dikocok dan diamati perubahan warna yang terjadi. Timbulnya warna kuning, jingga, merah, dan coklat tua menunjukkan hasil flavonoid positif. Adapun proses spektrofotometri UV-Vis dilakukan dengan memasukan filtrat dan larutan baku (1:2) ke dalam kuvet untuk dilewatkan pada alat spektrofotometer UV-Vis. Kemudian akan diperoleh nilai absorbansi sinar UV-Vis dengan pajang gelombang 200-700 nm.

3.2.5 Uji Identifikasi Senyawa Menggunakan GC-MS

Filtrat diambil 10 μ l dilarutkan dengan 240 μ l pelarutnya. Kemudian diinjeksikan ke dalam sistem GC-MS. Identifikasi senyawa dilakukan dengan menggunakan *software Wiley/NIST Library* (Prakash et al., 2010).

3.2.6 Penambatan Molekul secara *In Silico*

a. Preparasi protein

Menentukan dan mengunduh target protein pada situs <http://www.rcsb.org> dengan format pdb (*.pdb). Lalu menentukan sisi aktif protein dan memisahkan antara protein dengan *native* ligan. Kemudian menghilangkan air pada reseptor, menambahkan atom H dan *compute gasteiger* pada reseptor, dan menghilangkan *native* ligan pada reseptor. Setelah itu menyimpan protein yang didapatkan dengan format pdb (*.pdb).

b. Preparasi ligan

Mengambil ligan dari hasil uji GC-MS lalu mengunduh struktur senyawa melalui situs <http://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov> dengan format SDF (*.sdf). Selanjutnya meminimalkan energi melalui *software* Chem3D dan menyimpan dalam format pdb (*.pdb).

c. Docking molecular

Mengubah format reseptor dan format ligan pada *AutoDock* menjadi PDBQT. Lalu membuat area kerja pada kotak *grid* dan mulai melakukan *docking molecular*. Setelah itu menginterpretasi interaksi ligan dan reseptor dalam gambar 2D dan gambar 3D. Kemudian menentukan validasi ikatan ligan dengan reseptor.

3.3 Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah Aerator, *Autodock-1.5.6*, Ayakan 30 *mesh* dan 35 *mesh*, Blender, Botol vial 20 ml, Corong, Gelas beker 100 ml, Gelas beker 1000 ml, Gelas ukur 50 ml, Gelas ukur 10 ml, Kaca arloji, Kapas, Kertas saring Kuvet, Laptop 8 GB SSD 125, Lampu bohlam 25 *Watt*, Perangkat lunak *biovia discovery studio 2021*, Perangkat lunak *ChemOffice 2015*, Perangkat lunak *Pyrx*, Pipet tetes, Rak tabung reaksi, *Rotary evaporator*, Spatula, Spektrofotometri UV-Vis *Thermo Genesys 150*, Tabung reaksi, dan Timbangan analitik.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Air laut, *Aquades*, H₂SO₄ pekat, Benur udang *Artemia salina leach*, *Enhalus acoroides*, Metanol, dan NaOH 10%.

3.4 Metode Pengumpulan dan Analisis Data

Metode dan Analisis yang digunakan dalam percobaan ini adalah sebagai berikut:

1. Uji kualitatif flavonoid dengan fitokimia untuk mengidentifikasi keberadaan senyawa flavonoid dalam sampel *Enhalus acoroides* dan uji spektrofotometri Uv-Vis untuk menentukan kromofor dalam sampel *Enhalus acoroides*.
2. Uji *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT) untuk menganalisis toksisitas dari *Enhalus acoroides*.
3. *Docking in silico* untuk memprediksi interaksi senyawa obat dari *Enhalus acoroides* dengan protein target atau reseptor.

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*

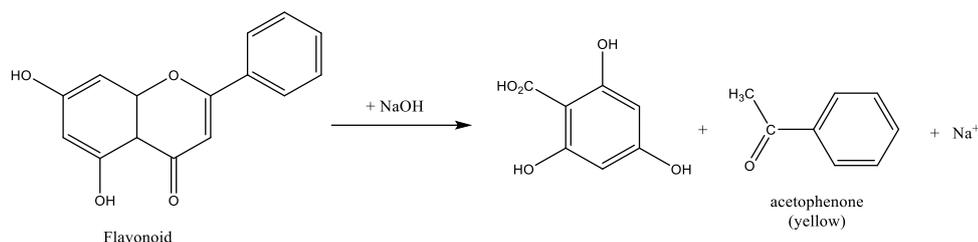
4.2 Identifikasi Senyawa Flavonoid Melalui Uji Fitokimia

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.



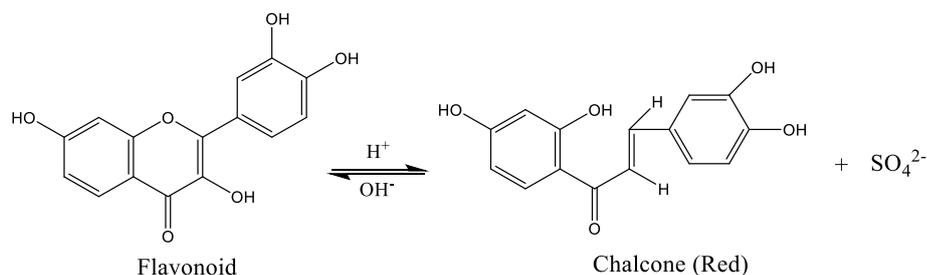
Gambar 4.4 Hasil Uji Fitokimia *Enhalus acoroides*

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 H₂SO₄ (pekat). Hal ini menunjukkan terjadinya reaksi oksidasi reduksi antara H₂SO₄ (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 H₂SO₄ dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Reaksi Flavonoid dengan H₂SO₄ (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.

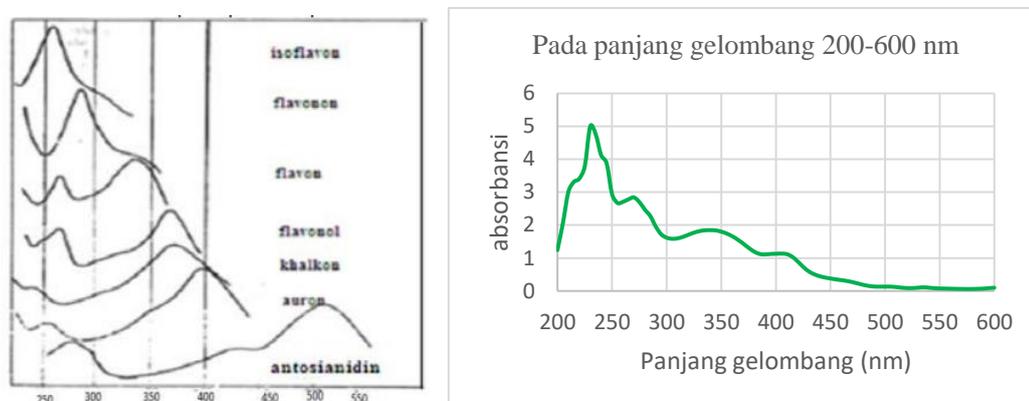
Tabel 4.1 Rentang Panjang Gelombang Flavonoid (Markham, 1988)

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

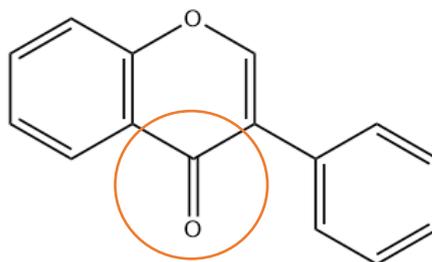


(a)

(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 Isoflavon 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*

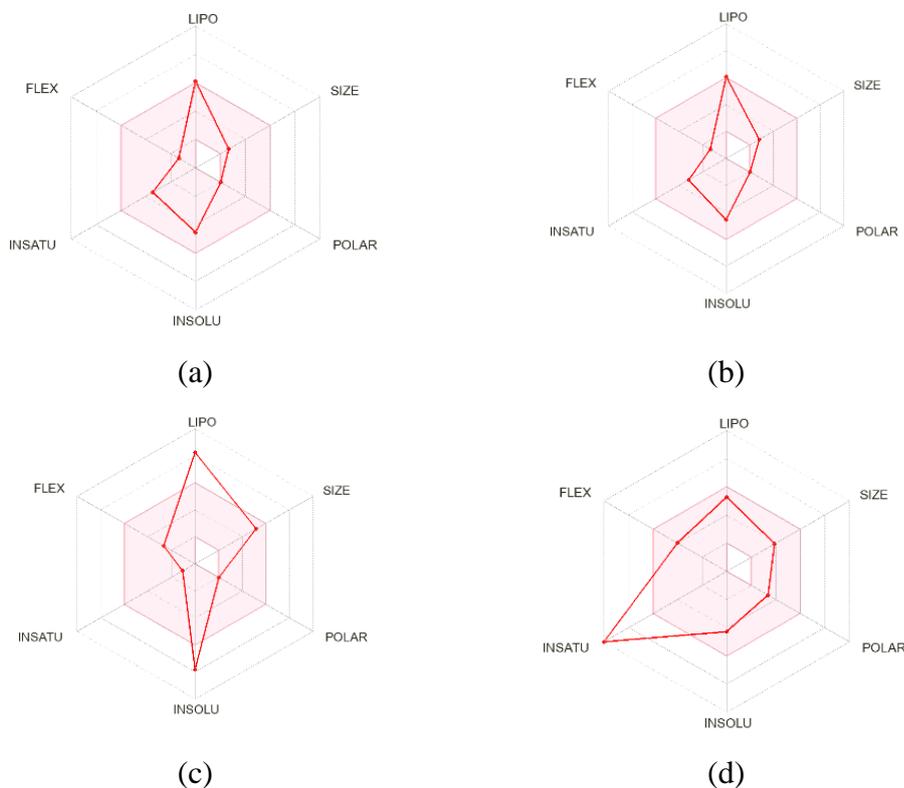
No	Compound	MW ≤500 da	Hydrogen Bond Donor < 5	Hydrogen Bond Acceptors <10	Log P ≤ 5	Rotatable Bond ≤ 9
Senyawa hasil GC-MS						
1.	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1- dimethylethyl)-</i>	310	1	1	6,139001	2
2.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	220	1	1	4,295619	2
3.	<i>Lanosterol</i>	426	1	1	8,479104	4
4.	<i>Benzamide, 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).

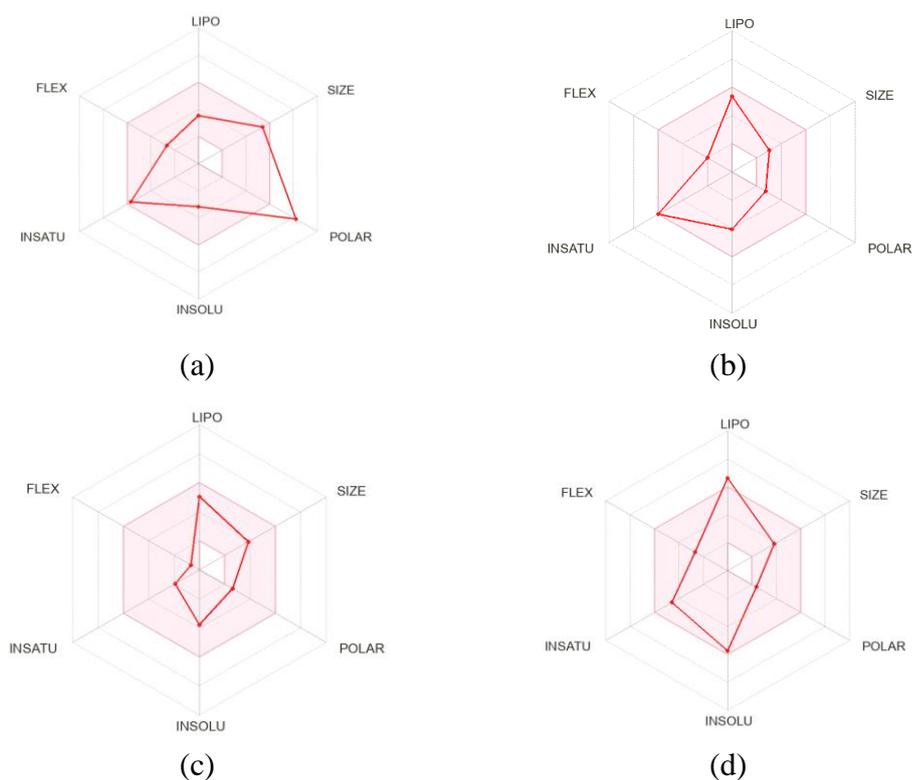


Gambar 4.9 *Bioavailability Radar* Senyawa Hasil Analisis GC-MS
 (a) *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* (b) *Butylated hydroxytoluene*
 (c) *Lanosterol* (d) *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis*

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) *Astragalin* (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

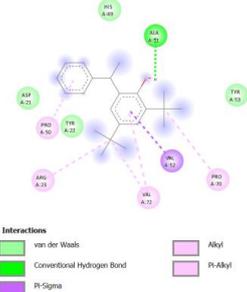
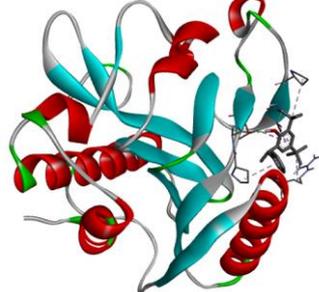
Dari Tabel 4.9 dapat diketahui bahwa interaksi 1W66 dengan Ligan GC-MS yaitu *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-*, *Butylated hydroxytoluene*, *Lanosterol*, dan *Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis* memiliki nilai *binding affinity*

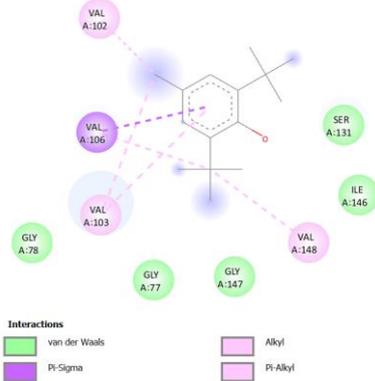
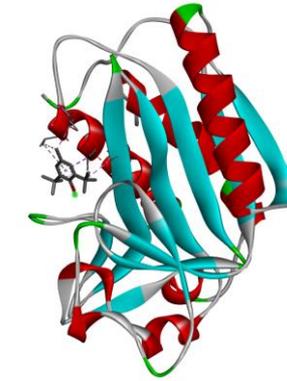
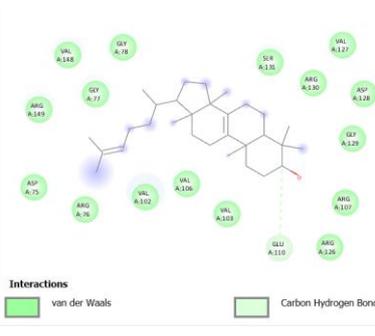
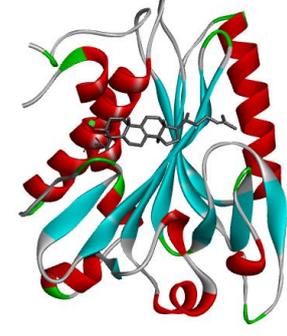
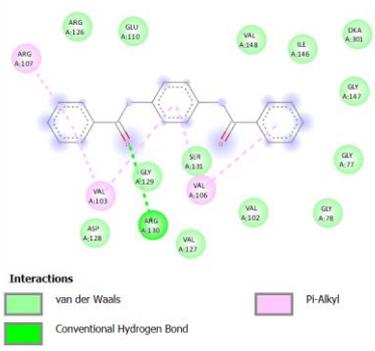
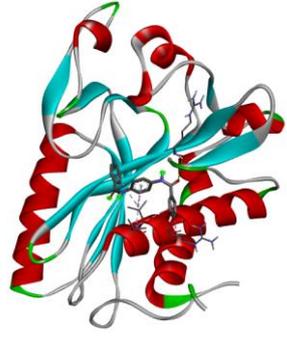
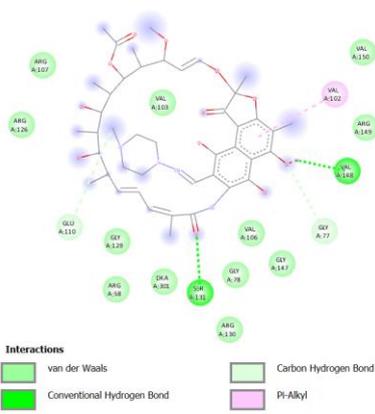
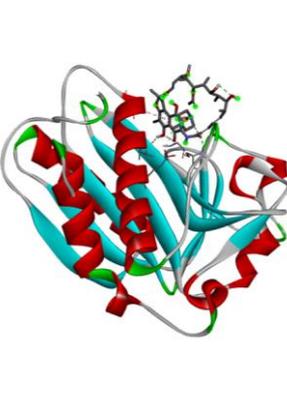
paling rendah yaitu berturut-turut -6,2; -5; -7,5 dan -6,8 kkal/mol. Selain itu dapat diketahui juga bahwa interaksi 1W66 dengan Ligan LC-MS yaitu *Astragalin*, *Levonorgestrel*, *Cannabinol*, dan *Bisphenol B* memiliki nilai *binding affinity* paling rendah yaitu berturut-turut -7,8; -7,1; -6,9 dan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

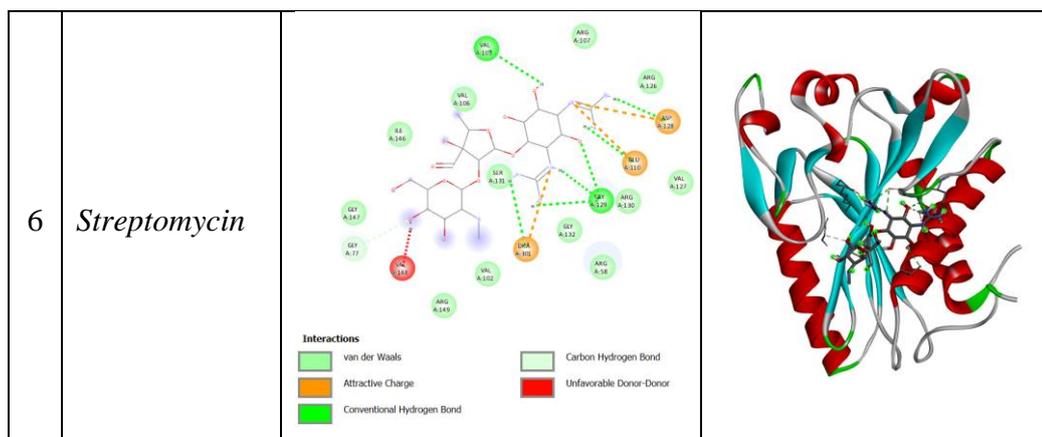
Berdasarkan Tabel 4.8 dan Tabel 4.9 nilai afinitas senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astragalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* terhadap reseptor 1W66 lebih rendah dibanding kontrol positif yaitu Rifampicin dan Streptomycin yang bernilai -7 dan -6,5 kkal/mol, yang berarti 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>		

2	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	
3	<i>Lanosterol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond 	
4	<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl 	
5	<i>Rifampicin</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Alkyl 	



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

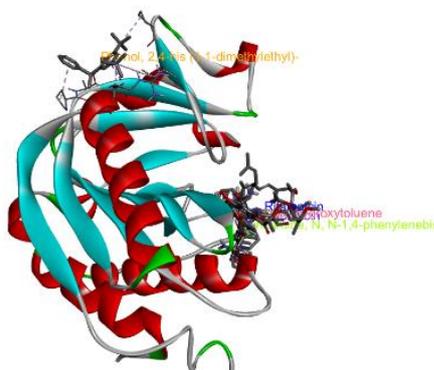
Keterangan: Residu Asam Amino yang Sama dengan Kontrol Positif merupakan data yang ditebalkan

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.

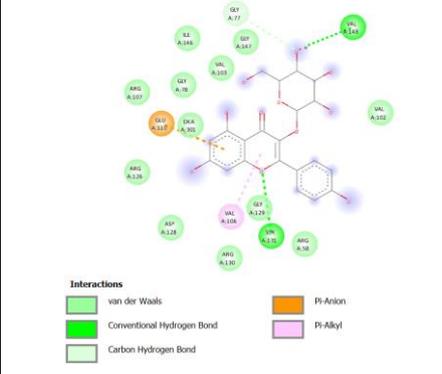
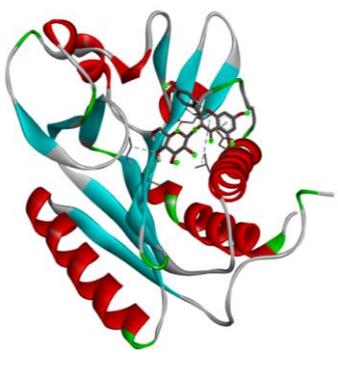
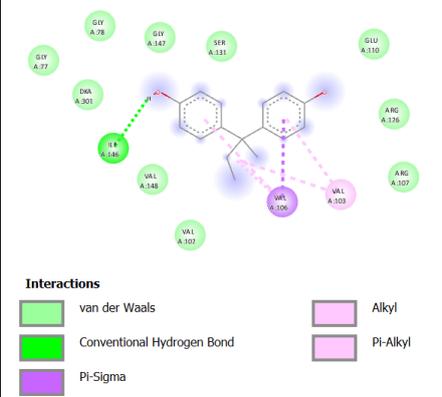
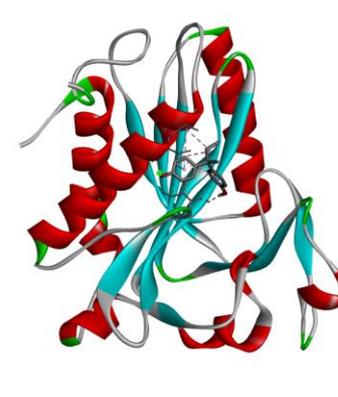
Senyawa *Butylated Hydroxytoluene* membentuk interaksi Van der Waals yang sama dengan Rifampicin pada residu asam amino GLY147, sedangkan kesamaan dengan Streptomycin pada residu asam amino GLY147, ILE146, dan SER131. Selain kesamaan pada interaksi Van der Waals, juga terjadi interaksi hidrofobik dengan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

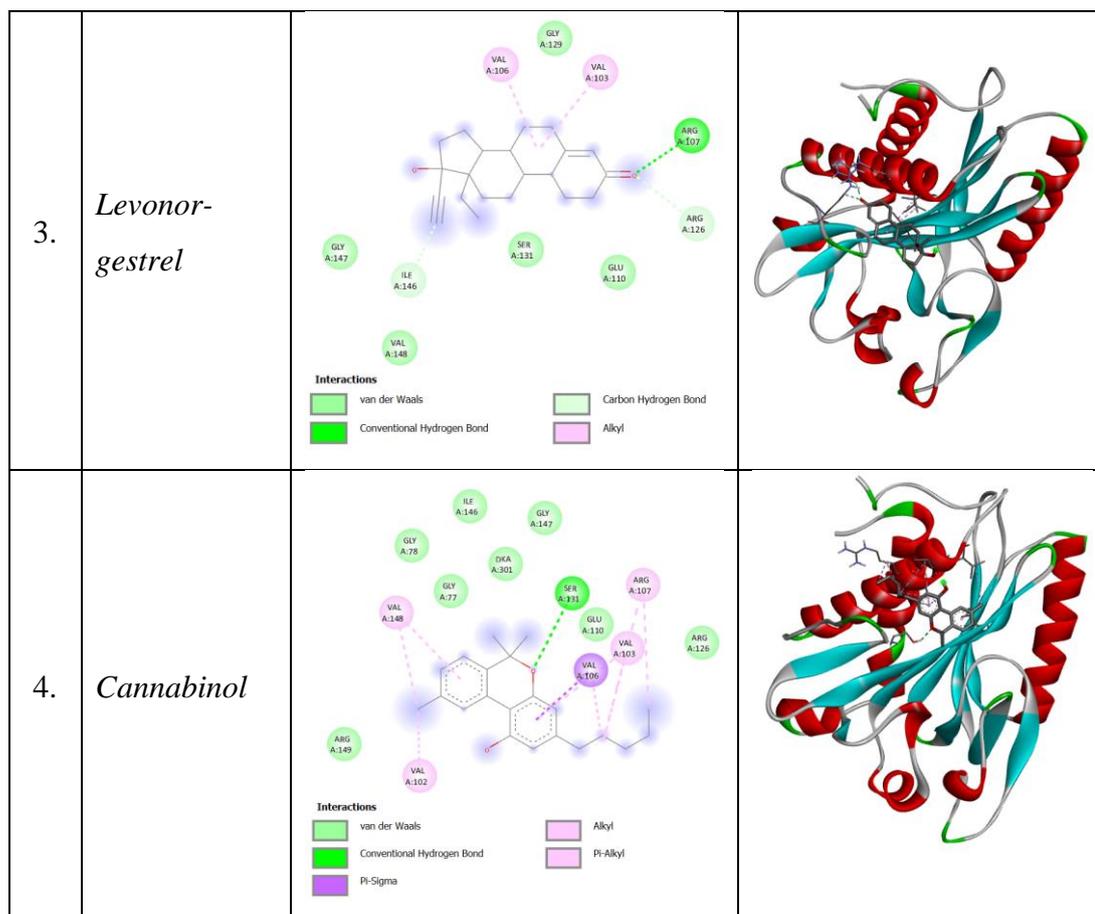
Dari keempat senyawa pada *Enhalus acoroides* hasil GC-MS, hanya senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* yang tidak memiliki kesamaan interaksi dengan kedua senyawa yang dijadikan kontrol positif. Senyawa *Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-* membentuk 4 interaksi Van der Waals, 1 Conventional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

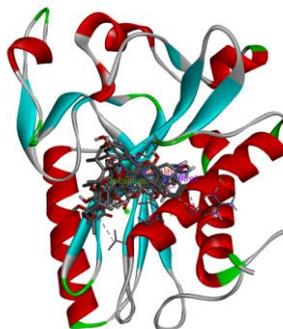
Visualisasi interaksi penambatan molekul seperti yang ditampilkan pada Tabel 4.12 dan interpretasi interaksi asam amino seperti pada Tabel 4.13 dilakukan

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.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak metanol *Enhalus acoroides* menghasilkan nilai LC₅₀ sebesar 128,22 ppm dengan interpretasi toksik.
2. *Enhalus acoroides* memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid (isoflavon) dengan nilai panjang gelombang maksimum 231,682 nm dan diidentifikasi melalui pengujian fitokimia dengan adanya perubahan warna dari hijau menjadi kuning setelah ditetesi NaOH 10% dan coklat kehitaman setelah ditetesi H₂SO₄ (pekat).
3. Senyawa *Lanosterol*, *Benzamide*, *N, N'-1,4-phenylenebis*, *Astragalin*, *Levonorgestrel*, dan *Cannabinol* memiliki kemampuan lebih baik dalam menghambat aktivitas reseptor 1W66 dengan nilai *binding affinity* sebesar -7,5; -6,8; -7,8; -7,1 dan -6,9 kkal/mol secara berurutan dan berpotensi untuk dijadikan sebagai kandidat obat anti tuberkulosis.

5.2 Saran

Berikut merupakan saran yang dapat digunakan untuk memperbaiki kekurangan pada hasil penelitian ini:

1. Perlu dilakukan pengujian *in vitro* terutama pada bakteri tuberkulosis agar diperoleh informasi secara kualitatif kemampuan senyawa menghambat sisi aktif bakteri dan informasi secara kuantitatif konsentrasi hambat maksimum senyawa sehingga bakteri menjadi in-aktif.
2. Perlu dilakukan pendekatan penambatan molekul lanjutan yakni penambatan molekul secara *dynamics molecular* untuk melihat kemampuan ikatan pada keadaan protein/enzim yang bergerak secara dinamis.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S. A. 1986. *Kimia Organik Bahan Alam*. Jakarta: Karunika.
- Adhiksana, Arief. 2017. Perbandingan Metode Konvensional Ekstraksi Pektin Dari Kulit Buah Pisang Dengan Metode Ultrasonik. *Journal of Research and Technology*, 3(2): 80-88.
- Aditya Dharma, M., Nocianitri, K. A., & Luh Ari Yusasrini, N. (2020). Pengaruh Metode Pengeringan Simplisia Terhadap Kapasitas Antioksidan Wedang Uwuh Effect of Simplisia Drying Method to the Antioxidant Capacity of Wedang Uwuh. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 9(1): 88–95.
- Aissaoui, N., Mahjoubi, M., Nas, F., Mghirbi, O., Arab, M., Souissi, Y., Hoceini, A., Masmoudi, A. S., Mosbah, A., & Klouche-khelil, N. (2018). Antibacterial Potential of 2 , 4-Di-tert-Butylphenol and Calixarene-Based Prodrugs from Thermophilic *Bacillus licheniformis* Isolated in Algerian Hot Spring from Thermophilic *Bacillus licheniformis* Isolated in Algerian Hot Spring. *Geomicrobiology Journal*, 0(0), 1–10. <https://doi.org/10.1080/01490451.2018.1503377>
- Al-Abdaly, Y. Z., Al-Hamdany, E. K., & Al-Kennany, E. R. (2021). Toxic effects of butylated hydroxytoluene in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(1), 121–128. <https://doi.org/10.33899/ijvs.2020.126435.1322>
- Albratty, M., Alhazmi, H. A., Meraya, A. M., Najmi, A., Alam, M. S., Rehman, Z., & Moni, S. S. (2023). Spectral analysis and Antibacterial activity of the bioactive principles of *Sargassum tenerrimum* J. Agardh collected from the Red sea, Jazan, Kingdom of Saudi Arabia. *Brazilian Journal of Biology*, 83, 1–10. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.249536>
- Alfian, dkk. 2021. Studi Docking Molekuler Senyawa Dalam Minyak Atsiri Pala (*Myristica fragrans* H.) Dan Senyawa Turunan Miristisin Terhadap Target Terapi Kanker Kulit. *Majalah Farmaseutik* 17(2): 233-242.
- Ali, M., S. Ravikumar, dan J. Beula. 2012. Bioaktivitas Lamun Terhadap Larva Nyamuk Demam Berdarah *Aedes aegypti*. *Jurnal Biomedis Tropis Asia Pasifik*, 2(7): 570–573.

- Amudha, P., Jayalakshmi, M., Pushpabharathi, N., & Vanitha, V. (2018). *Identification of bioactive components in enhalus acoroides seagrass extract by gas chromatography – mass spectrometry IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPONENTS IN ENHALUS ACOROIDES SEAGRASS EXTRACT BY GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY. October.* <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i10.25577>
- Anggriani, dkk. 2017. Identifikasi Fitokimia dan Karakterisasi Antosianin dari Sabut Kelapa Hijau (*Cocos nutrifera* L var *varidis*). *Jurnal Teknologi Pertanian* 18(3): 163-172.
- Angraini, N., Husna, N. N., dan Tosani, N. 2023. Pembuatan sampel ekstrak mangrove *Rhizophora Apiculata* dengan variasi suhu evaporasi guna pengayaan praktikum bioteknologi laut. *Jurnal Penelitian Sains*, 25(1): 19–23.
- Anindyawati, Trisanti. 2017. Isolasi, Uji Aktifitas Antibakteri dan Identifikasi Senyawa Aktif Kapang Endofit dari Tanaman Belimbing Manis (*Averrhoa carambola* L. *Journal of Agro-based Industry* 34(1): 1-7.
- Aprilia, V., Kirana, S., Bhima, L., & Ismail, A. (2018). Pengaruh Pemberian Butylated Hydroxytoluene (2 , 6-Di- Tert-Butyl-4-Methylphenol) Per Oral Dosis Bertingkat. *Jurnal Kedokteran Diponegoro*, 7(2), 1154–1165.
- Arief, I., & Hairunnisa. (2022). Profil ADME dari Entitas Molekul Baru yang Disetujui oleh FDA Tahun 2021: Suatu Kajian In Silico. *Jambura Journal of Chemistry*, 4(2), 1–11. <https://ejurnal.ung.ac.id/index.php/jjc/article/view/15257>
- Arunan E, Desiraju GR, Klein RA, Sadlej JS. 2011. *Definition of the hydrogen bond.* *Pure Appl Chem* 83(8): 1637-1641.
- Arwansyah, Ambarsari L, Sumaryada TI. (2014). Simulasi Docking Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Current Biochemistry* 1(1): 11-19
- Asih, I.A.R. Astuti. (2009). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Isoflavon Dari Kacang Kedelai (*Glycin max*). *Jurnal Bukit Jimboran : FMIPA, Universitas Udayana.* Hal: 35.

- Azkab, M. Husni. 1999. Pedoman Inventarisasi Lamun. *Oseana*, XXV(3): 1-16.
- Belakhdar, G., Benjouad, A.& Abdennebi, E.H. 2015. Determination of Some Bioactive Chemical Constituents from *Thesium humile* Vahl. *J. Mater. Environ. Sci.* 6(10): 2778-2783.
- Billones, J., M. Constanica, V. Organo, dan S. Joy. 2013. Virtual Screening against *Mycobacterium tuberculosis* Lipoate Protein Ligase B (MtbLipB) and In Silico ADMET Evaluation of Top Hits. *Oriental Journal of Chemistry*, 29(4): 1457-1468.
- BPOM. (2014). Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 12 Tahun 2014 Tentang Persyaratan Mutu Obat Tradisional. Badan Pengawas Obat Dan Makanan, 1–25.
- Chakraborty, S. dan Rhee KY. 2015. Tuberculosis Drug Development: History and Evolution of the Mechanism-Based Paradigm. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(8): 7-18.
- Curie CA, Darmawan MA, Dianursanti D, Budhijanto W, dan Gozan M. 2022. The Effect of Solvent Hydrophilicity on the Enzymatic Ring-Opening Polymerization of L-Lactide by *Candida rugosa* Lipase. *Polymer*, 14(3856): 1-15. DOI: 10.3390/polym14183856.
- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- Darmapatni, K. A. G. 2016. Pengembangan Metode GC-MS untuk Penetapan Kadar Acetaminophen pada Spesimen Rambut Manusia. *Jurnal Biosains Pascasarjana*, 18(3): 255.
- DataBoks. 2022. Layanan Konsumen dan Kesehatan.
- Deswita, Silvia., Rahma, N., Eva, Njurumana, C. Violica dan Yanuarti, Rini. 2022. Pengujian Flavonoid Total Dan Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi Aktif Daun Akar Kaik-Kaik (*Uncaria cordata* (Lour.) Merr) Yang Berpotensi Sebagai Obat Diare. *Jurnal Biologi dan Pembelajarannya (JB&P)*, 9(2): 105-112.

- Dewi, C. S. U., Soedharma, D., dan Kawaroe, M. 2012. Lamun Enhalus acoroides dan Thalassia Hemprichii Dari Pulau Pramuka, DKI Jakarta. *Jurnal Teknologi Perikanan Dan Kelautan*, 3(2): 23–27.
- Dewi, C.S.U., Kasitowati, R.D., dan Siagian, J.A. 2018. Phytochemical compounds of Enhalus acoroides from Wanci Island (Wakatobi) and Talango Island (Madura) Indonesia. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 137(1): 1-5.
- Dhorajiwala, T.M., S.T. Halder, and L. Samant. 2019. Comparative In Silico Molecular Docking Analysis of L-Theoronine-3 Dehydrogenase, a Protein Target Against African Trypanosomiasis Using Selected Phytochemicals. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 6(3): 101 – 108.
- Dinas Kesehatan Kota Semarang. 2017. Profil Kesehatan Kota Semarang 2017. www.dinkes.semarangkota.go.id
- Diva Candraningrat, I. D. A. A., Santika, A. A. G. J., Dharmayanti, I. A. M. S., dan Prayascita, P. W. 2021. Review Kemampuan Metode Gc-Ms Dalam Identifikasi Flunitrazepam Terkait Dengan Aspek Forensik Dan Klinik. *Jurnal Kimia*, 15(1): 12-19.
- Effendi, N., Saputri, N. A., Purnomo, H., & Aminah. (2023). In Silico ADME-T dan Molekular Docking Analog Tamoxifen Sebagai Kandidat Agen Terapi Kanker Payudara. *Media Farmasi*, 19(1), 9–19. <https://doi.org/https://doi.org/10.32382/mf.v19i1.3305>
- Erni, Anastasia dan Priyastiwi. 2021. Upaya Peningkatan Kinerja Seksi Pengendalian dan Pemberantasan Penyakit Menular (Penyakit Tuberkulosis) dalam Penanggulangan Kasus di Kabupaten Magelang. *Jurnal Riset Akuntansi dan Bisnis Indonesia STIE Widya Wiwaha* 1(2): 550-562.
- Fahim, S. A., Ibrahim, S., Tadros, S. A., & Badary, O. A. (2023). Protective effects of butylated hydroxytoluene on the initiation of N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular carcinoma in albino rats. *Human and Experimental Toxicology*, 42, 1–11. <https://doi.org/10.1177/09603271231165664>

- Fatima, R., Ashraf, M., Ejaz, S., Rasheed, M. A., Altaf, I., Afzal, M., Batool, Z., Saleem, U., & Anwar, K. (2013). In vitro toxic action potential of anti tuberculosis drugs and their combinations. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2): 501–513. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.05.008>.
- Fazri, B. 2011. Penapisan In Silico Antimalaria Terhadap Target Plasmodium falciparum Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase. *Skripsi*. FMIPA UI
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., dan Andricopulo, A. D. 2015. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. *Molecules*, 20(7): 13384–13421.
- Firdiyani, dkk. 2017. Potensi Senyawa Bioaktif Tanaman Genus Phyllanthus Sebagai Inhibitor Replikasi Virus Hepatitis B. *Jurnal Bioteknologi dan Biosains Indonesia* 5(2): 85-95.
- Fransina, E. G., Tanasale, M. F. J. D. P., Latupeirissa, J., Malle, D., & Tahapary, R. (2019). Phytochemical screening of water extract of gayam (*Incarpus edulis*) Bark and its amylase inhibitor activity assay. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 509(1): 1–7. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/509/1/012074>
- Frizqia dkk. 2020. Uji Toksisitas Infusa *Acalypha Siamensis* dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Jurnal Farmaka* 18(1): 14-22.
- Gede,dkk. 2021. Review Artikel: Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Herba Meniran. *Jurnal Farmasi Malahayati* 4(1): 44-52.
- Guo, Qiao-Qiao & Zhang, Wen-Bin & Zhang, Chao & Song, Yu-Lu & Liao, Yu-Ling & Ma, Jincheng & Yu, Yong-Hong & Wang, Hai-Hong. 2019. Characterization of 3-Oxacyl-Acyl Carrier Protein Reductase Homolog Genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1Table_1.DOCX. *Frontiers in Microbiology*, 10: 1-12.
- Gustavina, N. L. G. W. B., Dharma, I. G. B. S., dan Faiqoh, E. 2017. Identifikasi Kandungan Senyawa Fitokimia Pada Daun dan Akar Lamun di Pantai Samuh Bali. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*, 4(2): 271-277.
- Güven, H., Arıcı, A., dan Simsek, O. 2019. Flavonoids in Our Foods: A Short Review. *J Basic Clin Health Sci*, 3: 96-106.

- Hardjono. 1998. *Spektrofotometri*. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung.
- Helmidanora Rusdiati, Sukawaty, Y., dan Warnida, H. 2020. Penetapan Kadar Flavonoid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) Dengan Spektrofotometri Uv-Vis. 10(2): 160– 165.
- Hopf, F. S. M., Roth, C. D., de Souza, E. V., Galina, L., Czczot, A. M., Machado, P., Basso, L. A., & Bizarro, C. V. (2022). Bacterial Enoyl-Reductases: The Ever-Growing List of Fabs, Their Mechanisms and Inhibition. *Frontiers in Microbiology*, 13(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.891610>
- Huang, J., Yu, J., Tu, L., Huang, N., Li, H., & Luo, Y. (2019). Isocitrate dehydrogenase mutations in glioma: From basic discovery to therapeutics development. *Frontiers in Oncology*, 9(JUN), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00506>
- Hutomo, M. & Nontji, A. 2014. *Panduan Monitoring Padang Lamun*. COREMAP - CTI Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia.
- Irawan, A. 2019. Kalibrasi Spektrofotometer Sebagai Penjaminan Mutu Hasil Pengukuran dalam Kegiatan Penelitian dan Pengujian. *Indonesian Journal of Laboratory*, 1(2): 1-9.
- Ismarani, I. 2012. Potensi Senyawa Tannin Dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *CEFARS: Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*, 3(2): 46-55.
- Kaihena, M. 2013. Propolis Sebagai Imunostimultor Terhadap Infeksi *Microbacterium Tuberculosis*. *Prosiding FMIPA* 69: 80.
- Kaimudin, Ifandris. 2022. Pengaruh Serbuk Biji Atung Terhadap Umur Kesegaran Cumi-Cumi Pasca Tangkap. *Jurnal Ilmu Perikanan dan Masyarakat Pesisir* 8(2): 45-52.
- Kalita, J., Chetia, D., & Rudrapal, M. (2019). Molecular Docking, Drug-Likeness Studies and ADMET Prediction of Quinoline Imines for Antimalarial Activity. *Chemical Science Transactions*, 8(2), 208–218. <https://doi.org/10.7598/cst2019.1569>
- Kannan, Rengasamy Ragupathi Raja, Rajasekaran Arumugam, dan Perumal Anantharaman. 2010. In vitro antioxidant activities of ethanol extract from

- Enhalus acoroides (L.F.) Royle. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(11): 898-901.
- Katno. 2008. *Tingkat Manfaat, Keamanan dan Efektifitas Tanaman Obat dan Obat Tradisional*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. Karanganyar.
- Kawaroe, M., Nugraha, AH., Juraij, I.A. dan Tasabaramo. 2016. Seagrass Biodiversity at Three Marine Ecoregions of Indonesia Sunda Shelf, Sulawesi Sea, and Banda Sea. *Journal of Biological Diversity*, 17(2): 585-591.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2011. Ditjen Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. *Pedoman Nasional Pengendalian Tuberkulosis*.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2022. Ditjen Penyakit Dan Penyehatan Lingkungan. <https://tbindonesia.or.id/>, diakses 30 Desember 2022.
- Kementrian Kelautan dan Perikanan. 2013. "Pendataan Ekosistem Lamun". <https://kkp.go.id/djprl/p4k/page/4333-pendataan-ekosistem-lamun>, diakses pada 9 Oktober 2022.
- Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 661/MENKES/SK/VII/1994 tentang Persyaratan Obat Tradisional. 9
- Khaerunnisa, dkk. 2020. Potential Inhibitor of COVID-19 Main Protease (Mpro) from Several Medicinal Plant Compounds by Molecular Docking Study. Halaman 1-14. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0226.v1>
- Kiran, G., Karthik, L., Devi, M. S. S., Sathiyarajeswaran, P., Kanakavalli, K., Kumar, K. M., & Kumar, D. R. 2020. In silico computational screening of Kabasura Kudineer-official Siddha formulation and JACOM against SARS-CoV-2 spike protein. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*. vol. xxx(xxx): 1-8.
- Kumalasari, E. N. S. 2015. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimia. *Science*, 1(2), 51–62. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.330.6006.913-a>

- Kumar, P. P., Kumaravel, S., & Lalitha, C. (2010). African journal of biochemistry research. *African Journal of Biochemistry Research* , 4(7), 191–195. <http://www.academicjournals.org/journal/AJBR/article-abstract/743A94611519>
- Kumar, V., Bhatnagar, A.K. & Srivastava, J.N. 2011. Antibacterial Activity of Crude Extract of Spirulina plantesis and Its Structural Elucidation of Bioactive Compound. *J. of Med. Plants Res.* 5(32):7043-7048.
- Kurniawan, H. dan Meri. 2021. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research* 3(2): 52-62.
- Kurniawan, Hadi. dan M. Ropiqa. 2021. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Daun Ekor Kucing (*Acalypha hispida* Burm.f.) Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 3(2): 52-62.
- Kurniawati, Anindita. 2019. Pengaruh Jenis Pelarut Pada Proses Ekstraksi Bunga Mawar Dengan Metode Maserasi Sebagai Aroma Parfum. *Journal of Creativity Student*, 2(2): 74-83.
- Kusnadi dan Devi, E. T. 2017. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavanoid Pada Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Dengan Metode Refluks. *Pancasakti Science Education Journal*, 2(1): 56–67.
- Leila, A., Lamjed, B., Roudaina, B., Najla, T., & Taamalli, A. (2019). Microbial Pathogenesis Isolation of an antiviral compound from Tunisian olive twig cultivars. *Microbial Pthogenesis*, 128(January), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.01.012>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23(3): 3-25.
- Mahmiah, M., Sa'adah, N., Sunur, H. N., dan Wijayanti, N. 2023. Profil Metabolit Ekstrak Etanol Enhalus acoroides (L.F.) Royle,1839 dari Nusa Tenggara Timur. *Journal of Marine Research*, 12(1): 151–160.

- Malau, N. D., & Sianturi, M. (2019). Analisa Interaksi Hidrofobik terhadap Kestabilan Termal Enzim Xilanase *Aspergillus niger*. *Jurnal EduMatSains*, 3(2), 215–227.
- Manalu, R. T. (2021). Molecular docking senyawa aktif buah dan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap main protease pada SARS-CoV-2. *Forte Jurnal*, 1(2), 9–16. www.ojs.unhaj.ac.id/index.php/fj
- Manuhuttu, D., Nur, A., & Saimina. (2021). Potensi Ekstrak Daun Mangrove (*Sonneratia alba*) Sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli*. *Biopendix*, 7(2): 71–79.
- Markham KR. 1988. *Techniques of Flavonoid Identification*. London: Academic Pr.
- Massengo-Tiassé, R. P., & Cronan, J. E. (2009). Diversity in enoyl-acyl carrier protein reductases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66(9), 1507–1517. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8704-7>
- Mawarda, A., Samsul, E., dan Sastyarina, Y. 2020. Pengaruh Berbagai Metode Ekstraksi dari Ekstrak Etanol Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine americana* Merr) terhadap Rendemen Ekstrak dan Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Proceeding of Mulawarman Pharmaceuticals Conferences (Proc. Mul. Pharm. Conf.)*, 11(1): 1–4.
- Mawazi, S. M., Hadi, H. A. B., Al-Mahmood, S. M. A., dan Doolaanea, A. A. 2019. Development and Validation of UV-Vis Spectroscopic Method of Assay of Carbamazepine in Microparticles. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(1): 34–37.
- Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, dan McLaughlin JL. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Journal of Medicinal Plant Research*, 45(5): 31-34.
- Mukesh B. dan Rakesh K. 2011. Molecular Docking: A Review. *IJRAP* 2(6): 1746-1751.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif. *Jurnal Kesehatan*, VII(2): 361-367.

- Mutiyani, N. 2013. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etil Asetat Daun *Garcinia benthami* Pierre Dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT). *Skripsi. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah Jakarta*. 1–67.
- Naufa, F., Mutiah, R., & Indrawijaya, Y. Y. A. (2022). Studi in silico potensi senyawa katekin teh hijau (*Camellia sinensis*) sebagai antivirus SARS CoV-2 terhadap spike glycoprotein (6LZG) dan main protease (5R7Y). *J.Food Pharm.Sci*, 10(1), 584–596. www.journal.ugm.ac.id/v3/JFPA
- Neni, dkk. 2021. Studi molecular docking senyawa 1,5-benzothiazepine sebagai inhibitor dengue DEN-2 NS2B/NS3 serine protease. *Chempublish Journal* 6 (1): 54-62.
- Nevi, dkk. 2012. Identifikasi Antioksidan Ekstrak Batang Bakau Hitam Menggunakan Metode 1,1-Diphenyl-2-Picrylhidrazyl (DPPH). *Jurnal Perikanan* hal 1-8.
- Ningrat, A. W. S. (2022). Docking Molekuler Senyawa Brazilein Herba *Caesalpinia Sappanis Lignum* Pada *Mycobacterium Tuberculosis Inha* Sebagai Antituberkulosis. *Indonesian Health Journal (INHEALTH)*, 1(1), 29–34.
- Noor, N.M., Febriani, D., dan Ali, M. 2022. Seagrass of *Enhalus Acoroides* as a Traditional Body Scrubs in Preventing Malarial Bites by Pahawang Island Community in Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1012: 1-8.
- Noviani, N., & Vitri, N. 2017. *Farmakologi*. Kementerian Kesehatan RI.
- Novitasari, A.E. dan D.Z. Putri. 2016. Isolasi dan Identifikasi Saponin Pada Ekstrak Daun Mahkota Dewa Dengan Ekstraksi Maserasi. *Jurnal Sains*, 6(12): 10-14.
- Nurafni, N., dan Rinto Muhammad Nur, R. 2018. Aktivitas Antifouling Senyawa Bioaktif Dari Lamun di Perairan Pulau Morotai. *Jurnal Ilmu Kelautan Kepulauan*, 2(1): 107–112.
- Nurjannah, I., Ayu, B., Mustariani, A., & Suryani, N. (2022). Skrining Fitokimia dan Uji Antibakteri Ekstrak Kombinasi Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) Dan Kelor (*Moringa oleifera* L.) Sebagai Zat Aktif Pada Sabun Antibakteri.

SPIN: Jurnal Kimia & Pendidikan Kimia, 4(1): 23–36.
<https://doi.org/10.20414/spin.v4i1.4801>

- Orno, T. G., dan Rantesalu, A. 2020. Invitro Citotoxicity Assays Of Seagrass (Enhalus acoroides) Methanol Extract From Soropia Coastal Waters Southeast Sulawesi Regency. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 2(1): 27–33.
- Otto S, Engberts JBFN. 2003. Hydrophobic interactions and chemical reactivity. *Org Biomol Chem* 1: 2803-2820.
- Owolabi, I.O., Yupanqui, C.T., dan Siripongvutikorn, S. 2018. Enhancing Secondary Metabolites (Emphasis on Phenolics and Antioxidants) in Plants through Elicitation and Metabolomics. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17(9): 411-420.
- Pandey, P., Rane, J. S., Chatterjee, A., Kumar, A., Khan, R., Prakash, A., & Ray, S. 2020. Targeting SARS-CoV-2 spike protein of COVID-19 with naturally occurring phytochemicals: an in silico study for drug development. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*: 1–11.
- Permana, R., A. Andhikawati, N. Akbarsyah, dan P. Kusuma. 2020. Identifikasi Senyawa Bioaktif dan Potensi Aktivitas Antioksidan Lamun Enhalus acoroides (Linn. F). *Jurnal Akuatek*, 1(1): 66-72.
- Pianowski, L. F., Calixto, J. B., Leal, P. C., & Chaves, C. P. (2016). *Pharmaceutical Uses of Lanosta-8,24-dien-3-ols*. 1(19).
- Prakash, A. & Vuppu, .Dr Suneetha. (2014). Punica granatum (pomegranate) rind extract as a potent substitute for lascorbic acid with respect to the antioxidant activity. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 5. 597-603.
- Pranowo H.D. 2009. Teknologi Informasi dalam Mendukung Riset di Bidang Kimia. *Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia*: 10-24.
- Prasetiawati, R., Suherman, M., Permana, B., dan Rahmawati. 2021. Molecular Docking Study of Anthocyanidin Compounds Against Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) as Anti-Lung Cancer. *IJPST: Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 8(1): 8-20.

- Pratama, A. A., Rifai, Y., dan Marzuki, A. 2017. Docking Molekuler Senyawa 5,5'-Dibromometilsesamin. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*, 21(3): 67–69.
- Pratiwi, dkk. 2022. Analisis Senyawa Paracetamol (Acetaminophen) dalam Sampel Urin Menggunakan Metode Kromatografi dan Spektrometri. *Jurnal Health Sains* 3(4): 548-555.
- Pratoko, D. K. 2012. Molecular Docking Senyawa Fitokimia Piper Longum (L.) Terhadap Reseptor Siklooksigenase-2 (Cox-2) Sebagai Antiinflamasi. *Chemistry Progress*, 5(1): 31–36.
- PubChem. (2021, September 30). PubChem Compound Summary for CID 246983, Lanosterol. Diakses pada 29 Agustus 2023 melalui <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/246983>.
- Pujamada, dkk. 2022. Penentuan Kondisi Optimum Kromatografi Cair Kinerja Tinggi untuk Pemisahan Asam Lemak Hidroksamik Berbasis Minyak Inti Buah Ketapang. *Jurnal Kimia* 16(1): 84-92.
- Puranik, Ninad., Srivastava, Pratibha., Swami, Sagar., Choudhari, Amit, dan Sarkar, Dhiman. 2018. Molecular modeling studies and: In vitro screening of dihydrorugosaflavonoid and its derivatives against Mycobacterium tuberculosis. *RSC Advances*, 8: 10634-10643.
- Purnama, A. A., dan Brahmana, E. M. 2018. Bioaktivitas Antibakteri Lamun *Thalassia hemprichii* dan *Enhalus acoroides*. *Jurnal Biologi Unand*, 6(1): 45-50.
- Puspa, O. E., Syahbanu, I., dan Wibowo, M. A. 2017. Uji Fitokimia dan Toksisitas Minyak Atsiri Daun Pala (*Myristica fragans* Houtt) Dari Pulau Lemukutan. *Jurnal Kimia Khatulistiwa*, 6(2): 1–6.
- Puspasari, dkk. 2020. Uji Sitotoksik dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pandan Laut (*Pandanus Odorifer*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Pendidikan dan Ilmu Kimia* 4(1): 42-50.
- Qi, S.-H., Zhang, S., Qian, P.-Y., dan Wang, B.-G. 2008. Senyawa Antifeedant, Antibakteri, dan Antilarva Dari Lamun Laut Cina Selatan (*Enhalus acoroides*). *Botanica Marina*, 51(5): 441-447.

- Quémard, A., Sacchettini, J. C., Dessen, A., Vilcheze, C., Bittman, R., Jacobs, W. R., & Blanchard, J. S. (1995). Enzymatic Characterization of the Target for Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry*, 34(26), 8235–8241. <https://doi.org/10.1021/bi00026a004>
- Rahakbauw, I. D., dan Watuguly, T. 2016. Analisis Senyawa Flavonoid Daun Lamun Enhalus *Acoroides* Di Perairan Pantai Desa Waai Kabupaten Maluku Tengah. *BIOPENDIX: Jurnal Biologi, Pendidikan Dan Terapan*, 3(1): 53–62.
- Rahman, M.F. 2008. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Papaya pada Ikan Gurami yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor
- Ratu BDPM, Bodhi W, Budiarmo F, Kepel BJ, Fatimawali, Manampiring A. 2021. Molecular Docking Senyawa Gingerol dan Zingiberol pada Tanaman Jahe sebagai Penanganan Covid-19. *eBiomedik* 9(1): 126-130.
- Ren, J., Wang, J., Karthikeyan, S., Liu, H., & Cai, J. (2019). Natural anti-phytopathogenic fungi compound phenol, 2, 4-bis (1, 1-dimethylethyl) from *Pseudomonas fluorescens* TL-1. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics*, 56(2), 162–168.
- Rizwani, W., dan Suprianto. 2017. Penggunaan Obat Anti Tuberkulosis di Puskesmas Kota Juang Kabupaten Bireuen Aceh. *Journal of The Pharmaceutical Works*, 1(2): 70-73.
- Roiaini, M., Seyed, H.M., Jinap, Selamat dan Hussain, Norhayati. 2016. Effect of extraction methods on yield, oxidative value, phytosterols and antioxidant content of cocoa butter. *International Food Research Journal*, 23(1): 47-54.
- ROTH. 2022. *Safety Data Sheet*. United Kingdom.
- Rozwarski DA, Vilchèze C, Sugantino M, Bittman R, Sacchettini JC. Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* enoyl-ACP reductase, InhA, in complex with NAD⁺ and a C16 fatty acyl substrate. *J Biol Chem*. 1999 May 28;274(22):15582-9. doi: 10.1074/jbc.274.22.15582. PMID: 10336454.
- Rukachaisirikul, T., Siriwanakit, P., Sukcharoenphol, K., Wongvein, C., Ruttanaweang, P., Wongwattanavuch, P., & Suksamrarn, A. (2004).

Chemical constituents and bioactivity of *Piper sarmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2–3), 173–176.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.01.022>

- Rumiantin, R. Octavia. 2011. Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia Dan Aktivitas Antioksidan Lamun *Enhalus acoroides*. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Ruswanto. 2015. Molecular Docking Empat Turunan Isonicotinohydrazide Pada *Mycobacterium Tuberculosis* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (InhA). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*, 13(1): 135-141.
- S, Jumaetri., S. Nur, A. Sapra, dan Libertin. 2020. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Lamun (*Enhalus acoroides*) Asal Pulau Lae-Lae Makassar Terhadap Radikal ABTS. *Media Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar*, 15(2): 116-119.
- Sahumena, M. H., Nurrohwindi, E., Jenderal, J., No, S., dan Gorontalo, K. 2020. Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometri Uv-Vis. *Journal Syifa Sciences and Clinical Research*, 2(2): 65–72.
- Saifudin, A. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta: Deepublish.
- Sari, Denni., Deza, Ahmad., Ilma, Ina dan Lestari, Retno. 2018. Perbandingan Metode Uji Kandungan Total Fenolik Dari Ekstrak Rumput Laut *Euclima Cottonii* Lontar Banten. *Teknika: Jurnal Sains dan Teknologi*, 14(1): 39-46.
- Sarinawaty, P., Idris, F., dan Nugraha, A. H. 2020. Karakteristik Morfometrik Lamun *Enhalus acoroides* dan *Thalassia hemprichii* di Pesisir Pulau Bintan. *Journal of Marine Research*, 9(4): 474–484.
- Satrya, C., Yusuf, M., Shidqi, M., Subhan, B., Arafat, D., Anggraeni, F. 2012. Keragaman Lamun Di Teluk Banten, Provinsi Banten. *Jurnal Teknologi Perikanan dan Kelautan*, 3(2): 29–34.
- Savjani, K. T., Gajjar, A. K., & Savjani, J. K. (2012). Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. *ISRN Pharmaceutics*, 2012, 1–10.
<https://doi.org/10.5402/2012/195727>

- Setiawan, H., dan Irawan, M. I. 2017. Kajian Pendekatan Penempatan Ligan Pada Protein Menggunakan Algoritma Genetika. *Jurnal Sains dan Seni ITS*, 6(2): 2–6.
- Setyoningrum, D., A. Yamindago, S. Hikmah, dan M. Maftuch. 2020. Phytochemical Analysis and in vitro Antibacterial Activities of Seagrass *Enhalus acoroides* against *Staphylococcus aureus*. *Research Journal of Life Science*, 7(2): 85-91.
- Sholihah, Mar'atus. 2017. Aplikasi Gelombang Ultrasonik untuk Meningkatkan Rendemen Ekstraksi dan Efektivitas Antioksi dan Kulit Manggis. *Jurnal Keteknik Pertanian*, 5(2): 161-168.
- Singh, D.B. and T. Tripathi. 2020. *Frontiers in Protein Structure, Function, and Dynamics*, Singapore: Springer.
- Singh, K., Pandey, N., Ahmad, F., Upadhyay, T. K., Islam, M. H., Alshammari, N., Saeed, M., Al-Keridis, L. A., & Sharma, R. (2022). Identification of Novel Inhibitor of Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase (InhA) Enzyme in *Mycobacterium tuberculosis* from Plant-Derived Metabolites: An In Silico Study. *Antibiotics*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081038>
- Sjafrie, N. D. M., Hernawan, U. E., Prayudha, B., Rahmat, R., Supriyadi, I. H., Iswari, M. Y. Rahmawati, S., dan Suyarso. 2018. Status Padang Lamun Indonesia 2018 Ver.02. Pusat Penelitian Oseanografi-LIPI. Jakarta.
- Sugiarti, S., M. Ramadhian, dan N. Carolia. 2018. Vitamin D Sebagai Suplemen Dalam Terapi Tuberkulosis Paru. *Jurnal Kedokteran*, 7(11): 198-202.
- Suharto, M.A.P., H.J. Edy dan J.M. Dumanauw. 2016. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Saponin dari Ekstrak Metanol Batang Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.). *Jurnal Sains*, 3(1): 86-92.
- Sulistiyani, Wahjono, H., Radjasa, O. K., Sabdono, A., Khoeri, M. M., dan Karyana, E. 2015. Antimycobacterial Activities from Seagrass *Enhalus* sp. Associated Bacteria Against Multi Drug Resistance Tuberculosis (MDR TB) Bacteria. *Procedia Environmental Sciences*, 23: 253–259.
- Sumampouw, Oksfriani J. 2010. Uji in Vitro Aktivitas Antibakteri dari Daun Sirih. *Jurnal Biomedik*, 2(3): 187-193.

- Sun, L., Wu, C., Xu, J., Zhang, S., Dai, J., & Zhang, D. (2020). Addition of butylated hydroxytoluene (BHT) in tris-based extender improves post-thaw quality and motion dynamics of dog spermatozoa. *Cryobiology*, 97, 71–75. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.006>
- Susanty. 2016. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Refluks Terhadap Kadar Fenolik Dari Ekstrak Tongkol Jagung (*Zea mays* L). *Jurnal Konversi*, 5(2): 8-14.
- Syafrida, M., Darmanti, S., & Izzati, M. (2018). Pengaruh Suhu Pengeringan Terhadap Kadar Air, Kadar Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun dan Umbi Rumpuk Teki (*Cyperus rotundus* L.). *Bioma : Berkala Ilmiah Biologi*, 20(1): 44-50. <https://doi.org/10.14710/bioma.20.1.44-50>
- Syahputra G, Ambarsari L, dan Sumaryada, T. 2014. Simulasi Docking Kurkumin Enol, Bisdemetoksikurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Enzim 12-Lipoksigenase. *Jurnal Biofisika*; 10(1): 55-67.
- Taminggu, Elsa. R. N., dan Tahril. 2022. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Batang dan Daun Lamun (Seagrass) di Teluk Palu. *Media Eksakta*, 18(1): 6–11.
- Tiji, S., Rokni, Y., Benayad, O., Laaraj, N., Asehrou, A., & Mimouni, M. (2021). Chemical Composition Related to Antimicrobial Activity of Moroccan *Nigella sativa* L. Extracts and Isolated Fractions. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8308050>
- Tijjani, Habibu., Ahmed Olatunde, Adehbenro Peter Adegunloye, dan Ahmed Adebayo. (2022). In silico insight into the interaction of 4-aminoquinolines with selected SARS-CoV-2 structural and nonstructural proteins. *Coronavirus Drug Discovery: Druggable Targets and In Silico Update*, 3(1): 313-333.
- Tuapattinaya, P. M. J., dan Rumahlatu, D. 2019. Analysis of Flavonoid Levels of *Enhalus acoroides* in Different Coastal Waters in Ambon Island, Indonesia. *International Journal of Applied Biology*, 3(1) : 70–80.

- Vasudevan, S., Venkatraman, A., Yahooob, S. A. M., Sasirekha, Jojula, M., Sundaram, R., & Boomi, P. (2021). Biochemical evaluation and molecular docking studies on encapsulated astaxanthin for the growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(S1), 31–39. <https://doi.org/10.7324/JABB.2021.95.1s6>
- Verencia, Andrea., G. Rizki., dan Ovikariani. 2022. Studi Pola Penggunaan Obat Anti Tuberkulosis Pada Pasien Tuberkulosis Paru. *Jurnal Surya Medika* 8(1): 161-167.
- Vicanova, S. dan Pavel. The hunt for natural skin whitening agents. *International journal of molecular sciences*, 10, 5326-5349.
- Vidyastari, Y. S., Riyanti, E., dan Cahyo, K., 2019. Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Pencapaian Target CDR (Case Detection Rate) Oleh Koordinator P2TB Dalam Penemuan Kasus Di Puskesmas Kota Semarang. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 7(1): 535 - 544.
- Wagey, B. T., dan Sake, W. 2013. Variasi Morfometrik Beberapa Jenis Lamun Di Perairan Kelurahan Tongkeina Kecamatan Bunaken. *Jurnal Pesisir Dan Laut Tropis*, 3(1): 36-44.
- Wahyudin, Elly. 2020. Buku Ajar Farmakokinetik. PT Nasya Expanding Management: Pekalongan.
- Warono, D., dan Syamsudin. 2019. Unjuk Kerja Spektrofotometer Analisa Zat Aktif Ketoprofen. *Konversi*, 2(2): 57-65
- Wattenberg, L. W. (1986). Protective effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 24(10–11), 1099–1102. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(86\)90294-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(86)90294-2)
- Wibisono, N., dan Martino, Y.A. 2023. Uji Aktivitas Antidiabetes Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris*) melalui Studi In Silico dan Prediksi Profil Farmakokinetika. *e-Jurnal Ilmiah Biosaintropis (Bioscience-Tropic)* 8(2):59-64.
- Wilantari, P. D. 2018. Isolasi Kafein Dengan Metode Sublimasi Dari Dengan Fraksi Etil Asetat Serbuk Daun *Camelia Sinensis*. *Jurnal Farmasi Udayana*, 7(2): 53–62.

- World Helath Organization. 2017. Global Tuberculosis Report.
- World Helath Organization. 2018. Global Tuberculosis Report.
- World Helath Organization. 2022. Global Tuberculosis Report.
- Yadnya Putra, A. A. G. R., Samirana, P. O., dan Andhini, D. A. A. 2020. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Flavonoid Potensial Antioksidan dari Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.). *Jurnal Farmasi Udayana*, 8(2): 85-94.
- Yamin, M., Dewi, F. A., & Faizah, H. (2017). Lama Pengeringan terhadap Aktivitas Antioksidan dan Mutu Teh Herbal Daun Ketepeng Cina (*Cassia alata* L.). *Jom FAPERTA*, 4(2): 1–15.
- Yoon, M. A., Jeong, T. S., Park, D. S., Xu, M. Z., Oh, H. W., Song, K. Bin, Lee, W. S., & Park, H. Y. (2006). Antioxidant effects of quinoline alkaloids and 2,4-di-tert-butylphenol isolated from *Scolopendra subspinipes*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(4), 735–739. <https://doi.org/10.1248/bpb.29.735>
- Young D.C., Wiley J., dan Sons. 2011. Computational Drug Design – A Guide for Computational and Medicinal Chemists; a Book Review. *Journal Pharmaceut Sci*, 14(2): 215-216.
- Yuliantari, N. W. A., Widarta, I. W. R., dan Permana, I. D. G. M. 2017. Pengaruh Suhu dan Waktu Ekstraksi Terhadap Kandungan Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Menggunakan Ultrasonik. *Media Ilmiah Teknologi Pangan*, 4(1): 35–42.
- Yusuf, M., P. Indah, dan A. Wijaya. 2021. Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Lamun (*Enhalus acoroides*) Terhadap Mencit (*Mus musculus*) Jantan yang Diinduksi Karagen. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 7(2): 165-175.
- Zhao, F., Wang, P., Lucardi, R. D., Su, Z., & Li, S. (2020). Natural sources and bioactivities of 2,4-di-tert-butylphenol and its analogs. *Toxins*, 12(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/toxins12010035>

LAMPIRAN

A. LAMPIRAN PERHITUNGAN PENELITIAN

1. Mencari Kadar Air Bobot Basah

Bobot basah = 2039 gram

Bobot kering = 135 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air} &= \frac{\text{Bobot basah} - \text{Bobot kering}}{\text{Bobot basah}} \times 100\% \\ &= \frac{2039 \text{ gram} - 135 \text{ gram}}{2039 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 93,38 \% \text{ basah}\end{aligned}$$

2. Mencari Rendemen Ekstrak Metanol (Depkes RI, 2000)

Bobot ekstrak kental = 0,6 gram dari 1,2 L filtrat

Bobot simplisia awal = 135 gram

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{Bobot ekstrak kental}}{\text{Bobot simplisia awal}} \times 100\% \\ &= \frac{0,6 \text{ gram}}{135 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 0,4 \%\end{aligned}$$

3. Jumlah filtrat

Filtrat hari pertama (12/05/2023) = 780 ml

Filtrat hari kedua (13/05/2023) = 830 ml

Filtrat hari ketiga (14/05/2023) = 810 ml

Jumlah filtrat = 2420 ml atau 2,42 L

4. Mencari LC₅₀

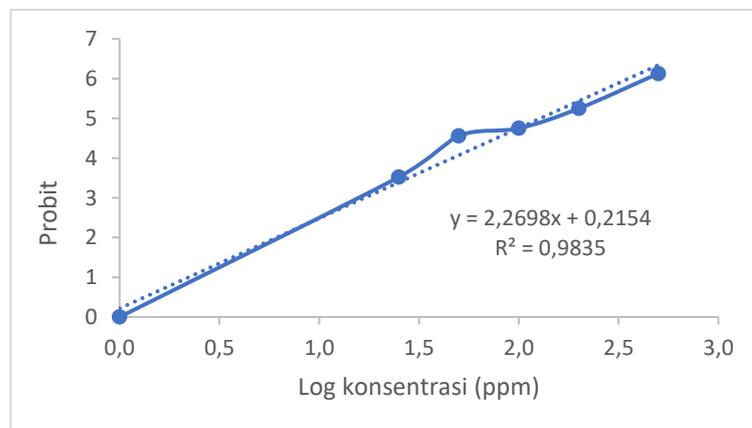
Konsentrasi (ppm)	Log Konsentrasi	Probit	% kematian	Larva mati	Jumlah larva Uji (ekor)
0	0,0	0	0	0	15
5	0,7	0	0	0	15
10	1,0	0	0	0	15
25	1,4	3,52	7	1	15
50	1,7	4,56	33	5	15
100	2,0	4,75	40	6	15
200	2,3	5,25	60	9	15
500	2,7	6,13	87	13	15

Nilai probit didapatkan dari tabel berikut:

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

Lalu dilakukan pemplotan antara nilai probit dengan log konsentrasi untuk mendapatkan persamaan linear, sebagai berikut:



Didapatkan persamaan $y = 2,2698x + 0,2154$, dimana $y = 5$ yang menyatakan nilai probit dari 50% mortalitas, sehingga :

$$x = \frac{y - 0,2154}{2,2698}$$

$$x = \frac{5 - 0,2154}{2,2698}$$

$$x = 2,11$$

$$LC_{50} = \text{antilog} = 10^x = 10^{2,11} = 128,22 \text{ ppm}$$

B. LAMPIRAN DATA PENDUKUNG

Hasil GC-MS *Enhalus acoroides*

FR-20.2-LT-1.0	LABORATORY TEST REPORT	Page 2 of 2
----------------	------------------------	-------------

Certificate No. : LT-10-23-0780 Received Date : 19-06-2023
 Laboratory No. : BM/V/23/1575 Finished Date : 11-07-2023
 Sampel Matrix : Material*
 Sampel Id : Enhalus acoroides

Parameter*	Result	Unit	Method
<i>Profil GC-MS**</i>			
Butane, 2,2-dimethyl-	8.33	%Area	GC-MS
Biisopropyl	18.89	%Area	GC-MS
Isohexane	12.40	%Area	GC-MS
3-Methylpentane	19.07	%Area	GC-MS
Cyclohexane	7.01	%Area	GC-MS
2-Methoxytetrahydrofuran	2.43	%Area	GC-MS
Decane	2.38	%Area	GC-MS
Undecane	2.02	%Area	GC-MS
Benzyl Benzoate	27.46	%Area	GC-MS
TOTAL	100.00	%Area	GC-MS
REMARKS: *) Outside the scope of accreditation **) in extract Methanol Laboratory is not responsible for the sampling process			

July 18, 2023
 Head of Laboratory,

Dr. Mohammad Khotib, M.Si
 NIP. 19781018 200701 1 002

Hasil GC-MS Berdasarkan Jurnal (Amudha, 2018)

Retention time	Name of the compound	Molecular formula	Molecular weight	Peak%
5.04	o-Xylene	C ₁₀ H ₁₀	106	3.16
13.89	Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂ O	206	1.94
17.16	1-Nonadecene	C ₁₉ H ₃₈	266	10.06
17.16	1-Octadecene	C ₁₈ H ₃₆	252	10.06
17.16	1-Hexadecanol	C ₁₆ H ₃₄ O	242	10.06
17.67	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	C ₁₈ H ₃₆ O	268	7.87
18.33	Butylated hydroxytoluene	C ₁₆ H ₂₄ O	220	2.09
18.33	Phenol, 2,6-bis (1,1-dimethylethyl)- 4-methyl-, methyl carbamate	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277	2.09
19.19	1-Heneicosanol	C ₂₁ H ₄₄ O	312	17.15
19.19	1-Docosene	C ₂₂ H ₄₄	308	17.15
20.20	Heptadecane, 9-hexyl-	C ₂₂ H ₄₈	324	1.57
20.20	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	C ₂₄ H ₅₄	366	1.57
21.05	n-Tetracosanol-1	C ₂₄ H ₅₀ O	354	11.48
21.05	Behenyl alcohol	C ₂₂ H ₄₆ O	326	11.48
24.35	17-Pentatriacontene	C ₃₅ H ₇₀	490	4.84
24.35	Cyclopentane, (4-octylododecyl)-	C ₂₅ H ₅₀	350	4.84
25.13	Heptadecane, 9-hexyl-	C ₂₂ H ₄₈	324	1.57
25 0.13	Pentadecane, 2-methyl-	C ₁₆ H ₃₄	226	1.57
25.85	Tetratetracontane	C ₂₄ H ₅₀	618	4.17
25.85	Heptacosane	C ₂₇ H ₅₆	380	4.17
26.56	Pentacosane	C ₂₅ H ₅₂	352	3.24
27.24	Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	296	4.25
28.01	Octadecane, 3-ethyl-5-(2-ethylbutyl)-	C ₂₄ H ₅₄	366	3.97
30.16	á-Sitosterol	C ₂₈ H ₅₀ O	414	1.85
33.18	Haloxazolam	C ₁₇ H ₁₄ BrFN ₂ O ₂	376	2.70
33.18	Lanosterol	C ₃₀ H ₅₀ O	426	2.70
33.78	Pregn-16-en-20-one, 3-hydroxy-, (3á,5á)-	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	436	6.34
33.78	Nitralin	C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₆ S	345	6.34
33.78	Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis-	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₂	316	6.34

E. acoroides: *Enhalus acoroides*, GC-MS: Gas chromatography-mass spectroscopy

Tabel Nilai Sifat Fisikokimia Senyawa dari *Bioavailability Radar*

Sifat	Parameter	<i>Phenol</i>	<i>Butylated</i>	<i>Lanosterol</i>	<i>Benzamide</i>
LIPO	$-0,7 < XLOGP < +5$	5,19	5,10	8,91	3,72
SIZE	150 <MW<500 g/mol	206,32 g/mol	220,35 g/mol	426,72 g/mol	316,35 g/mol
POLAR	$20 \text{ \AA}^2 < \text{TPSA} < 130 \text{ \AA}^2$	20,23 \AA^2	20,23 \AA^2	20,23 \AA^2	58,20 \AA^2
INSOLU	$-6 < \text{Log S (ESOL)} < 0$	-4,55	-4,56	-7,83	-4,30
INSATU	$0,25 < \text{Fraction Csp3} < 1$	0,57	0,60	0,87	0
FLEX	<i>rotatable bond</i> ≤ 10	2	2	4	6

Tabel Sifat *Drug-likeness* Senyawa

Senyawa	<i>Drug-likeness</i>			
	Lipinski*	Ghose**	Veber***	<i>Bioavailability Score****</i>
<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	Yes	Yes	Yes	0,55
<i>Butylated hydroxytoluene</i>	Yes	Yes	Yes	0,55
<i>Lanosterol</i>	Yes; 1 violation: MLOGP>4,15	No: 3 violations: WLOGP>5.6, MR>130, atoms>70	Yes	0,55
<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	Yes	Yes	Yes	0,55

Keterangan:

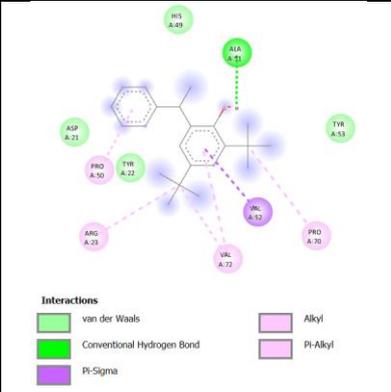
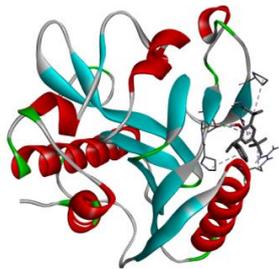
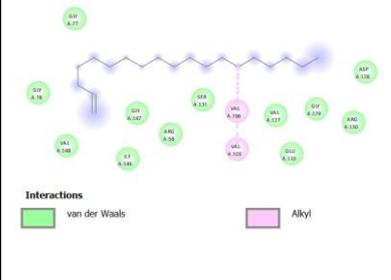
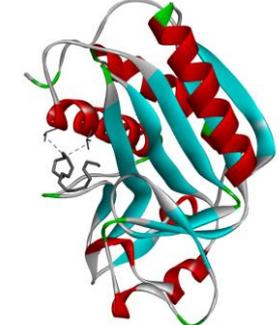
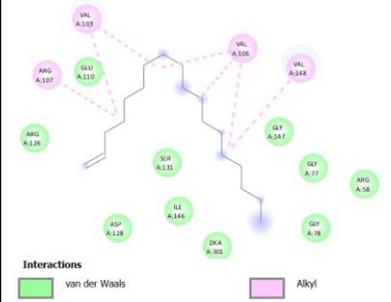
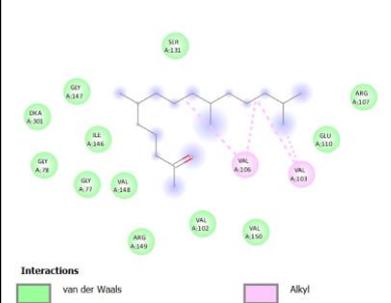
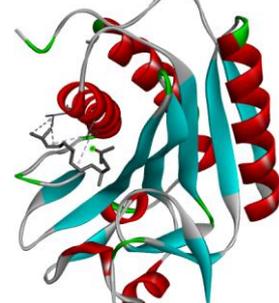
*aturan Lipinski; $MW \leq 500$; $MLOGP \leq 4,15$; N or $O \leq 10$; NH or $OH \leq 5$

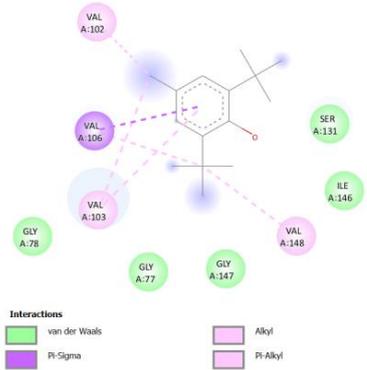
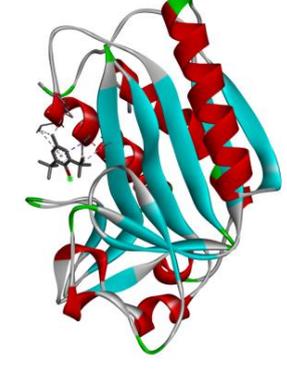
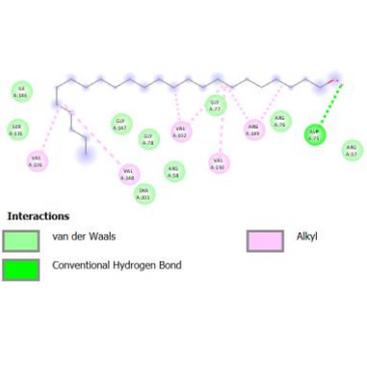
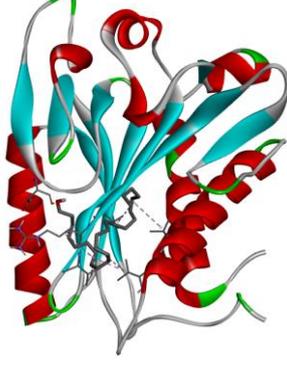
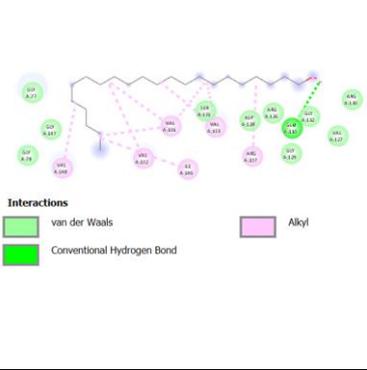
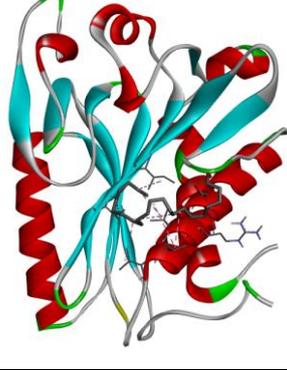
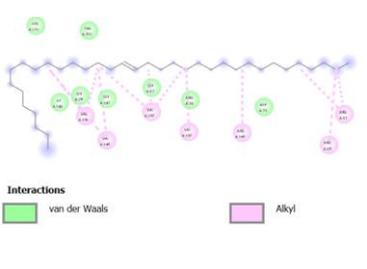
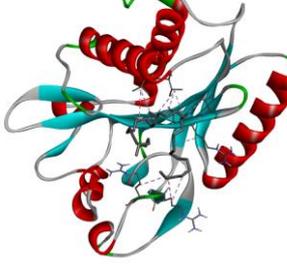
**aturan Ghose; $160 \leq MW \leq 480$; $-0,4 \leq WLOGP \leq 5,6$; $40 \leq MR \leq 130$; $20 \leq atoms \leq 70$

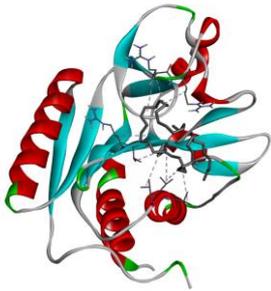
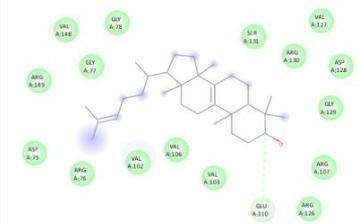
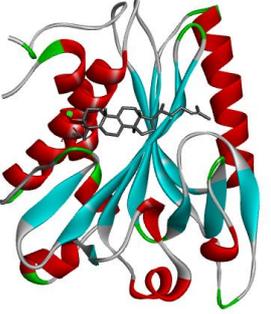
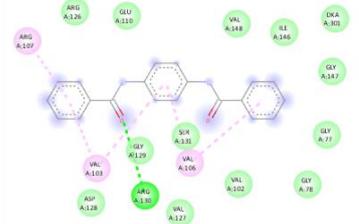
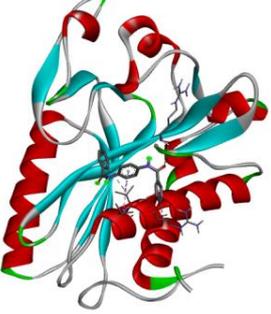
***aturan Veber; Rotatable bonds ≤ 10 ; $TPSA \leq 140$

****Probability of $F > 10\%$ in rat

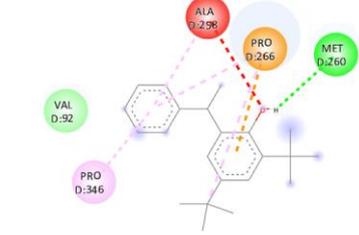
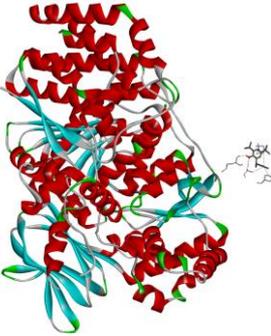
Tabel Visualisasi 2D dan 3D Interaksi Ligan dengan Reseptor 1W66

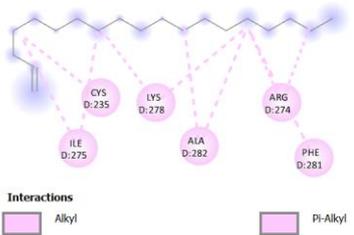
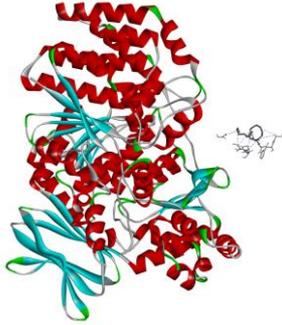
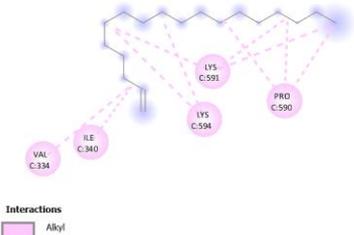
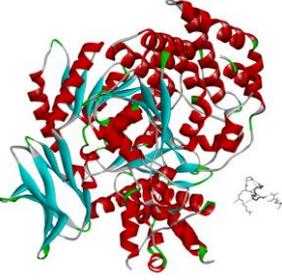
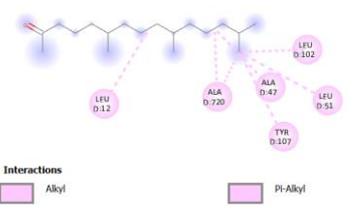
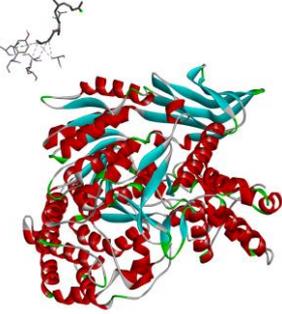
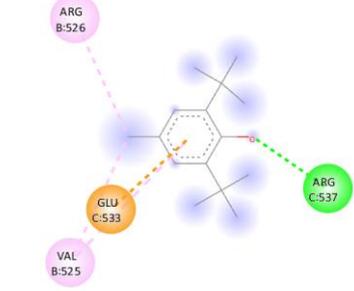
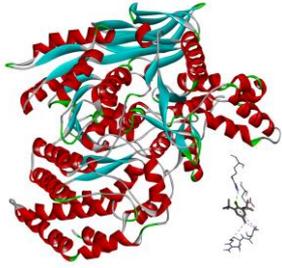
No	Ligan	Binding Visualization	
		2D Image	3D Image
1.	<i>Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-</i>		
2.	<i>1-Nonadecene</i>		
3.	<i>1-Octadecene</i>		
4.	<i>2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-</i>		

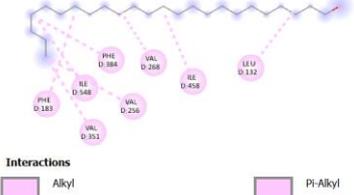
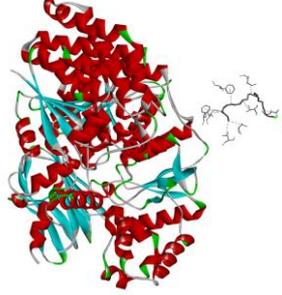
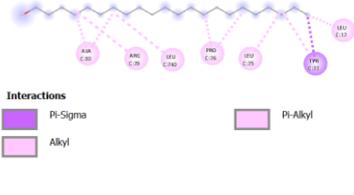
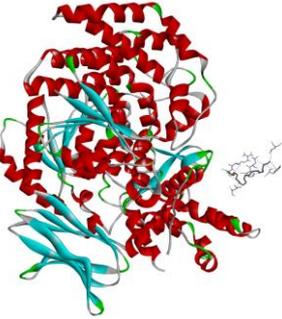
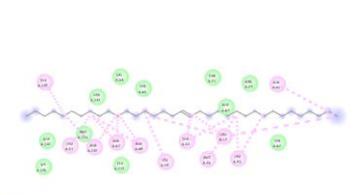
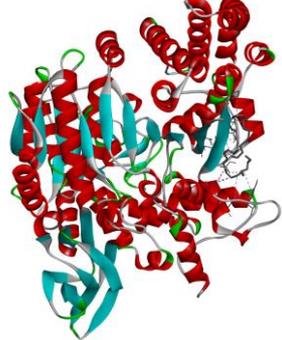
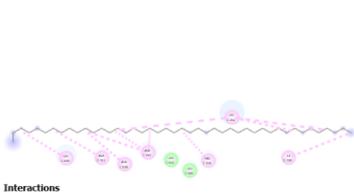
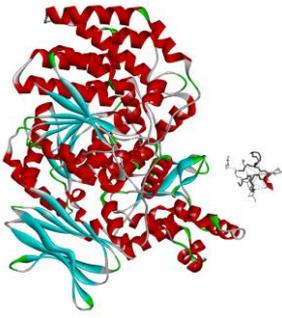
5.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	
6.	<i>n-Tetracosanol-1</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Alkyl 	
7.	<i>Behenyl alcohol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Alkyl 	
8.	<i>17-Pentatriacontene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	

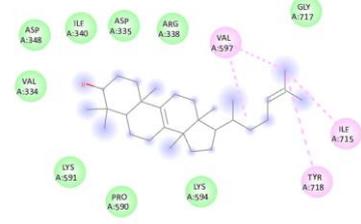
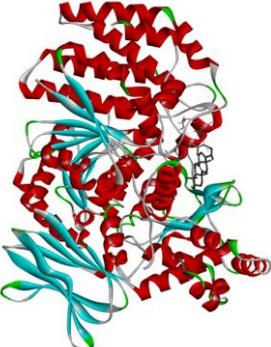
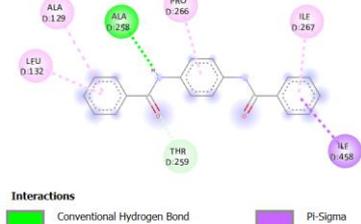
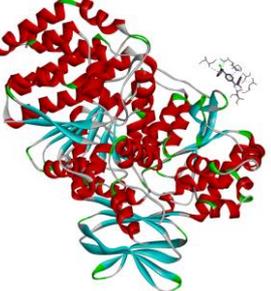
9.	<i>Tetratetracontane</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	
10.	<i>Lanosterol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Carbon Hydrogen Bond 	
11.	<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Pi-Alkyl 	

Tabel Visualisasi 2D dan 3D Interaksi Ligan dengan Reseptor 5KVU

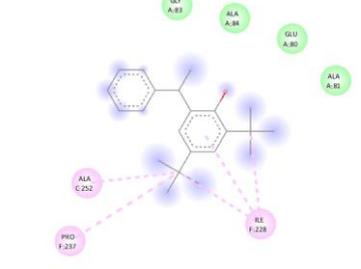
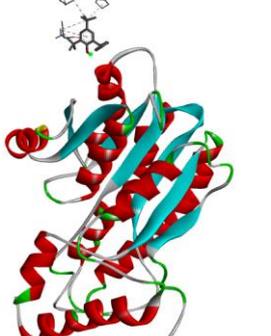
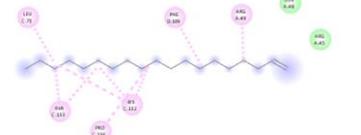
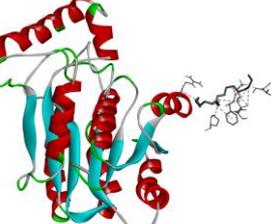
No	Ligan	<i>Binding Visualization</i>	
		<i>2D Image</i>	<i>3D Image</i>
1.	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Unfavorable Acceptor-Acceptor Pi-Cation Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	

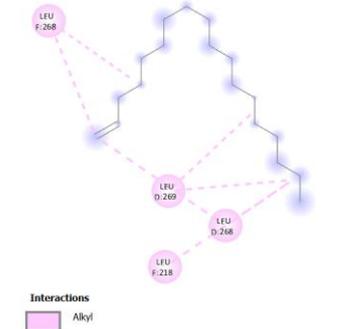
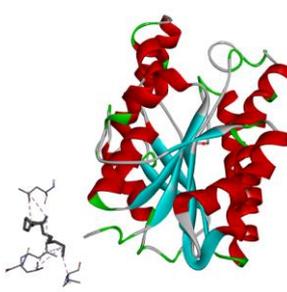
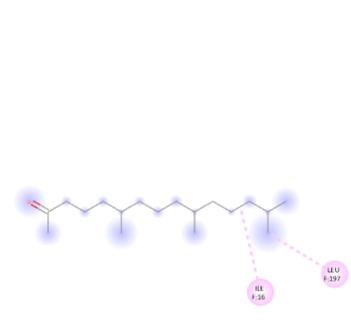
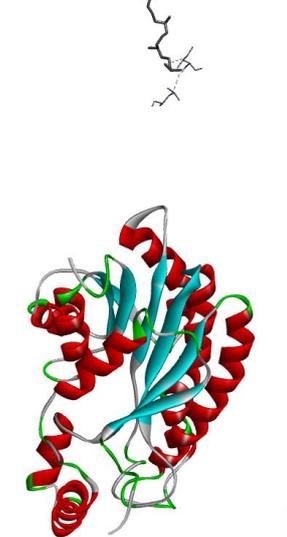
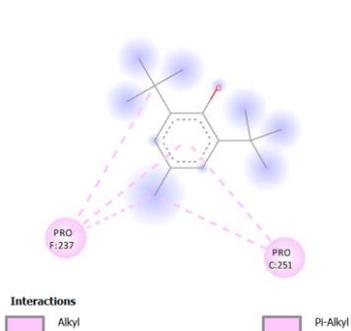
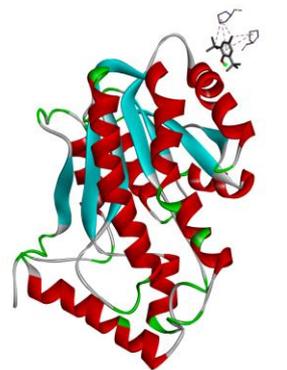
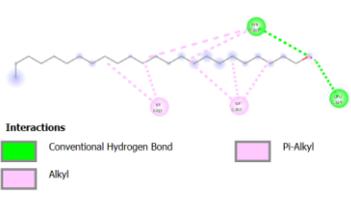
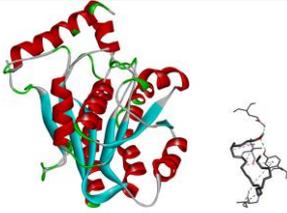
2.	<i>1-Nonadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl Pi-Alkyl 	
3.	<i>1-Octadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl 	
4.	<i>2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl Pi-Alkyl 	
5.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Pi-Anion Alkyl Pi-Alkyl 	

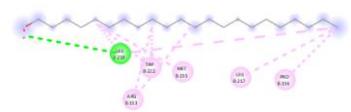
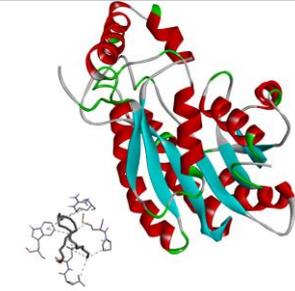
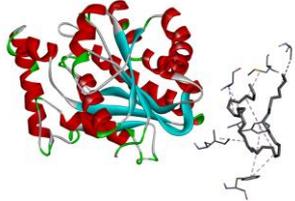
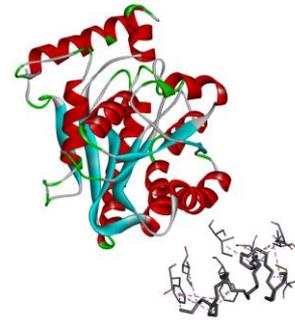
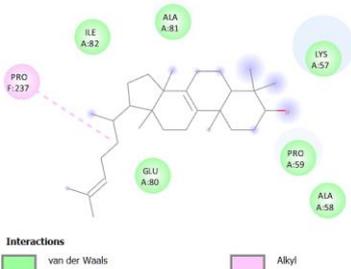
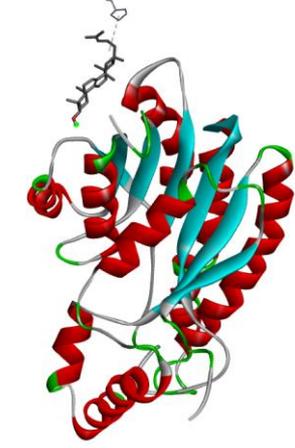
6.	<i>n-Tetracosanol-1</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl Pi-Alkyl 	
7.	<i>Behenyl alcohol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	
8.	<i>17-Pentatriacontene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
9.	<i>Tetratetracontane</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	

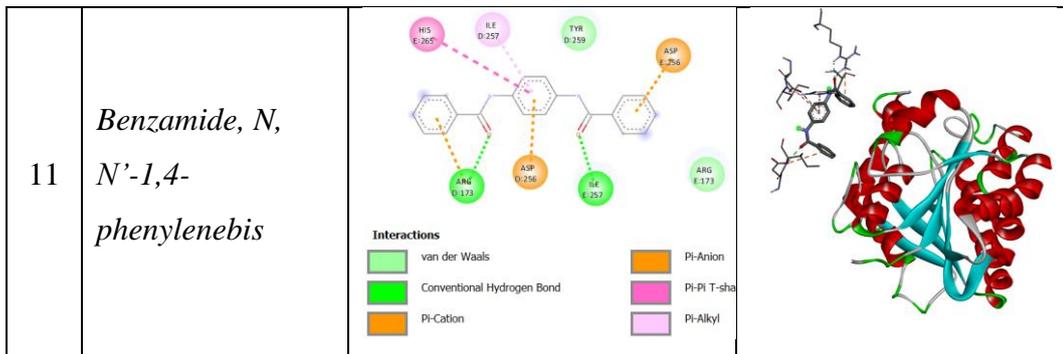
10.	<i>Lanosterol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
11.	<i>Benzamide, N, N'-1,4-phenylenebis</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Carbon Hydrogen Bond Pi-Sigma Pi-Alkyl 	

Tabel Visualisasi 2D dan 3D Interaksi Ligan dengan Reseptor 1BVR

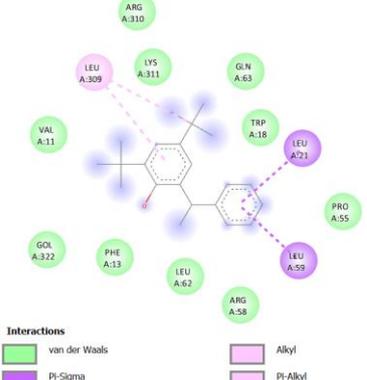
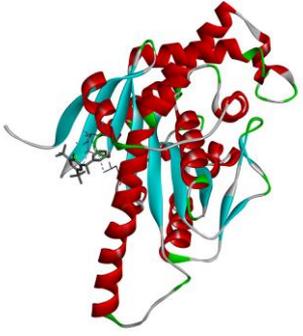
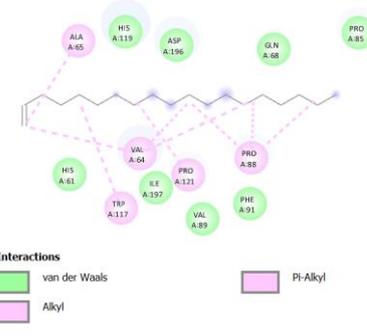
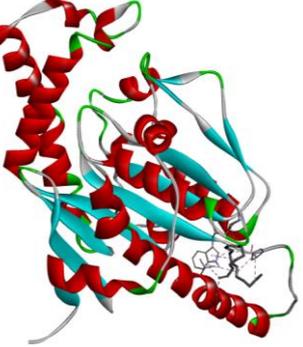
No	Ligan	<i>Binding Visualization</i>	
		<i>2D Image</i>	<i>3D Image</i>
1.	<i>Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
2.	<i>1-Nonadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	

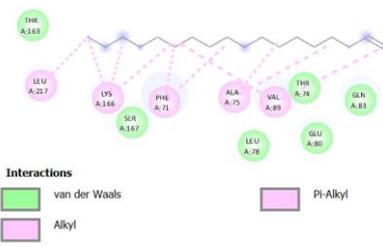
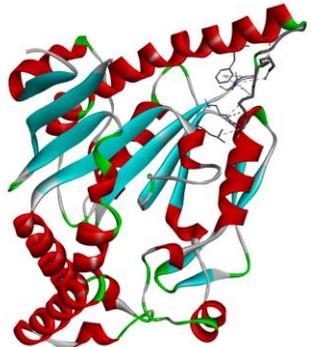
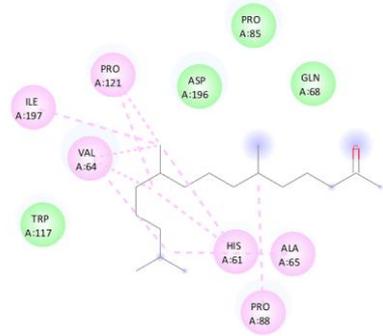
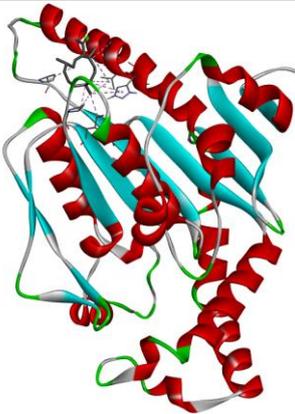
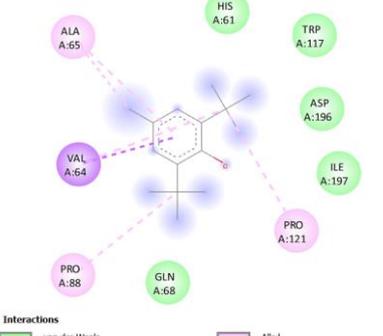
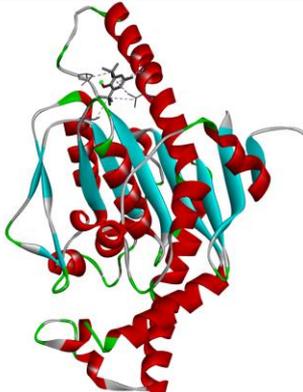
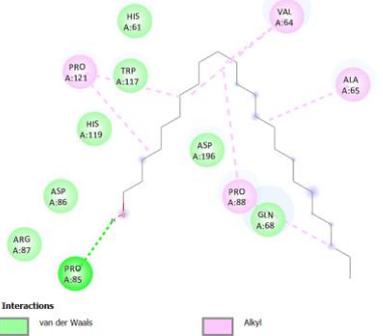
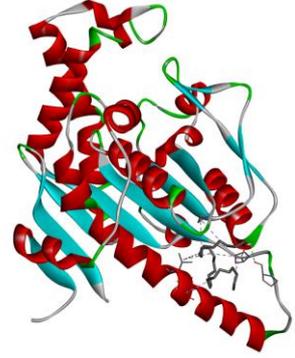
3.	<i>1-Octadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl 	
4.	<i>2-Pentadecanone, 6, 10, 14-trimethyl-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl 	
5.	<i>Butylated hydroxytoluene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl Pi-Alkyl 	
6.	<i>n-Tetracosanol-1</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Alkyl Pi-Alkyl 	

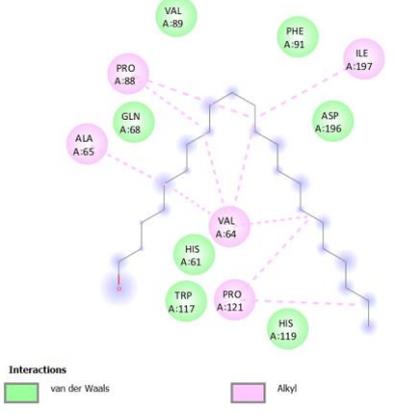
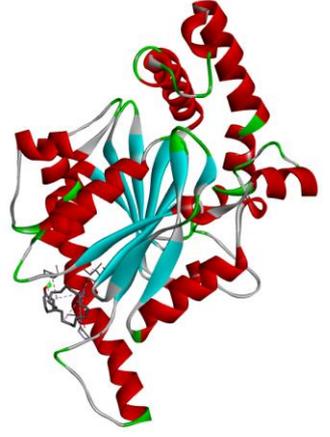
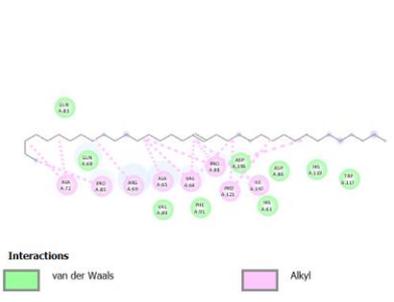
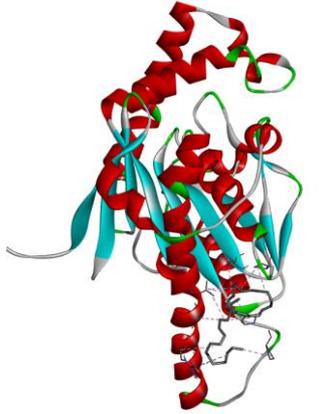
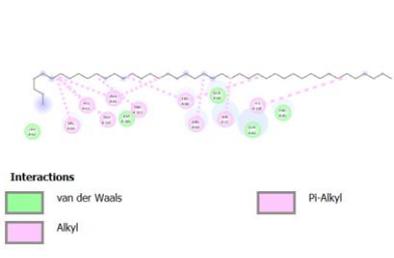
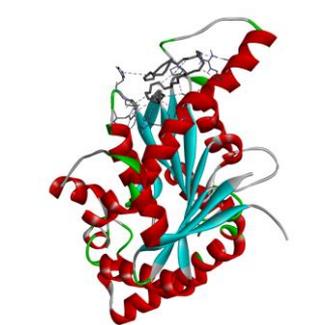
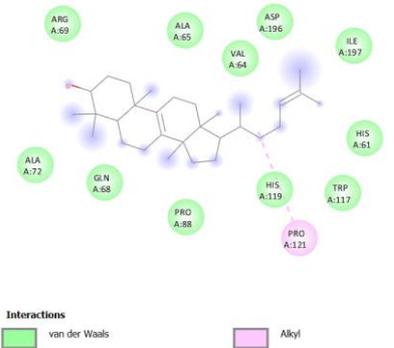
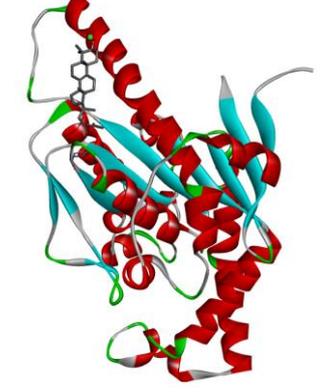
7.	<i>Behenyl alcohol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Conventional Hydrogen Bond Alkyl Pi-Alkyl 	
8.	<i>17-Pentatriacontene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> Alkyl Pi-Alkyl 	
9.	<i>Tetratetracontane</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
10	<i>Lanosterol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	



Tabel Visualisasi 2D dan 3D Interaksi Ligan dengan Reseptor 3AF3

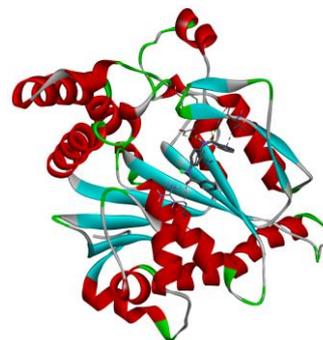
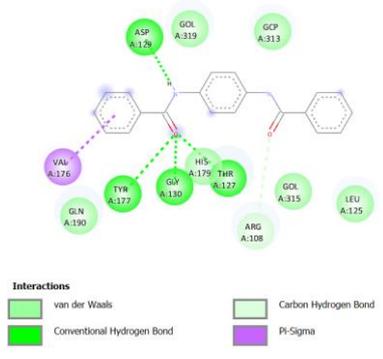
No	Ligan	Binding Visualization	
		2D Image	3D Image
1.	<i>Phenol, 2,4-bis (1,1-dimethylethyl)-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	
2.	<i>1-Nonadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	

3.	<i>1-Octadecene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
4.	2- <i>Pentadecanone,</i> 6, 10, 14- <i>trimethyl-</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
5.	<i>Butylated</i> <i>hydroxytoluene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Pi-Sigma Alkyl Pi-Alkyl 	
6.	<i>n-Tetracosanol-1</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Conventional Hydrogen Bond Alkyl Pi-Alkyl 	

7.	<i>Behenyl alcohol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	
8.	<i>17-Pentatriacontene</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	
9.	<i>Tetratetracontane</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl Pi-Alkyl 	
10	<i>Lanosterol</i>	 <p>Interactions</p> <ul style="list-style-type: none"> van der Waals Alkyl 	

11

Benzamide, N,
N'-1,4-
phenylenebis



C. LAMPIRAN DOKUMENTASI PENELITIAN



Sampel basah *Enhalus acoroides*



Pengeringan *Enhalus acoroides*



Sampel kering *Enhalus acoroides*



Penghalusan *Enhalus acoroides*



Pengayakan *Enhalus acoroides*



Simplisia *Enhalus acoroides*



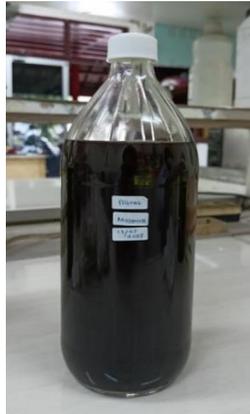
Pemurnian pelarut metanol



Ekstraksi maserasi



Filtrat hari ke-1



Filtrat hari ke-2



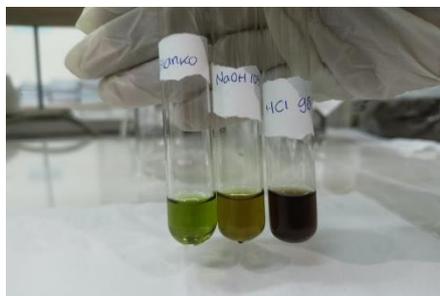
Filtrat hari ke-3



Rotary evaporator



Ekstrak *Enhalus acoroides*



Uji fitokimia (flavonoid)



Uji spektrofotometri UV-Vis



Udang *Artemia Salina L*



Uji BSLT