

IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER, UJI *IN SILICO*, dan UJI *IN VITRO* EKSTRAK ETANOL PAKU KAWAT (*Lycopodiella cernua*)

TUGAS AKHIR



JOHANES CHRISTO WINATA

NIM. 612110027

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MA CHUNG
MALANG
2025**

LEMBAR PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER, UJI *IN SILICO*, dan UJI *IN VITRO* EKSTRAK *ETHANOL* PAKU KAWAT (*Lycopodiella cernua*)

Oleh:

JOHANES CHRISTO WINATA
NIM. 612110027

dari:

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KESEHATAN
UNIVERSITAS MA CHUNG

Telah dinyatakan lulus dalam melaksanakan Tugas Akhir sebagai syarat kelulusan
dan berhak mendapatkan gelas Sarjana Farmasi (S. Farm)

Dosen Pembimbing I,



Dr. apt. Rollando, S.Farm., M.Sc.
NIP. 20160002

Dosen Pembimbing II,



Apt. Devilke Yandriyani, S.Farm., M.Farm.
NIP. 20240011

Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan,



PERNYATAAN KEASLIAN TUGAS AKHIR

Dengan ini saya menyatakan bahwa isi keseluruhan Tugas Akhir saya dengan judul yaitu “IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER, UJI *IN SILICO*, dan UJI *IN VITRO* EKSTRAK ETANOL PAKU KAWAT (*Lycopodiella cernua*)” adalah benar-benar hasil karya intelektual mandiri dan diselesaikan tanpa menggunakan bahan-bahan yang tidak diizinkan dan bukan merupakan karya pihak lain yang saya akui sebagai karya sendiri.

Semua referensi yang dikutip maupun dirujuk telah ditulis dengan lengkap pada daftar pustaka. Apabila ternyata pertanyaan ini tidak benar, saya bersedia menerima sanksi sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 1 Agustus 2025



Johanes Christo Winata

NIM. 612110027

IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER, UJI *In Silico*, dan UJI *In vitro* EKSTRAK ETANOL PAKU KAWAT (*Lycopodiella cernua*)

Johanes Christo Winata¹, Rollando², Devilke Yandriyani³

Abstrak

Lycopodiella cernua atau paku kawat merupakan tanaman obat yang diketahui mengandung berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, dan terpenoid, yang berpotensi sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa bioaktif dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* menggunakan LC-HRMS, mengevaluasi potensi senyawa tersebut secara *In Silico* terhadap target protein COX-2 melalui metode *molecular docking*, serta menguji aktivitas antioksidan ekstrak secara *in vitro* dengan metode DPPH. Hasil identifikasi LC-HRMS menunjukkan keberadaan senyawa sebanyak 593 seperti 15-HETE-G, (-)-isopiperitenone, dan limonene-1,2-diol. Uji *In Silico* menunjukkan bahwa beberapa senyawa memiliki afinitas ikatan yang baik terhadap COX-2, dengan kontrol positif *Celecoxib*. Sementara itu, uji *in vitro* menunjukkan aktivitas antioksidan yang signifikan dengan nilai IC₅₀ sebesar 33,28 ppm pada replikasi pertama, 35,52 ppm pada replikasi kedua, dan 34,86 ppm, mengindikasikan aktivitas sangat tinggi. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* berpotensi sebagai sumber bahan alam untuk pengembangan fitofarmaka antiinflamasi dan antioksidan.

Kata kunci: *Lycopodiella cernua*, metabolit sekunder, LC-HRMS, molecular docking, DPPH, antiinflamasi, antioksidan.

Secondary Metabolite Identification, In Silico and In Vitro Evaluation of Ethanol Extract of Paku Kawat (*Lycopodiella cernua*)

Johanes Christo Winata¹, Rollando², Devilke Yandriyani³

Abstract

Lycopodiella cernua, commonly known as paku kawat, is a medicinal plant known to contain various secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, and terpenoids, which have potential as anti-inflammatory and antioxidant agents. This study aimed to identify bioactive compounds in the ethanol extract of *Lycopodiella cernua* using LC-HRMS, evaluate their pharmacological potential *In Silico* against the COX-2 target protein via molecular docking, and assess antioxidant activity *in vitro* using the DPPH method. LC-HRMS analysis revealed the presence of 593 compounds, including 15-HETE-G, (-)-isopiperitenone, and limonene-1,2-diol. The *In Silico* assay showed that several compounds exhibited strong binding affinities to COX-2, with Celecoxib used as the positive control. Meanwhile, the *in vitro* antioxidant test showed significant activity, with IC_{50} values of 33.28 ppm in the first replicate, 35.52 ppm in the second, and 34.86 ppm in the third, indicating very high antioxidant activity. These findings suggest that the ethanol extract of *Lycopodiella cernua* has strong potential as a natural source for the development of anti-inflammatory and antioxidant phytopharmaceuticals.

Keywords: *Lycopodiella cernua*, secondary metabolites, LC-HRMS, molecular docking, DPPH, anti-inflammatory, antioxidant.

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, karunia, dan kasih-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul " IDENTIFIKASI METABOLIT SEKUNDER, UJI *IN SILICO*, dan UJI *IN VITRO* EKSTRAK ETANOL PAKU KAWAT (*Lycopodiella cernua*)" ini sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana farmasi di Universitas Ma Chung dengan baik dan lancar. Tidak lupa, penulis mengucapkan terima kasih kepada setiap bantuan yang diberikan dari berbagai pihak, yaitu kepada:

1. apt. Rollando, S.Farm., M.Farm., selaku Dekan Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Ma Chung dan dosen pembimbing I yang telah membimbing dengan sabar dan memberikan ilmu yang menginspirasi.
2. apt. Devilke Yandriyani, S.Farm., M.Farm. selaku dosen pembimbing II yang telah membimbing dengan sabar dan memberikan ilmu yang menginspirasi.
3. Windra Swastika, Ph.D selaku dosen penguji I yang telah bersedia memberikan masukan dan saran untuk penulisan tugas akhir ini.
4. Segenap dosen pengajar, laboran, dan staf Universitas Ma Chung yang telah memberikan ilmu yang bermanfaat.
5. Orang tua dan saudara penulis yang selalu memberi semangat serta mendoakan penulis dan bantuan finansial yang tiada henti.
6. Sahabat seperjuangan farmasi yang selalu memberikan semangat.
7. Sahabat dekat dan orang tersayang penulis Jesica Jacqueline, Melanya, farrys Nugroho, leon, Ezra Dwi ,Arisal Pulupina, Bintang Putri dan AKP (Anak Kos Paijo) yang selalu memotivasi, mensupport dan mendoakan selalu penulis.

Penulis berharap karya TA memberikan manfaat bagi pembaca walaupun masih banyak kekurangan. Penulis juga berharap pembaca dapat memberikan saran yang dapat membangun penulis agar kedepannya penulis dapat menjadi lebih baik.

Malang, 1 Agustus 2025

Johanes Christo Winata

Daftar Isi

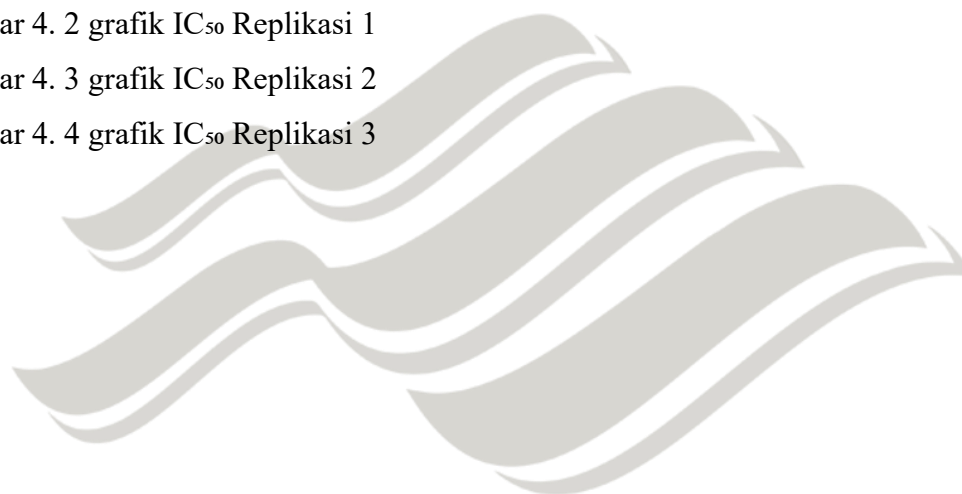
Daftar Isi	i
Daftar Gambar	iv
Daftar Tabel	v
Bab I Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2 Identifikasi Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Rumusan Masalah	3
1.5 Tujuan Penelitian	3
1.6 Luaran Penelitian	4
1.7 Manfaat Penelitian	4
1.7.1 Manfaat Bagi Peneliti	4
1.7.2 Manfaat Bagi Masyarakat	4
1.7.3 Manfaat Bagi Universitas	4
1.8 Sistematika Penulisan	5
Bab II Tinjauan Pustaka	6
2.1 <i>State of the art</i> penelitian	6
2.2 <i>Lycopodiella cernua</i>	10
2.2.1 Klasifikasi	11
2.3 Ekstraksi	11
2.4 Pelarut	12
2.5 Etanol	12
2.6 Antiinflamasi	13
2.7 <i>COX-2</i>	14
2.8 Identifikasi Metabolit Sekunder dan <i>LC-HRMS</i>	14
2.9 Uji <i>In Silico</i>	16
2.10 Antioksidan dan Uji Antioksidan metode DPPH	16
2.11 Aplikasi uji <i>In Silico</i>	18
2.11.1 Bank Data Protein atau Protein Data Bank	18

2.11.2	PyRx	18
2.11.3	PyMOL	19
2.11.4	Discovery Studio	19
2.12	Spectrofotometer UV-VIS	19
2.13	Celecoxib	20
2.14	15-HETE-G	21
2.15	(-)-Isopiperitenone	22
2.16	Limonene-1,2-diol	22
2.17	Kerangka Konsep Penelitian	23
Bab III	Metode Penelitian	24
3.1	Rancangan Penelitian	24
3.2	Populasi dan Sampel	24
3.2.1	Populasi	24
3.2.2	Sampel	24
3.3	Variabel Penelitian	24
3.3.1	Variabel Bebas	24
3.3.2	Variabel Terikat	25
3.3.3	Variabel Kontrol	25
3.4	Alat dan Bahan	25
3.4.1	Alat	25
3.4.2	Bahan	25
3.5	Waktu Pengerjaan	25
3.6	Prosedur Kerja	25
3.6.1	Determinasi Tumbuhan	25
3.6.2	Persiapan Sampel	26
3.6.3	Proses Ekstraksi	26
3.6.4	Identifikasi Metabolit Sekunder dengan Uji LC-HRMS	27
3.6.5	Uji <i>In Silico</i> Dengan Simulasi Molecular Docking	28
3.6.5	Uji Antioksidan Menggunakan Metode DPPH	31
3.7	Bagan Alur Kerja	32
Bab IV	Hasil dan Pembahasan	33

4.1	Hasil Determinasi	33
4.2	Hasil Ekstraksi	33
4.3	Hasil uji <i>LC-HRMS</i>	35
4.4	Hasil uji WAY2DRUG/Pass Online	38
4.5	Hasil uji ADMET	42
4.6	Hasil <i>Molukelar Doking</i>	53
4.7	Hasil uji Antioksidan dengan metode DPPH	61
Bab V	Kesimpulan dan Saran	67
5.1	Kesimpulan	67
5.2	Saran	67
	Daftar Pustaka	68
	Lampiran	77
	Lampiran A. Hasil Determinasi	77
	Lampiran B. Perhitungan % Rendemen	78
	Lampiran C. Perhitungan larutan DPPH 40 ppm (kontrol negatif)	79
	Lampiran D. Perhitungan asam galat 10 ppm (kontrol positif)	80
	Lampiran E. Perhitungan pembuatan larutan sampel <i>Lycopodiella cernua</i> metode DPPH	81
	Lampiran F. Panjang gelombang maksimum DPPH	83
	Lampiran G. perhitungan IC_{50} dan SD	84
	Lampiran H. Hasil Ekstraksi	86
	Lampiran I. Uji DPPH	88
	Lampiran J. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking <i>Celecoxib</i>	90
	Lampiran K. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking <i>15-HETE-G</i>	92
	Lampiran L. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking <i>(-)-Isopiperitenone</i>	94
	Lampiran M. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking <i>Limonene-1,2-diol</i>	96
	Lampiran N. hasil analisis <i>LC-HRMS</i>	98

Daftar Gambar

Gambar 2. 1 Tanaman <i>Lycopodiella cernua</i> (Rachmi Afriani, 2020).	10
Gambar 2. 2 Struktur Molekul <i>Ethanol</i>	12
Gambar 2. 3 LC-HRMS	15
Gambar 2. 4 Spectrofotometer Uv-Vis	19
Gambar 2. 5 Kerangka Konsep Penelitian	23
Gambar 4. 1 Kromatogram analisis LC-HRMS	37
Gambar 4. 2 grafik IC ₅₀ Replikasi 1	63
Gambar 4. 3 grafik IC ₅₀ Replikasi 2	64
Gambar 4. 4 grafik IC ₅₀ Replikasi 3	64



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Daftar Tabel

Tabel 2. 1 State of the art	6
Tabel 4. 1 nilai $P_a > 0,7$ sebagai antiinflammatory dan SMILES(<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>)	40
Tabel 4. 2 Tabel Hasil Uji Lipinski	43
Tabel 4. 3 Hasil uji pkCSM	46
Tabel 4. 4 Hasil Molecular Doking 5KIR	56
Tabel 4. 5 Residu Asam Amino Hasil Uji Doking	57
Tabel 4. 6 Tabel IC_{50}	65
Tabel G. 1 (% Inhibisi) replikasi 1	84
Tabel G. 2 (% Inhibisi) replikasi 2	84
Tabel G. 3 (% Inhibisi) replikasi 3	84
Tabel G. 4 perhitungan SD	85
Tabel H. 1 Proses Ekstraksi	86
Tabel I. 1 Proses Uji DPPH	88

UNIVERSITAS
MA CHUNG

Bab I

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Tanaman obat telah digunakan sejak lama dalam praktik pengobatan tradisional dan menjadi sumber penting dalam penemuan senyawa bioaktif baru. Salah satu tanaman yang berpotensi secara farmakologis adalah paku kawat (*Lycopodiella cernua*) dari famili *Lycopodiaceae*. Tanaman ini diketahui mengandung berbagai jenis metabolit sekunder, seperti *alkaloid*, *flavonoid*, dan *terpenoid*, yang memiliki peran dalam sejumlah aktivitas farmakologis, termasuk sifat antiinflamasi, antioksidan, dan efek neuroprotektif (Zhao, 2018) (Amudha, 2022).

Teknik yang umum digunakan untuk mengidentifikasi metabolit sekunder meliputi Kromatografi Lapis Tipis (KLT), Kromatografi Gas-Spektrometri Massa (GC-MS), dan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT) (Hung, 2015). Selain identifikasi metabolit sekunder, penelitian ini juga menggunakan pendekatan *In Silico* sebagai evaluasi potensi farmakologi senyawa yang telah teridentifikasi. Uji *In Silico* dilakukan dengan metode *molecular docking*, yang memungkinkan pemodelan interaksi antara senyawa aktif dengan target protein tertentu untuk memprediksi mekanisme aksi serta efektivitasnya (Amudha, 2022). Validasi lebih lanjut, penelitian ini juga melakukan uji *In Vitro* untuk mengevaluasi aktivitas biologis sebagai antioksidan dari ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*. Uji *In Vitro* yang umum dilakukan antara lain uji antioksidan menggunakan metode DPPH untuk mengukur kemampuan ekstrak dalam menangkap radikal bebas (Hung, 2015).

Pada paku kawat atau *Lycopodiella cernua* telah dilakukan identifikasi senyawa metabolit sekunder dengan melakukan uji metabolit sekunder menggunakan KLT dan didapatkan hasil senyawa berupa terpenoid dan saponin (Porquis, 2018). Selain itu, uji *in silico* sebelumnya yang dilakukan Liu (2023) berfokus pada uji antidiabetik saja. Namun, untuk aktifitas sebagai antiinflamasi belum diteliti lebih lanjut. Penelitian terdahulu sudah melakukan uji antioksidan dengan uji DPPH menggunakan tanaman *Lycopodiella cernua* yang berada di negara filipina (Porquis, 2018). Penelitian kali ini berfokus uji DPPH tanaman *Lycopodiella cernua* yang ada di indonesia, karena belum

ada yang menganalisis *Lycopodiella cernua* yang tumbuh di negara Indonesia. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Vanlalpeka (2024) ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut cloroform dan metanol dimana hasil yang didapatkan menunjukkan ekstrak menggunakan cloroform lebih baik menangkap senyawa yang ada di dalam ekstrak dibandingkan dengan metanol.

Dengan demikian, penelitian ini bertujuan untuk melihat ekstraksi menggunakan pelarut etanol dapat menyerap lebih banyak senyawa yang terkandung dalam tanaman *Lycopodiella cernua*, mengidentifikasi metabolit sekunder dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* menggunakan LC-HRMS, mengevaluasi potensi farmakologisnya melalui uji *In Silico* sebagai antiinflamasi, serta mengonfirmasi aktivitasnya melalui uji *In Vitro* dengan uji DPPH sebagai antioksidan. Hasil penelitian yang dilakukan diharapkan dapat memberikan informasi yang berguna untuk pengembangan fitofarmaka berbasis bahan alami.

1.2 Identifikasi Masalah

Penelitian mengenai *Lycopodiella cernua* masih terbatas, terutama dalam aspek identifikasi metabolit sekunder yang terkandung di dalamnya. Meskipun tanaman ini telah digunakan dalam pengobatan tradisional, studi ilmiah yang meneliti kandungan bioaktifnya masih jarang ditemukan. Selain itu, pendekatan komputasional *In Silico* yang dapat mempercepat proses identifikasi dan prediksi aktivitas biologis senyawa dalam tanaman ini belum banyak dilakukan. Hal ini menyebabkan kurangnya data mengenai potensi farmakologis dari *Lycopodiella cernua* sebagai kandidat obat alami. Lebih lanjut, penelitian *In Vitro* yang mengonfirmasi aktivitas biologis dari ekstrak etanol tanaman ini masih sangat terbatas, sehingga diperlukan validasi eksperimental untuk mendukung temuan dari uji komputasional. Oleh karena itu, diperlukan penelitian yang komprehensif yang mengintegrasikan analisis metabolit sekunder, uji *In Silico*, dan uji *In Vitro* untuk menentukan potensi farmasi dari tanaman ini.

1.3 Batasan Masalah

Supaya penelitian lebih terfokus dan sistematis, penelitian ini dibatasi pada beberapa aspek berikut:

1. Pada penelitian ini digunakan sampel *Lycopodiella cernua* yang diambil dari Desa Hilir Kantor, Kec. Ngabang, Kab. Landak, Provinsi Kalimantan Barat.
2. Metode ekstraksi yang digunakan merupakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol.
3. Penelitian ini hanya meneliti metabolit sekunder yang terkandung di dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* menggunakan metode LC-HRMS.
4. Uji *In Silico* yang dilakukan terbatas pada *molecular docking* untuk memprediksi interaksi senyawa aktif dengan target protein tertentu.
5. Uji *In Vitro* yang dilakukan hanya mencakup uji antioksidan menggunakan metode DPPH.
6. Penelitian ini tidak mencakup uji *in-vivo* atau pengembangan formulasi obat dari ekstrak *Lycopodiella cernua*.

1.4 Rumusan Masalah

1. Apa saja metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*?
2. Bagaimana potensi senyawa hasil identifikasi sebagai agen antiinflamasi berdasarkan uji *In Silico*?
3. Bagaimana aktivitas biologis ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* sebagai antioksidan berdasarkan uji *In Vitro*?

1.5 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa tujuan utama, yaitu:

1. Mengidentifikasi metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*.
2. Melakukan uji *In Silico* terhadap senyawa hasil identifikasi untuk mengevaluasi potensinya sebagai antiinflamasi.

3. Mengevaluasi aktivitas biologis ekstrak etanol *Lycopodiella cernua* sebagai antioksidan melalui uji *In Vitro*.

1.6 Luaran Penelitian

Luaran yang diharapkan dari penelitian ini meliputi:

1. Publikasi dalam jurnal ilmiah nasional atau internasional yang terindeks.
2. Data kandungan metabolit *Lycopodiella cernua*, uji *In Silico*, dan *In Vitro* mendukung pengembangannya sebagai obat herbal.

1.7 Manfaat Penelitian

Pada penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut:

1.7.1 Manfaat Bagi Peneliti

1. Menambah wawasan mengenai metabolit sekunder dalam *Lycopodiella cernua* melalui analisis *LC-HRMS*.
2. Menjadi dasar bagi penelitian lanjutan dalam bidang farmasi, bioteknologi, dan fitokimia.
3. Mengasah keterampilan dalam metode penelitian seperti uji *In Silico* dan uji *In vitro*.

1.7.2 Manfaat Bagi Masyarakat

1. Memberikan alternatif pengobatan berbasis herbal yang lebih alami dan potensial.
2. Mendorong pemanfaatan tanaman obat lokal dalam dunia kesehatan.
3. Mendukung industri herbal dengan bahan baku alami yang memiliki nilai ekonomi tinggi.

1.7.3 Manfaat Bagi Universitas

1. Memperkaya sumber daya penelitian dalam bidang farmasi dan bioteknologi.
2. Meningkatkan jumlah publikasi ilmiah dan reputasi akademik universitas.
3. Menjadi referensi bagi mahasiswa dan dosen dalam penelitian serupa.

1.8 Sistematika Penulisan

Sistematika dalam penulisan Tugas Akhir ini adalah sebagai berikut :

Bab I Pendahuluan

Bab ini menguraikan dasar dilaksanakannya penelitian, mencakup identifikasi masalah, ruang lingkup masalah, rumusan masalah, tujuan dari penelitian, manfaat yang ingin dicapai, serta sistematika penulisan dalam laporan tugas akhir ini.

Bab II Tinjauan Pustaka

Bab ini memuat teori-teori yang relevan dengan penelitian serta kajian-kajian terdahulu yang menjadi dasar dalam penyusunan Tugas Akhir. Dalam bab ini juga dijelaskan mengenai definisi dari *Lycopodiella cernua* dan metode pengujian yang digunakan selama proses penelitian.

Bab III Metodologi Penelitian

Bab ini membahas metode yang digunakan untuk mengumpulkan dan mengolah data dalam pelaksanaan penelitian.

Bab IV Bab ini menyajikan penjabaran data yang diperoleh selama penelitian beserta hasil analisis yang diinterpretasikan oleh peneliti.

Bab V Berisi kesimpulan dari keseluruhan interpretasi berdasarkan hasil penelitian, serta pemberian saran terhadap peneliti selanjutnya agar penelitian yang akan dilakukan ke depan akan lebih baik lagi.

Bab II
Tinjauan Pustaka

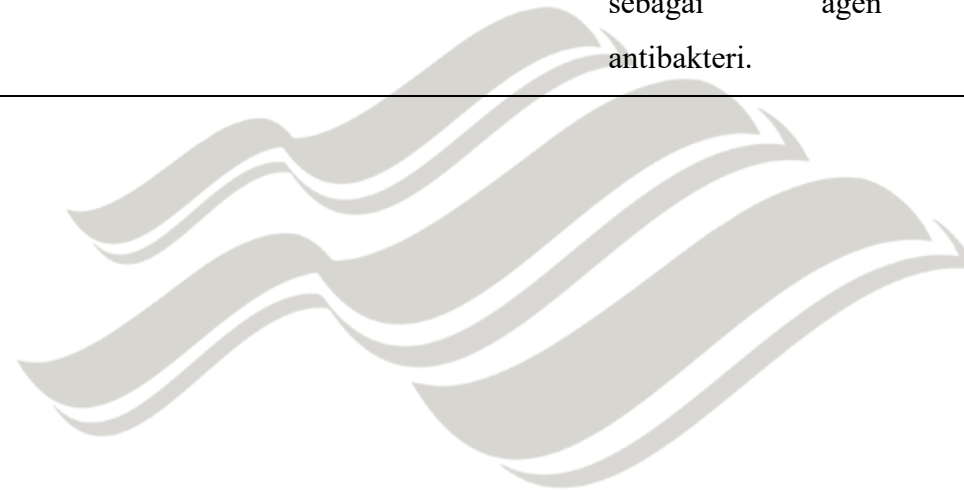
2.1 State of the art penelitian

Tabel 2. 1 State of the art

Tahun	Pengarang	Judul	Metode	Hasil	GAP/Keterbaharuan
2024	(Vanlalpeka, 2024)	<i>Phytochemical profiling and Pharmacognostic activity of Lycopodiella cernua (L.) Pic. Serm. a lesser-known plant from Mizoram, North East India</i>	Metode ekstraksi yang digunakan yaitu menggunakan 2 pelarut yang berbeda yaitu menggunakan metanol dan menggunakan kloroform.	Dimana hasil yang didapatkan metode ekstraksi menggunakan 2 kloroform menunjukkan lebih banyak senyawa sekunder yang banyak dibandingkan menggunakan pelarut metanol.	sehiungga peneliti melakukan keterbaharuan yang dilakukan adalah melakukan ekstraksi pelarut etanol yang diharapkan dapat menarik lebih banyak senyawa yang ada pada ekstrak <i>Lycopodiella cernua</i> .

Tahun	Pengarang	Judul	Metode	Hasil	GAP/Keterbaharuan
2018	(Porquis, 2018)	<i>Studi Anti-inflamasi, Antioksidan dan Sitotoksisitas pada Lycopodiella cernua (L.) J. Sm. di Bukidnon, Filipina</i>	menggunakan uji bioautografi melalui kromatografi lapis tipis (KLT) untuk melihat senyawa alkaloid, antrakuinon, fenolik, saponin, tanin dan terpenoid.	Hasil yang didapatkan hanya muncul senyawa saponin dan terpenoid dalam uji KLT.	Pada penelitian ini terdapat GAP yang bisa digunakan untuk melakukan pada metode analisis yang digunakan menggunakan LC-HRMS yang dimana sebelumnya hanya menggunakan KLT.
2022	(Amudha, 2022)	<i>In Silico screening and prediction of Lycopodiella cernua L. against crystal structure of DNA gyrase.</i>	menggunakan molecular docking untuk mengevaluasi interaksi metabolit sekunder dengan enzim DNA gyrase.	Hasil simulasi menunjukkan bahwa beberapa senyawa dalam <i>Lycopodiella cernua</i> memiliki afinitas tinggi terhadap target enzim, yang berpotensi digunakan	Pada penelitian ini melakukan keterbaharuan dimana tanaman <i>Lycopodiella cernua</i> digunakan sebagai agen antiinflamasi yang dianalisis menggunakan molekular doking.

Tahun	Pengarang	Judul	Metode	Hasil	GAP/Keterbaharuan
				sebagai antibakteri.	agen



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Berbagai penelitian telah mengeksplorasi potensi farmakologis dari *Lycopodiella cernua*, yang mengandung beragam senyawa bioaktif. Studi di Mizoram, India, menunjukkan bahwa ekstraksi dengan kloroform menghasilkan lebih banyak metabolit sekunder dibandingkan metanol. Oleh karena itu, penelitian terbaru menggunakan pelarut etanol untuk mengeksplorasi kemungkinan memperoleh senyawa bioaktif yang lebih beragam. Sementara itu, studi di Bukidnon, Filipina, yang meneliti aktivitas antiinflamasi, antioksidan, dan sitotoksitas, hanya mendeteksi saponin dan terpenoid melalui metode KLT. Untuk meningkatkan akurasi analisis, penelitian terbaru menggunakan teknik *LC-HRMS* guna mengidentifikasi lebih banyak senyawa dalam ekstrak *Lycopodiella cernua*.

Pendekatan *In Silico* juga telah digunakan untuk mengevaluasi interaksi senyawa *Lycopodiella cernua* dengan enzim DNA gyrase, yang berpotensi sebagai agen antibakteri. Namun, penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Amudha hanya terbatas pada pemodelan interaksi senyawa tanpa mengeksplorasi manfaat lainnya. Oleh karena itu, penelitian terbaru memperluas cakupan dengan mengevaluasi potensi ekstrak ini sebagai agen antiinflamasi, yang dapat memberikan kontribusi lebih luas dalam pengembangan obat berbasis tanaman.

Dengan inovasi dalam metode ekstraksi, teknik analisis, dan pendekatan farmakologi, penelitian terkini diharapkan dapat memberikan wawasan lebih komprehensif mengenai *Lycopodiella cernua*. Penggunaan metode ekstraksi yang lebih optimal dan teknik analisis canggih memungkinkan identifikasi senyawa bioaktif yang lebih akurat. Selain itu, pemodelan *In Silico* yang lebih luas membuka peluang eksplorasi lebih lanjut dalam pengembangan obat berbasis tanaman, menjadikan *Lycopodiella cernua* sebagai sumber potensial dalam bidang farmasi dan biomedis.

2.2 *Lycopodiella cernua*

Lycopodiella cernua atau paku kawat merupakan tumbuhan paku dari famili *Lycopodiaceae* yang tersebar luas di daerah tropis dan subtropis. dapat dilihat dari gambar 2,1 tanaman ini secara tradisional digunakan untuk mengobati berbagai penyakit, seperti gangguan saraf, peradangan, dan infeksi (Amudha, 2022). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa *Lycopodiella cernua* mengandung berbagai metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas farmakologi, termasuk alkaloid, flavonoid, dan terpenoid (Hung, 2015) (Zhao, 2018). *Lycopodiella cernua* umumnya memiliki batang dengan akar yang bercabang-cabang dan bercabang dua (dikotomi). Daunnya berukuran kecil (mikrofil), tidak memiliki tangkai, serta hanya memiliki satu tulang daun. Pada beberapa spesies dalam kelompok ini, terdapat struktur seperti lidah kecil yang disebut ligula.



Gambar 2. 1 Tanaman *Lycopodiella cernua*

Lycopodiella cernua tergolong dalam ordo Lycopodiales, yaitu kelompok tumbuhan yang memiliki batang tegak atau menjalar dengan sistem pengangkutan yang masih sederhana. Daun-daunnya berbentuk seperti rambut atau jarum, tersusun dalam pola spiral, dan hanya memiliki satu tulang utamaa (Sianturi, 2020).

Paku kawat umumnya tumbuh di daerah tebing atau semak-semak yang lembap pada ketinggian sekitar 1.000–2.000 meter di atas permukaan laut. Sementara itu, paku rambat biasanya berupa tanaman herba berukuran kecil yang sering dimanfaatkan dalam merangkai buket bersama bunga. Selain sebagai tanaman hias, tumbuhan ini

juga memiliki manfaat dalam pengobatan tradisional, khususnya sebagai bahan alami untuk menurunkan tekanan darah.

2.2.1 Klasifikasi

Berikut adalah tingkatan taksonomi dari *Lycopodiella cernua* (L.) Pic.Serm.:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Lycopodiophyta</i>
Kelas	: <i>Lycopodiopsida</i>
Ordo	: <i>Lycopodiales</i>
Famili	: <i>Lycopodiaceae</i>
Genus	: <i>Lycopodiella</i>
Spesies	: <i>Lycopodiella cernua</i> (L.) Pic.Serm.

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu teknik untuk memisahkan komponen tertentu dengan bantuan pelarut (Angriani, 2019). Terdapat berbagai metode dalam proses ekstraksi, di antaranya maserasi, ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE), dan ekstraksi berbantu ultrasonik (UAE). Maserasi dilakukan dengan merendam bahan dalam pelarut hingga tercapai keseimbangan konsentrasi (Nababan, 2018). Sementara itu, ekstraksi berbantu gelombang mikro (MAE) memanfaatkan radiasi gelombang mikro untuk mempercepat pemanasan pelarut, sehingga proses ekstraksi menjadi lebih efisien (Aulia, 2018). Di sisi lain, ekstraksi berbantu ultrasonik (UAE) menggunakan gelombang ultrasonik yang merambat melalui pelarut, menciptakan efek kavitasi yang meningkatkan suhu dan memfasilitasi pelepasan senyawa dari bahan yang diekstraksi (Isdiyanti, 2021).

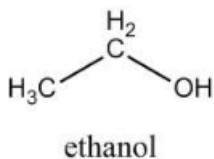
2.4 Pelarut

Pelarut merupakan zat yang mampu melarutkan berbagai macam zat terlarut, baik berupa padat, cair, maupun gas, hingga membentuk larutan homogen. Dalam kehidupan sehari-hari, air menjadi contoh pelarut yang paling umum digunakan. Umumnya, pelarut memiliki titik didih yang cukup rendah dan sifat mudah menguap, sehingga setelah proses penguapan, zat terlarut yang diinginkan dapat diperoleh. Kemampuan pelarut dalam melarutkan suatu zat dipengaruhi oleh struktur molekul serta sifat fisik dari pelarut dan zat terlarut itu sendiri (Wulandari, 2022).

Pelarut diklasifikasikan berdasarkan tingkat kepolarannya menjadi tiga jenis, yaitu non-polar, semi-polar, dan polar. Dalam suatu penelitian, tingkat kepolaran pelarut berperan penting terhadap jenis senyawa yang dapat diekstraksi, sesuai dengan prinsip "like dissolves like", yang berarti senyawa polar cenderung larut dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non-polar lebih mudah larut dalam pelarut non-polar (Ketut, 2023).

2.5 Etanol

Etanol atau alkohol memiliki rumus kimia C_2H_5OH . Dalam suhu ruang, etanol memiliki wujud cair, mudah menguap, etanol bersifat transparan, mampu larut sepenuhnya dalam air, tidak berwarna, serta mudah terbakar. Etanol merupakan jenis alkohol primer yang terbentuk ketika salah satu atom hidrogen pada etana digantikan oleh gugus hidroksil. Senyawa ini juga dikenal sebagai etil alkohol dan memiliki titik didih sebesar $78,4^{\circ}\text{C}$.



Gambar 2. 2 Struktur Molekul *Ethanol*

Rumus Molekul : C_2H_5OH

Sinonim : Etanol, etil alkohol, alkohol, Methylcarbinol

Berat Molekul : 46,07g/mol

Titik nyala : 55 ° F

Titik didih : 78.4 °C

Titik Leleh : -114.1 °C

Kepadatan : 6,5 lb / gal

Kelarutan : 1000000 mg/L (pada 25 °C), Larut dengan air, etil eter, aseton, kloroform; larut dalam benzena, Larut dengan banyak pelarut organik (Sheskey, 2017).

2.6 Antiinflamasi

Inflamasi merupakan respons perlindungan alami tubuh terhadap cedera jaringan yang disebabkan oleh trauma fisik, paparan zat kimia berbahaya, atau infeksi mikroorganisme. Proses inflamasi bertujuan untuk menonaktifkan atau menghancurkan organisme yang menyerang, menghilangkan zat iritan, serta mengatur tingkat pemulihan jaringan. Inflamasi berperan dalam menghancurkan, mengurangi, atau membatasi penyebaran agen perusak maupun jaringan yang mengalami kerusakan (Agustina, 2015). Tujuan utama inflamasi adalah memperbaiki jaringan yang mengalami kerusakan sekaligus melindungi tubuh dari infeksi. Gejala inflamasi meliputi kemerahan (rubor), peningkatan suhu pada area yang terkena (kalor), rasa nyeri (dolor), dan pembengkakan (tumor). Inflamasi akut merupakan reaksi yang terjadi segera setelah tubuh mengalami paparan iritan (Octavian, 2022).

Penanganan peradangan bertujuan utama untuk meredakan nyeri yang umumnya menjadi gejala awal, serta menghambat atau memperlambat terjadinya kerusakan jaringan. Salah satu golongan obat yang digunakan dalam terapi ini adalah obat antiinflamasi nonsteroid (AINS) dan kortikosteroid diketahui mampu menekan tanda serta gejala inflamasi. Namun, kedua kelompok obat ini yang umum digunakan dalam terapi inflamasi sering kali menyebabkan efek samping yang merugikan, seperti gangguan pada saluran pencernaan, toksisitas pada ginjal (nefrotoksik), serta kerusakan

hati (hepatotoksik) (Octavian, 2022). Oleh sebab itu, berbagai penelitian kini diarahkan pada pengembangan agen antiinflamasi yang bersumber dari bahan alami, khususnya tanaman. Bagian-bagian tanaman yang memiliki potensi untuk dimanfaatkan sebagai obat meliputi buah, daun, kulit batang, rimpang, serta bunga (Yuniarni, 2015).

2.7 *COX-2*

Cyclooxygenase-2 (COX-2) adalah enzim yang berperan penting dalam proses inflamasi, khususnya dalam sintesis prostaglandin dari asam arakidonat. Berbeda dengan *COX-1* yang bersifat konstitutif dan terlibat dalam fungsi fisiologis normal seperti proteksi mukosa lambung dan hemostasis, *COX-2* bersifat induktif dan diekspresikan terutama saat terjadi peradangan akibat cedera atau infeksi. Aktivasi *COX-2* menyebabkan peningkatan produksi prostaglandin proinflamasi, yang berperan dalam vasodilatasi, peningkatan permeabilitas kapiler, dan sensitisasi nociceptor, sehingga menimbulkan gejala klasik inflamasi seperti nyeri, kemerahan, dan pembengkakan.

Obat antiinflamasi non-steroid (NSAID) bekerja dengan menghambat aktivitas enzim *COX*, baik *COX-1* maupun *COX-2*. NSAID tradisional seperti ibuprofen dan naproksen bersifat non-selektif, artinya mereka menghambat kedua isoenzim tersebut. Namun, karena penghambatan *COX-1* dapat menyebabkan efek samping seperti iritasi lambung dan perdarahan gastrointestinal, dikembangkan NSAID selektif *COX-2* seperti *Celecoxib* yang dirancang untuk meminimalkan efek samping tersebut dengan tetap memberikan efek antiinflamasi. Dengan menghambat *COX-2*, produksi prostaglandin proinflamasi berkurang, sehingga menurunkan nyeri dan peradangan pada kondisi seperti osteoarthritis dan rheumatoid arthritis (Warner & Mitchell, 2004).

2.8 Identifikasi Metabolit Sekunder dan *LC-HRMS*

Identifikasi metabolit sekunder adalah proses untuk mendeteksi dan mengkarakterisasi senyawa bioaktif yang diproduksi oleh organisme, terutama tumbuhan, mikroorganisme, dan hewan laut. Metabolit sekunder merupakan senyawa yang tidak terlibat langsung dalam pertumbuhan dan perkembangan organisme, tetapi

berperan dalam pertahanan, interaksi ekologis, dan adaptasi lingkungan. Contoh metabolit sekunder meliputi alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, tanin, dan fenolik (Rintjap, 2020).

Salah satu cara untuk melakukan uji identifikasi sekunder adalah menggunakan *LC-HRMS* yang bisa dilihat pada gambar 2.3. *LC-HRMS (Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry)* metode ini merupakan teknik analisis yang menggabungkan kromatografi cair dengan spektrometri massa beresolusi tinggi, yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur senyawa dalam campuran yang kompleks. Kromatografi cair berfungsi untuk memisahkan komponen-komponen dalam sampel, sedangkan spektrometri massa beresolusi tinggi memungkinkan identifikasi senyawa berdasarkan akurasi massa yang sangat tinggi. Teknik ini banyak diterapkan di berbagai bidang seperti farmasi, lingkungan, dan studi metabolomik, karena kemampuannya dalam mendeteksi senyawa pada kadar yang sangat rendah serta melakukan analisis bersifat *non-targeted*. (Núñez, 2023).



Gambar 2. 3 *LC-HRMS*

Dalam analisis lingkungan, *LC-HRMS* digunakan untuk mendeteksi kontaminan organik pada konsentrasi yang sangat rendah, seperti pestisida dan polutan industri. Di bidang farmasi, teknik ini membantu dalam penemuan dan pengembangan obat dengan menganalisis metabolit dan produk degradasi obat. Selain itu, dalam penelitian metabolomik, *LC-HRMS* memungkinkan profil metabolit yang komprehensif, memberikan wawasan mendalam tentang proses biokimia dalam organisme (Intertek, 2023).

2.9 Uji *In Silico*

Uji *In Silico* merupakan istilah yang merujuk pada eksperimen atau pengujian yang dilakukan menggunakan simulasi berbasis komputer. Metode ini digunakan untuk menganalisis interaksi molekuler antara ligan dan protein, mengidentifikasi serta mengkarakterisasi situs pengikatan secara struktural, merancang senyawa dengan target spesifik, memodelkan struktur protein, melakukan skrining virtual berbasis ligan maupun struktur, serta memperkirakan energi pengikatan. Keunggulan dari metode *In Silico* meliputi peningkatan efisiensi, kecepatan proses, pengurangan penggunaan bahan, alat, dan hewan uji secara berlebihan, serta penghematan biaya dalam penelitian pengembangan obat. Dengan demikian, metode ini berkontribusi terhadap inovasi dalam bidang farmasi dan terapi (Sotriiffer, 2016).

Uji *in silico* dilakukan dengan cara melakukan proses *docking* antara molekul yang akan dievaluasi aktivitas biologisnya dengan target sel tertentu. *Docking* merupakan metode yang menyelaraskan ligan, yaitu molekul kecil, dengan reseptor berupa protein berukuran besar. Hasil dari proses ini biasanya berupa nilai energi ikatan atau *Rerank Score* (RS), yang menggambarkan seberapa besar energi yang diperlukan untuk terjadinya interaksi antara ligan dan reseptor. Semakin kecil nilai energi ikatan, semakin stabil kompleks yang terbentuk, dan hal ini menunjukkan potensi aktivitas biologis yang lebih tinggi (Marin, 2023).

2.10 Antioksidan dan Uji Antioksidan metode DPPH

Menurut Zulaikhah tahun 2017 Antioksidan adalah molekul yang berfungsi untuk menetralkan atau meredam efek merugikan oksidan dalam tubuh. Cara kerjanya adalah dengan mendonorkan satu elektron kepada oksidan, sehingga aktivitas oksidan tersebut berkurang. Dengan demikian, antioksidan turut berperan dalam pencegahan penyakit degeneratif, seperti gangguan kardiovaskular, kanker, dan lainnya. Senyawa ini dibutuhkan tubuh untuk menetralkan radikal bebas serta melindungi sel, protein, dan lipid dari kerusakan oksidatif.

Antioksidan dapat dibedakan menjadi dua jenis berdasarkan sumber asalnya, yaitu antioksidan endogen dan eksogen. Antioksidan endogen merupakan enzim-enzim dalam tubuh yang memiliki aktivitas antioksidan, seperti *superoksida dismutase* (SOD), *katalase* (Cat), dan *glutation peroksidase* (Gpx). Sementara itu, antioksidan eksogen berasal dari luar tubuh dan diperoleh melalui asupan makanan. Beragam bahan alami khas Indonesia diketahui kaya akan antioksidan, yang mengandung berbagai senyawa aktif seperti vitamin C, vitamin E, *provitamin A*, *organosulfur*, *α-tocopherol*, *flavonoid*, *thymoquinone*, *statin*, *niasin*, *phycocyanin*, dan senyawa lainnya (Wulandari, 2022).

Salah satu metode yang banyak digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Teknik ini umum dipakai karena mampu mengevaluasi kemampuan suatu senyawa atau ekstrak dalam menetralkan radikal bebas. Keunggulan metode DPPH terletak pada prosedurnya yang sederhana, waktu analisis yang singkat, sensitivitas tinggi, serta hanya memerlukan sedikit sampel. Prinsip kerja metode ini didasarkan pada penggunaan radikal bebas stabil yang berwarna ungu. Saat DPPH bereaksi dengan senyawa antioksidan yang dapat mendonorkan atom hidrogen, terjadi proses reduksi yang mengubah warna larutan dari ungu menjadi kuning. Perubahan ini kemudian dianalisis menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm (Halim, 2022).

Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam persen penghambatan yang dihitung dengan rumus:

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs sampel} - \text{abs NC}}{\text{abs PC} - \text{abs NC}} \times 100 \quad 2(1)$$

Dari data persen penghambatan pada berbagai konsentrasi sampel, dapat dibuat kurva kalibrasi untuk menentukan nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi sampel yang diperlukan untuk menghambat 50% radikal DPPH. Nilai IC_{50} yang lebih rendah menunjukkan aktivitas antioksidan yang lebih tinggi (Burhamin, 2023).

2.11 Aplikasi uji *In Silico*

Aplikasi uji *In Silico* adalah perangkat lunak atau platform komputasi yang digunakan untuk melakukan simulasi dan analisis interaksi molekuler, seperti *docking* molekuler, dinamika molekuler, serta pemodelan farmakokinetik dan toksisitas.

2.11.1 Bank Data Protein atau Protein Data Bank

Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) adalah repositori data daring yang menyimpan lebih dari 32.500 struktur makromolekul biologis dan memiliki beberapa bagian utama (Burley, 2022).

1. *Structural genomics initiatives*

Bagian ini berfungsi sebagai portal informasi yang menyediakan ringkasan terkait struktur genomik, mencakup daftar target, status perkembangan target, target yang telah dimasukkan dalam PDB, serta analisis kesamaan urutan (sequence redundancy analysis).

2. *Targets*

Bagian ini menawarkan berbagai informasi mengenai identifikasi target, nama protein, kombinasi target tertentu, serta data yang berkaitan dengan penentuan struktur protein.

3. *Structures*

Dalam bagian ini tersedia model homologi dari target, struktur genom, serta evaluasi proses penentuan struktur genomik yang dilakukan berdasarkan fungsi genom manusia, yang diperoleh dari berbagai struktur yang ada dalam PDB.

2.11.2 PyRx

PyRx adalah perangkat lunak yang mengintegrasikan *Autodock 4*, *Autodock Vina*, dan *Open Babel* untuk memfasilitasi proses *docking-based virtual screening* secara efisien. Autodock berfungsi dalam menyiapkan file input serta bertindak sebagai alat visualisasi untuk mengevaluasi hasil *docking*, sementara *Open Babel* memungkinkan konversi dan impor file ligan dalam format SDF.

2.11.3 *PyMOL*

PyMOL merupakan perangkat lunak yang digunakan untuk menganalisis serta memvisualisasikan struktur molekul dan makromolekul, termasuk protein, dalam bentuk gambar 3D. Aplikasi ini menyediakan tampilan tiga dimensi yang membantu dalam memahami serta mengeksplorasi struktur suatu molekul secara lebih mendalam.

2.11.4 *Discovery Studio*

Discovery Studio adalah perangkat lunak yang digunakan untuk memvisualisasikan interaksi antara ligan dan asam amino dalam makromolekul protein. Residu asam amino yang berinteraksi dengan ligan berperan dalam menentukan jenis ikatan yang terbentuk antara ligan dan protein.

2.12 *Spektrofotometer UV-VIS*

Spektrofotometri UV-Vis adalah teknik analisis yang digunakan untuk menentukan konsentrasi suatu zat dalam bentuk gas, uap, atau larutan. Umumnya, sampel harus diubah menjadi larutan yang bening, dengan syarat larut sempurna, tidak bereaksi dengan analit yang akan ditentukan, serta memiliki kemurnian yang tinggi. Pelarut yang umum digunakan dalam teknik ini antara lain etanol, air, n-heksana, dan metanol, karena memiliki sifat transparan yang baik terhadap sinar ultraviolet.



Gambar 2. 4 *Spektrofotometer Uv-Vis*

Spektrofotometer UV-Vis terdiri dari dua jenis utama, yaitu single beam dan double beam. Single beam bekerja dengan satu jalur cahaya yang langsung melewati

sampel dan digunakan untuk analisis kuantitatif absorbansi pada panjang gelombang tertentu, mulai dari 190 nm hingga 1000 nm. Sementara itu, double beam memiliki sistem pemisah cahaya berbentuk cermin V, yang membagi sinar menjadi dua jalur, satu melewati larutan blanko, dan yang lainnya melewati sampel yang bisa dilihat pada gambar 2.4. Jenis ini biasanya digunakan untuk pengukuran pada rentang panjang gelombang antara 190 nm hingga 750 nm.

Alat *spektrofotometer UV-Vis* terdiri dari beberapa komponen utama, yaitu sumber cahaya (seperti lampu tungsten), monokromator yang berfungsi untuk memilih panjang gelombang tertentu, serta detektor yang bertugas menangkap dan mengukur cahaya yang telah melewati sampel. Setiap bagian ini bekerja secara sinergis untuk menghasilkan data absorbansi yang akurat. Prinsip kerja *spektrofotometer UV-Vis* didasarkan pada interaksi antara cahaya ultraviolet dan cahaya tampak dengan sampel. Cahaya dari sumbernya diarahkan melalui monokromator untuk mengatur panjang gelombang yang diinginkan, kemudian melewati sampel. Sebagian cahaya akan diserap oleh sampel, sementara sisanya diteruskan ke detektor. Cahaya yang tidak terserap kemudian diproses untuk menghasilkan nilai absorbansi yang ditampilkan pada layar instrumen (Sahumena, 2020).

2.13 Celecoxib

Celecoxib adalah obat antiinflamasi non-steroid (NSAID) selektif COX-2 dengan struktur kimia CC1=CC=C(C=C1C2=CC=CC=C2S(=O)(=O)N3C=CC=CC3)C4=CC=CC=C4C5=CC=CC=C5C6=CC=CC=C6 4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pyrazol-1-il]benzensulfonamida, termasuk turunan diaril-pyrazol. *Celecoxib* bekerja dengan selektif menghambat enzim COX-2, sehingga menekan sintesis prostaglandin proinflamasi. Aktivitas selektif ini memberikan efek analgesik, antiinflamasi, dan antipiretik kuat, dengan efek penghambatan pada COX-1 yang relatif lemah. Sebagai inhibitor COX-2 selektif, *Celecoxib* secara efektif mengurangi pembentukan mediator inflamasi. Hasil studi klinis menunjukkan *Celecoxib* lebih unggul dari plasebo dalam mengurangi nyeri dan gejala rematik (NNT = 4 untuk perbaikan nyeri) (Kristian, 2018). Dibanding NSAID tradisional, efektivitas *Celecoxib* untuk meredakan nyeri dan memperbaiki fungsi mirip, tetapi dengan insiden ulkus gastroduodenal yang lebih

rendah (Kristian, 2018). Dengan demikian *Celecoxib* terbukti sebagai agen antiinflamasi efektif yang menurunkan peradangan melalui hambatan *COX-2*. Banyak studi *In vitro* dan *in vivo* mengonfirmasi efek antiinflamasi *Celecoxib*. Uji klinis pada pasien rheumatoid arthritis menunjukkan perbaikan nyeri dan gejala lebih baik dibanding plasebo (Kristian, 2018). *Celecoxib* juga menghambat sintesis Prostaglandin E_2 pada kultur sel dan mengurangi edema pada model hewan (misalnya tikus OA) (data ringkasan). Keamanan klinis tercermin pada ulasan Cochrane yang mencatat kejadian efek samping serius setara placebo namun risiko ulkus lambung lebih rendah dari NSAID biasa (Kristian, 2018).

2.14 15-HETE-G

15-HETE-G (15-hidroksieikosatetraenoat gliseril ester) adalah ester gliserol dari 15-hidroksieikosatetraenoat (*15-HETE*), suatu eikosanoid turunan asam arakidonat. Senyawa ini dihasilkan melalui metabolisme lipooksigenase (15-LOX) dari 2-AG (2-arahidonoilglycerol). Struktur umumnya berupa rantai asam lemak C_{20} terdandung gugus hidroksil. *15-HETE-G* berperan sebagai agonis $PPAR\alpha$ (*peroxisome proliferator-activated receptor alfa*). Aktivasi $PPAR\alpha/PPAR\gamma$ mengarah pada penekanan jalur inflamasi seluler, termasuk penghambatan NF- κ B, enzim induksi NO sintase, dan ekspresi *COX-2*. Dengan demikian *15-HETE-G* menyalurkan sinyal antiinflamasi tidak langsung melalui jalur nuklir, bukan sebagai penghambat enzim *COX-2* langsung. Meskipun *15-HETE-G* tidak dikategorikan sebagai inhibitor *COX-2* klasik, aktivasi $PPAR\alpha/\gamma$ oleh *15-HETE* dan *15-HETE-G* menurunkan ekspresi gen *COX-2* serta mediator inflamasi lainnya. Contohnya, metabolit *15-HETE* yang bersifat antiinflamasi dilaporkan meningkatkan aktivitas transkripsi $PPAR\gamma$ dan menghambat NF- κ B dan *COX-2*. Dengan demikian *15-HETE-G* berpotensi mengurangi respon inflamasi vaskular dan sitokin proinflamasi melalui mekanisme ini.

2.15 (-)-Isopiperitenone

(-)-Isopiperitenone adalah senyawa monoterpen siklik (keton) yang terdapat dalam minyak atsiri beberapa tanaman, misalnya *Tagetes parryi*. Struktur kimianya tergolong 2-cyclohexen-1-one terdisubstitusi. Data mekanistik spesifik untuk isopiperitenone masih minim. Secara umum, senyawa monoterpen seperti ini dapat bersifat antiinflamasi melalui efek membran sel atau jalur sinyal nuklir tertentu. Namun, belum ada laporan konklusif bahwa isopiperitenone bekerja sebagai inhibitor langsung COX-2 atau jalur tertentu. Belum ada data eksplisit mengenai isopiperitenone sebagai penghambat COX-2. Namun, minyak atsiri *Tagetes parryi* yang mengandung isopiperitenone menunjukkan aktivitas antiinflamasi kuat pada model hewan. Pada tikus, minyak ini menekan edema induksi TPA hampir setara indometasin, kemungkinan melalui penghambatan jalur Protein Kinase C dan COX-2. Hal ini mengindikasikan komponen aktif utama minyak (seperti verbenone, tagetone, dan mungkin isopiperitenone) bekerja sinergis menurunkan mediator inflamasi. Peran spesifik isopiperitenone sendiri dalam efek ini belum dipisahkan (González, 2022).

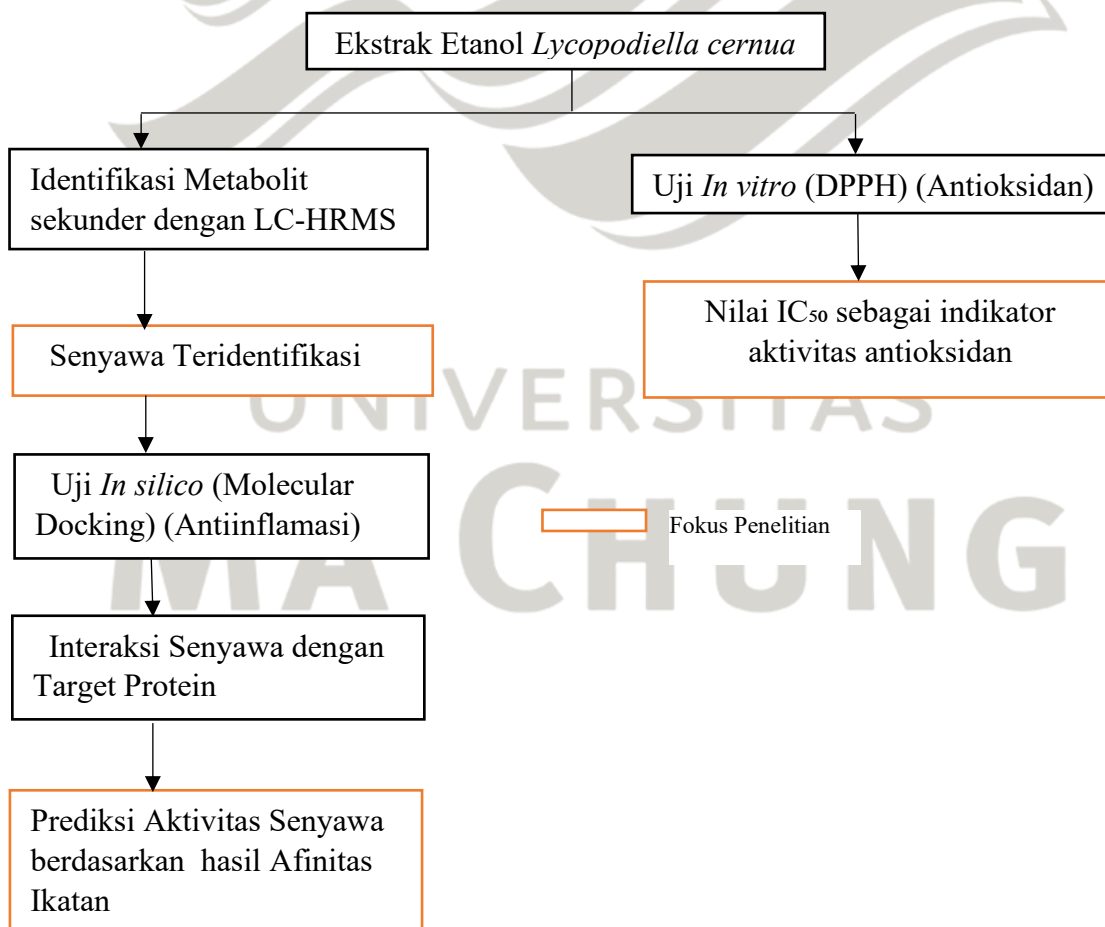
2.16 Limonene-1,2-diol

Limonene-1,2-diol adalah metabolit terpolarisasi dari D-limonene (monoterpene). Senyawa ini merupakan dihidroksi-limonene (dua gugus -OH pada posisi 1 dan 2) yang dihasilkan oleh oksidasi limonene di hati. Limonene-1,2-diol tidak banyak dipelajari sendirian, tetapi efek antiinflamasinya diduga berasal dari kemampuannya menekan respon imun proinflamasi. Penelitian menunjukkan D-limonene dan metabolitnya (termasuk Limonene-1,2-diol) menghambat produksi sitokin proinflamasi (seperti IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, IL-13) oleh sel T CD4 positif. Dengan menurunkan sitokin ini, Limonene-1,2-diol bersifat imunomodulator. Efek ini tidak secara langsung menarget enzim COX-2, melainkan menekan proses inflamasi menengah. Tidak ada bukti langsung bahwa Limonene-1,2-diol menghambat COX-2. Namun, penekanan sitokin Th1/Th2 dan efek antioksidan terkait metabolit limonene (misalnya perillaldehid, asam perilat) turut mereduksi inflamasi seluler. Oleh karena

itu, *Limonene-1,2-diol* berkontribusi pada aksi antiinflamasi tidak langsung, sebagai bagian dari efek gabungan metabolit limonene.

Studi sel menunjukkan *Limonene-1,2-diol* mampu mengurangi sekresi IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4, dan IL-13 oleh limfosit setelah stimulasi antigen. Ini mendukung potensi immunomodulator senyawa tersebut. Selain itu, analisis farmakokinetik melaporkan kemunculan *Limonene-1,2-diol* dalam sirkulasi setelah konsumsi limonene. Sampai sekarang belum ada uji klinis khusus, tetapi efek antiinflamasi limonene dan metabolitnya didukung oleh studi pra-klinis pada sel dan hewan (misalnya model kolitis dan peradangan usus) di literatur lain (Sanshita, 2025).

2.17 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2. 5 Kerangka Konsep Penelitian

Bab III

Metode Penelitian

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen laboratorium dan analisis data menggunakan metode deskriptif. Metode eksperimen merupakan pendekatan kuantitatif yang bertujuan untuk menguji pengaruh variable independen atau perlakuan terhadap variabel dependen dalam kondisi yang terkontrol. Dalam penelitian ini, fokus utama adalah mengidentifikasi kandungan senyawa serta mengevaluasi aktivitas antiinflamasi dan antioksidan.

3.2 Populasi dan Sampel

Pada penelitian ini menggunakan populasi dan sampel untuk mengambil data untuk mendapatkan hasil dari eksperimen.

3.2.1 Populasi

Penelitian ini menggunakan *Lycopodiella cernua* yang diperoleh dari Desa Hilir Kantor, Kec. Ngabang, Kab. Landak, Provinsi Kalimantan Barat.

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan adalah hasil ekstrak dari *Lycopodiella cernua* dengan berbagai macam konsentrasi yang akan diidentifikasi antioksidan dengan metode DPPH, identifikasi metabolit sekunder dengan LC-HRMS dan hasilnya kemudian di doking sebagai antiinflamasi.

3.3 Variabel Penelitian

3.3.1 Variabel Bebas

Jenis ekstrak (ekstrak etanol dari paku kawat), Struktur senyawa hasil identifikasi metabolit sekunder, dan Konsentrasi ekstrak atau senyawa hasil isolasi (30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, 150 ppm, dan 180 ppm).

3.3.2 Variabel Terikat

Jenis dan jumlah metabolit sekunder yang terdeteksi (flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan fenolik), Hasil interaksi molekuler (afinitas ikatan dengan target protein dalam uji *docking*), Aktivitas antioksidan (nilai IC_{50} pada uji DPPH).

3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol mencakup parameter *LC-HRMS* (waktu retensi, m/z , intensitas), parameter docking (*software, grid box, metode scoring, energi binding*), serta kondisi uji DPPH (suhu, pH, kontrol positif seperti asam galat).

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Rotary evaporator, LC-HRMS, Spektrofotometri UV-Vis, timbangan analitik, kuvet, *beaker glass*, aluminium foil, pipet tetes, mikropipet, *water-bath*, vial, , botol gelap, labu takar, batang pengaduk, wadah maserasi, laptop dilengkapi dengan aplikasi Pyrx, *PyMOL* dan *Discovery Studio 4.0*.

3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *Lycopodiella cernua*, DPPH (Smartlab), Etanol 96%, metanol p.a, asam galat (merck), dan aquades.

3.5 Waktu Pengerjaan

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Maret hingga bulan Mei. Untuk tempat penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Kimia Farmasi dan farmakognosi Universitas Ma Chung, Malang, Jawa Timur, Indonesia.

3.6 Prosedur Kerja

3.6.1 Determinasi Tumbuhan

Pengambilan sampel tanaman *Lycopodiella cernua* dilakukan di Desa Hilir Kantor, Kecamatan Ngabang, Kabupaten Landak, Kalimantan Barat. Sampel tanaman tersebut kemudian dibawa menuju laboratorium untuk keperluan identifikasi dan melakukan determinasi. Sebelum dianalisis, tanaman terlebih dahulu dibersihkan dari

kotoran dan benda asing lainnya dengan air bersih. Setelah itu, bagian-bagian utama seperti daun, batang, dan akar dipisahkan dan diamati secara makroskopis untuk mendeskripsikan ciri morfologi yang menonjol.

Selanjutnya, dilakukan pembuatan preparat mikroskopis dengan mengambil irisan tipis jaringan tanaman, yang kemudian diberi pewarna khusus guna memperjelas struktur anatominya. Pemeriksaan dilakukan menggunakan mikroskop cahaya untuk mengamati ciri anatomi penting seperti jenis jaringan, pola pembuluh, dan struktur sel yang menjadi pembeda spesies. Data yang diperoleh dari pengamatan morfologi dan anatomi selanjutnya dibandingkan dengan referensi taksonomi serta koleksi spesimen di herbarium UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu Malang. Proses identifikasi dilakukan dengan mencocokkan karakteristik tanaman dengan deskripsi taksonomi resmi dari genus dan spesies *Lycopodiella cernua*. Seluruh hasil identifikasi dicatat secara sistematis dan menjadi bagian dari laporan dokumentasi laboratorium.

3.6.2 Persiapan Sampel

Paku kawat atau *Lycopodiella cernua* dikeringkan kemudian dihancurkan menjadi ukuran partikel yang lebih kecil.

3.6.3 Proses Ekstraksi

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi, di mana sebanyak 839,8 kg tanaman Paku kawat (*Lycopodiella cernua*) yang telah dibersihkan, diblender, kemudian dikeringkan dengan dijemur di bawah panas matahari. Selanjutnya diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 dengan metode maserasi selama 48 jam dengan diaduk setiap harinya selama 20 menit. Setelah proses ekstraksi selesai, filtrat yang dihasilkan disaring menggunakan kertas saring Whatman untuk memisahkan ampas dari cairan ekstrak. Selanjutnya, ekstrak yang diperoleh mengalami proses evaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 40°C untuk menguapkan etanol dari ekstrak botanikal dan mencegah degradasi (Shipeng, 2019), sehingga diperoleh ekstrak pekat yang siap digunakan untuk analisis lebih lanjut. Proses ekstraksi ini merupakan proses ekstraksi senyawa bioaktif yang dilakukan berdasarkan prosedur yang dilakukan oleh (Mayangsari, 2020).

3.6.4 Identifikasi Metabolit Sekunder dengan Uji LC-HRMS

Uji LC-HRMS dilakukan oleh laboratorium *Corpora Science* yang berlokasi di Yogyakarta, Analisis metabolomik dilakukan dengan menggunakan sistem *Ultra High Performance Liquid Chromatography* (UHPLC) *Thermo Scientific™ Vanquish™ Horizon* dengan *Binary Pump* yang berasal dari Germering, Jerman. Pemisahan analit dilakukan menggunakan kolom analitik *Thermo Scientific™ Accucore™ Phenyl Hexyl* dengan dimensi 100 mm panjang \times 2.1 mm ID dan ukuran partikel 2.6 μ m (diproduksi di Lithuania). Fase gerak terdiri dari dua pelarut: pelarut A berupa air *MS-grade* yang mengandung 0.1% asam format, dan pelarut B berupa asetonitril *MS-grade* dengan 0.1% asam format. Sistem kromatografi dijalankan pada laju alir 0.3 mL/menit selama total waktu 25 menit dengan gradien sebagai berikut: dimulai dari 5% pelarut B dan dinaikkan secara bertahap hingga 90% dalam 16 menit, dipertahankan pada 90% selama 4 menit, kemudian diturunkan kembali ke 5% hingga menit ke-25. Suhu kolom dijaga pada 40 °C dan volume injeksi sampel sebanyak 5 μ L.

Deteksi dilakukan menggunakan instrumen *High Resolution Mass Spectrometry Thermo Scientific™ Orbitrap™ Exploris 240* (Bremen, Jerman) dengan mode akuisisi *Full MS/dd-MS²* dan polaritas positif. Resolusi untuk *Full MS* ditetapkan pada 90,000 FWHM, dengan rentang pemindaian 70–1000 m/z dan waktu injeksi maksimum 100 ms. Ambang intensitas sinyal ditetapkan pada 5000, hanya ion dengan muatan +1 yang dianalisis, dan toleransi massa sebesar 5 ppm. Untuk mode *dd-MS²*, resolusi ditetapkan pada 22,500 FWHM dengan energi tumbukan normatif (*Normalized Collision Energy/NCE*) bertingkat: 30, 50, dan 70 menggunakan gas nitrogen sebagai gas tumbukan. Ionisasi dilakukan menggunakan sumber ion *OptaMax™ NG Heated Electrospray Ionization (H-ESI)* dengan tegangan semprot 3500 V untuk polaritas positif dan 2500 V untuk negatif. Gas pelindung (*sheath gas*), gas bantu (*auxiliary gas*), dan gas sapu (*sweep gas*) masing-masing disetel pada 35, 7, dan 1 satuan arbitrer. Suhu tabung transfer ion ditetapkan pada 300 °C, sementara suhu penguap (*vaporizer*) pada 320 °C.

Persiapan sampel dilakukan dengan menimbang 30 mg sampel, kemudian dilarutkan dalam 1 mL metanol HPLC-grade dan dihomogenkan selama 2 menit. Setelah itu dilakukan pengenceran tiga kali lipat dengan metanol HPLC-grade. Larutan yang dihasilkan disaring menggunakan filter nilon 0.20 μm , dan hasil filtrat siap untuk diinjeksi ke dalam sistem. Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak *Thermo Scientific™ Compound Discoverer 3.3 (San Jose, USA)*. Pencocokan senyawa dilakukan dengan pustaka *mzCloud* (kategori Natural Products/Medicines dan Natural Toxins) serta basis data *ChemSpider* yang mencakup berbagai repositori ilmiah seperti *ChEBI*, *ChEMBL*, *KEGG*, *FooDB*, *LIPID MAPS*, dan lainnya. Pencarian senyawa juga mencakup basis data struktur massa seperti *Arita Lab Flavonoid Structure Database*, *Endogenous Metabolites*, dan *Natural Products Atlas*.

3.6.5 Uji *In Silico* Dengan Simulasi Molecular Docking

Proses persiapan ligan dan reseptor diawali dengan pemilihan senyawa yang didapatkan pada hasil *LC-HRMS* yang terdapat dalam ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*, sebagai ligan. Sementara itu, reseptor yang digunakan adalah *COX-2*. Struktur tiga dimensi dari ligan dan reseptor diperoleh melalui basis data NCBI, kemudian diformat ke dalam ekstensi “pdbqt” menggunakan perangkat lunak Autodock. Selanjutnya, dilakukan proses *running grid* serta simulasi docking antara ligan dan reseptor menggunakan Autodock. Untuk mengevaluasi kekuatan interaksi dan stabilitas ikatan antara keduanya, analisis dilakukan dengan Autodock, sedangkan visualisasi interaksi molekuler ditampilkan menggunakan aplikasi *Accelrys Discovery*.

a. Pengunduhan Target Protein

Struktur molekul target reseptor dapat diperoleh dengan mengunduh file dari situs Protein Data Bank (PDB) di <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Cari target protein yaitu *5KIR (COX-2)* lalu unduh protein dalam format pdb. Setelah itu dilakukan evaluasi terhadap protein yang akan digunakan. Setelah itu, dilakukan evaluasi terhadap kualitas protein yang akan digunakan. Evaluasi ini mencakup pengecekan resolusi, di mana nilai resolusi yang baik berada dalam rentang 1–3, yang dapat diperiksa langsung melalui situs PDB.

b. Preparasi Struktur Molekul Ligan

Setelah itu senyawa A dilakukan preparasi dengan menggunakan Pubchem <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> dengan cara mencari senyawa kemudian klik pubchem ID lalu unduh 3D conformer kemudian save dan dimasukkan dalam 1 folder.

c. Preparasi Struktur

File yang diunduh dari *PubChem* dikonversi dari format 3D SDF menjadi PDBQT, kemudian dilakukan proses minimisasi energi. Dalam tahap pemilihan protein, langkah pertama adalah memilih *chain* yang sesuai, lalu menghapus ligan yang tidak diperlukan dengan memisahkan ligan kontrol dan kompleks. Setelah itu, dilakukan penyempurnaan struktur dengan mengklik opsi *refinement structure*. Selanjutnya, molekul air dihapus karena *PyRx* tidak dapat menganalisis struktur yang masih mengandung air. Setelah seluruh molekul air dihilangkan, file disimpan dengan format PDB, kemudian dikonversi ke format PDBQT untuk proses analisis lebih lanjut.

d. Preparasi Menghilangkan Molekul Air

Proses preparasi untuk menghilangkan molekul air dilakukan dengan membuka aplikasi *PyMOL*, lalu memilih menu *File* dan mengklik *Open* untuk memasukkan protein yang telah dipilih. Jika terdapat titik-titik merah pada struktur, itu menandakan keberadaan molekul air yang perlu dihapus. Penghapusan dilakukan dengan memilih opsi *Remove Water* agar protein siap untuk analisis lebih lanjut.

e. Penambatan Molekul (*Molecular Docking*)

Proses penambatan molekul dilakukan dengan menjadikan senyawa sebagai ligan yang dipasangkan dengan protein menggunakan perangkat lunak *PyRx*. Struktur dari makromolekul dan ligan yang telah dioptimasi secara terpisah kemudian disimpan dalam satu folder yang sama untuk mempermudah proses docking.

Proses docking dimulai dengan langkah langkah sebagai berikut:

1. Klik *start*
2. Klik *add macromolecule* untuk protein yang sudah dihilangkan airnya
3. Klik *add control* untuk masukkan ligan dengan format *pdabt*
4. Klik open babel
5. Klik kanan *minimize all* lalu convert semua ke dalam bentuk *psd*
6. Klik *macromolecule* dan semua ligan yang diperoleh dari hasil *LC-HRMS*
7. Klik *forward* dan klik hasil prediksi protein
8. Klik *toggle selection spheres*. Di bagian selanjutnya terdapat *gridbox* yang dapat diatur pada tabel *view*, diarahkan pada binding site sebagai titik tengah.
9. Klik run vina, maka proses *docking* akan dimulai dan tunggu hingga 100% maka hasil akan muncul pada tabel *analyze result*.
10. Klik *ligand out* dengan *binding affinity* terkecil karena makin kecil nilainya maka akan semakin baik.
11. Pada tabel *navigator* klik *molecule* pilih ligand out yang telah diklik di tabel *analyze result*
12. Klik kanan *save as PDB* untuk menyimpan table.

Validasi metode *docking* terhadap ligan asli dilakukan guna memperoleh konformasi tiga dimensi ligan saat berinteraksi dengan reseptor, dengan mempertimbangkan koordinat pusat massa dari struktur serta ukuran *grid box* pada area *binding site*, yang dinyatakan dalam satuan angstrom untuk Vina atau jumlah titik untuk AutoDock

f. Analisa Molecular Docking

Proses penambahan molekul menghasilkan nilai *binding energy* dalam satuan kcal/mol yang menunjukkan kekuatan interaksi antara senyawa uji dan protein target. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan *binding energy* dari ligan asli terhadap reseptor. Jika senyawa A memiliki nilai *binding energy* yang lebih rendah (lebih negatif) dibandingkan ligan asli, maka dapat diasumsikan bahwa senyawa A memiliki potensi untuk bersaing dalam mengikat situs aktif protein target. Nilai *binding energy*

terbaik yang diperoleh dari hasil docking dapat disajikan dalam bentuk tabel, dan interaksi yang terbentuk divisualisasikan secara dua dimensi (2D) menggunakan perangkat lunak *Discovery Studio Visualizer*. Visualisasi ini bertujuan untuk mengidentifikasi jenis ikatan serta residu asam amino yang berperan dalam pengikatan ligan terhadap protein. Interaksi yang terjadi khususnya pada sisi aktif protein akan digunakan sebagai dasar prediksi awal aktivitas senyawa, dan senyawa turunan dengan ikatan paling kuat terhadap protein target akan dipertimbangkan sebagai kandidat dengan potensi aktivitas terbaik.

3.6.5 Uji Antioksidan Menggunakan Metode DPPH

Uji dilakukan dengan metode DPPH. Prosedur untuk uji ini antara lain (Pogaga *et al.*, 2020):

1. Pembuatan larutan induk DPPH

DPPH ditimbang sebanyak 10 mg, dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas pada labu 100 mL. Larutan DPPH dimasukkan ke dalam wadah kedap cahaya.

2. Pembuatan larutan blanko DPPH

Larutan induk DPPH diambil sebanyak 40 mL, dimasukkan dalam labu 100 mL, dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Larutan dihomogenkan dan 30 didiamkan selama 30 menit. Dilakukan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 516,5 nm.

3. Pengujian sampel

Sampel *Lycopodiella cernua* ditimbang sebanyak 100 mg dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas pada labu 10 mL. Larutan dibuat dengan konsentrasi 30 ppm, 60 ppm, 90 ppm, 120 ppm, 150 ppm, dan 180 ppm. Larutan sampel pada masing-masing konsentrasi dipipet sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 3,8 mL. Wadah ditutup dengan aluminium foil, didiamkan selama 30 menit, dan dilakukan pengukuran absorbansinya pada panjang gelombang 516,5 nm.

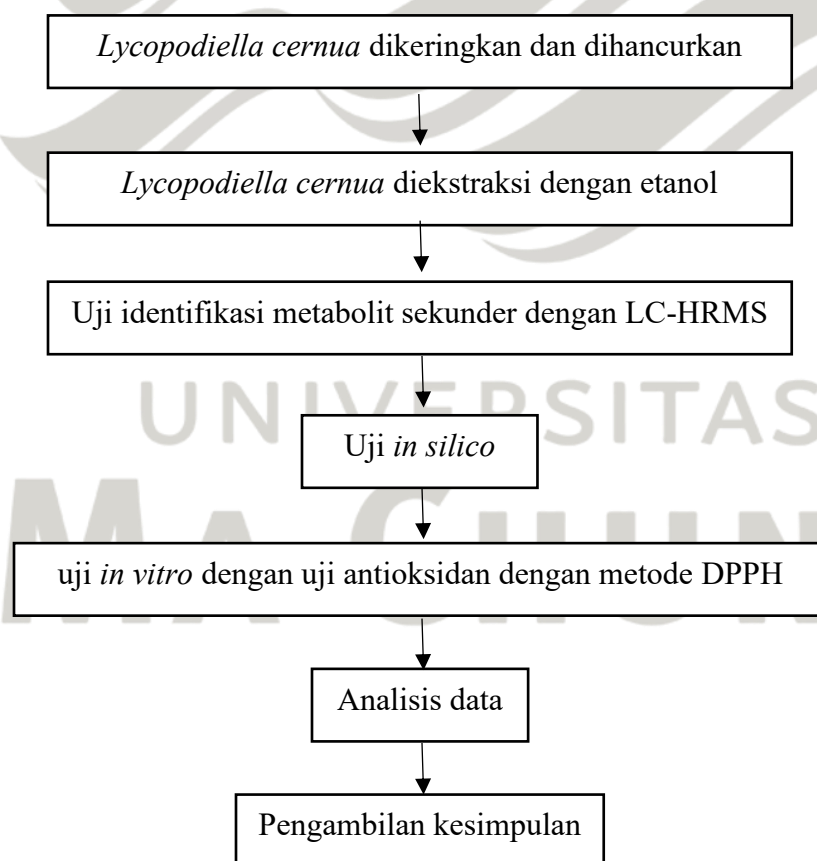
4. Pembuatan larutan pembanding

Asam galat ditimbang sebanyak 1 mg, dimasukkan dalam labu 5 mL dan dilarutkan dengan etanol p.a sampai tanda batas. Larutan dibuat pada konsentrasi 10 ppm. Larutan pembanding diambil sebanyak 0,2 mL dan ditambahkan larutan DPPH sebanyak 3,8 mL. Wadah ditutup dengan aluminium foil, didiamkan selama 30 menit, dan dilakukan pengukuran absorbansinya.

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{abs sampel} - \text{abs NC}}{\text{abs PC} - \text{abs NC}} \times 100$$

(3-1)

3.7 Bagan Alur Kerja



Bab IV

Hasil dan Pembahasan

4.1 Hasil Determinasi

Paku kawat yang akan diteliti diperoleh dari dari Desa Hilir Kantor, Kec. Ngabang, Kab. Landak, Provinsi Kalimantan Barat. Sebelum dilakukan penelitian dilakukan determinasi terlebih dahulu terhadap Paku kawat. Determinasi paku kawat bertujuan untuk mengetahui dan memastikan kebenaran identitas sampel yang akan digunakan di dalam penelitian. Determinasi paku kawat dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu. Jalan Lahor Nomor 87, Pesanggrahan, Kota Batu, Jawa Timur 65313. Paku kawat termasuk ke dalam family Lycopodiaceae, genus *Lycopodiella*, spesies *Lycopodiella cernua* (L.) Pic.Serm., dan sinonim *Lycopodium cernuum* L. = *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc. Morfologi dari paku kawat habitus bercabang banyak, hijau muda, berakar dalam tanah. Batang tegak, naik tegak sedikit demi sedikit atau tumbuh telentang, biasanya dengan cabang tegak, kalau menyentuh tanah akan tumbuh akar; cabang halus dikelilingi daun. Daun berbentuk garis, hampir selalu agak lunak, panjang 2-5 mm. Sporangia sporangia dalam ketiak daun sporofil yang beringgit, terkumpul dalam bulir yang jelas; bulir duduk pada ujung cabang yang bedaun normal, menunduk atau tegak. Hasil determinasi dapat dilihat dalam lampiran A.

4.2 Hasil Ekstraksi

Proses ekstraksi dimulai dari mempersiapkan simplisia yang akan diekstraksi, dimana menggunakan tanaman paku kawat (*lycopodiella cernua*). Tanaman yang didapatkan dicuci sampai kering kemudian dijemur secara tradisional di bawah sinar matahari untuk mendapatkan tanaman kering. Setelah kering tanaman dilakukan penggilingan untuk mendapatkan partikel kecil atau serbuk sebelum dilakukan proses ekstraksi. Tujuan dari proses pengecilan ukuran simplisia adalah untuk menghasilkan partikel-partikel berukuran lebih kecil, yang secara otomatis meningkatkan luas permukaan total dari bahan tersebut (Rina, 2023). Dengan meningkatnya luas permukaan, kontak antara simplisia dan pelarut akan menjadi lebih maksimal. Kondisi

ini memungkinkan pelarut lebih mudah meresap ke dalam jaringan simplisia dan mengekstraksi senyawa aktif yang terkandung di dalamnya secara lebih efisien. Dengan demikian, proses ekstraksi atau penyarian dapat berlangsung lebih optimal.

Ekstraksi merupakan suatu metode yang digunakan untuk memisahkan senyawa kimia dari simplisia. Proses ini bekerja berdasarkan prinsip perpindahan massa, di mana senyawa yang larut akan berpindah ke dalam pelarut yang memiliki kesesuaian polaritas dengannya, sesuai konsep “*like dissolves like*” (Popova, 2023). Awalnya, perpindahan senyawa terjadi di area pertemuan antara pelarut dan bahan, lalu senyawa tersebut menyebar atau berdifusi ke dalam pelarut, memungkinkan terjadinya pemisahan komponen yang diinginkan. Metode ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu menggunakan metode maserasi. Pemilihan metode maserasi jika dibandingkan dengan metode lainnya memiliki beberapa kelebihan yaitu ekonomis, sederhana dan cepat. Maserasi juga mengkonsumsi lebih sedikit energi, waktu dan bahan yang digunakan, serta dapat menghasilkan banyak produk murni.

Pada penelitian ini proses ekstraksi dilakukan menggunakan metode maserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan 1:5 selama 48 jam dengan diaduk setiap harinya selama 20 menit agar proses ekstraksi dapat optimal. Pemilihan pelarut dalam proses ekstraksi memiliki peran penting karena dapat memengaruhi jenis dan jumlah senyawa yang berhasil diambil dari simplisia. Penentuan jenis pelarut biasanya disesuaikan dengan tingkat kepolaran senyawa yang ingin diekstraksi, di mana senyawa non-polar akan larut dalam pelarut non-polar, dan senyawa polar akan larut dalam pelarut polar (Jayakody, 2024). Pada penelitian ini, pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Pemakaian etanol 96% dipilih karena proses ekstraksi ditujukan untuk mengambil senyawa metabolit sekunder yang memiliki sifat polar dari ekstrak tanaman *Lycopodiella cernua*.

Setelah proses ekstraksi selesai, larutan hasil ekstrak disaring menggunakan kertas saring *whatman* untuk memisahkan sisa-sisa kotoran dan endapan yang masih tertinggal. Filtrat hasil penyaringan kemudian diuapkan menggunakan evaporator pada suhu 40°C untuk mendapatkan ekstrak kental lalu di waterbath pada suhu 50°C untuk mendapatkan ekstrak yang benar benar kental. Ekstrak kental tersebut kemudian

ditimbang untuk menentukan persentase rendemen. Selanjutnya, ekstrak disimpan dalam vial, lalu vial disimpan di dalam desikator dengan tujuan menjaga kestabilan fisik dan kelembaban ekstrak agar tidak mudah rusak. Dari proses ini, diperoleh ekstrak kental *Lycopodiella cernua* berwarna hijau kecoklatan, dengan hasil rendemen sebesar 49,29%. Rendemen yang diperoleh dalam penelitian ini sebesar 49,29%, yang termasuk kategori tinggi jika dibandingkan dengan berbagai hasil penelitian sebelumnya. Secara umum, nilai rendemen ekstrak tanaman berada dalam kisaran 5–30%, tergantung pada jenis bahan, metode ekstraksi, dan pelarut yang digunakan. Misalnya, penelitian oleh Ningsih *et al.* (2020) melaporkan rendemen ekstrak rimpang kunyit sebesar 22–23%, sedangkan Maynita *et al.* (2024) mencatat rendemen sebesar 39% dari ekstrak etanol daun genitri. Dengan demikian, rendemen sebesar 49,29% dalam penelitian ini dapat dikategorikan sangat baik dan menunjukkan bahwa metode serta pelarut yang digunakan mampu mengekstraksi senyawa bioaktif secara efisien. Rendemen tinggi ini juga mengindikasikan bahwa bahan simplisia mengandung senyawa larut dalam jumlah besar, atau bahwa parameter ekstraksi seperti suhu, waktu, dan rasio pelarut sangat optimal. Rincian perhitungan rendemen dapat dilihat pada bagian Lampiran B.

4.3 Hasil uji LC-HRMS

Analisis profil metabolit sekunder telah dilakukan di Laboratorium *Corpora Science*, Yogyakarta, menggunakan instrumen LC-HRMS (*Liquid Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*). Berdasarkan hasil analisis tersebut, teridentifikasi sebanyak 593 senyawa metabolit sekunder dari sampel yang diuji. Teknik LC-HRMS memungkinkan pemisahan dan deteksi senyawa dengan tingkat akurasi dan resolusi yang tinggi, sehingga dapat mengungkap keberadaan metabolit dalam jumlah yang lebih banyak dan detail dibandingkan metode analisis konvensional (Géhin, 2021).

Jika dibandingkan dengan penelitian sebelumnya yang menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) yang dilakukan oleh Porquis pada tahun 2018 hanya memunculkan 2 senyawa yaitu saponin dan terpenoid, hasil yang diperoleh dari LC-

HRMS menunjukkan peningkatan signifikan dalam jumlah dan keragaman senyawa yang terdeteksi. Pada metode KLT, identifikasi metabolit terbatas pada senyawa yang memiliki kemampuan visualisasi baik pada plat kromatografi, sehingga beberapa senyawa tidak dapat terdeteksi. Dalam penelitian ini, pendekatan *LC-HRMS* memberikan informasi yang lebih lengkap mengenai komposisi kimia sampel.

Dengan demikian, penggunaan *LC-HRMS* memberikan kontribusi penting dalam memperluas pemahaman terhadap profil metabolit sekunder pada sampel yang diteliti. Data yang dihasilkan lebih informatif dan dapat digunakan sebagai dasar untuk studi lebih lanjut terkait potensi biologis atau farmakologis senyawa-senyawa tersebut serta melakukan analisis uji *In Silico* terhadap senyawa tersebut.

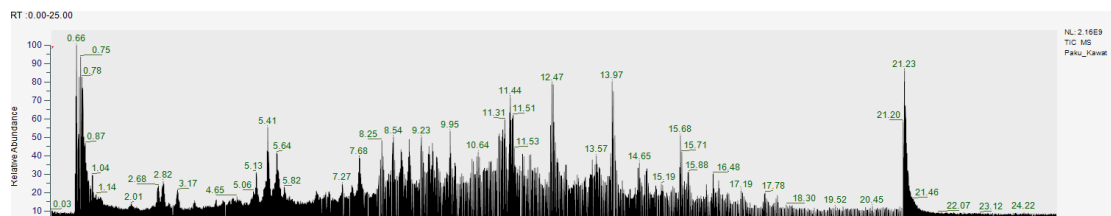
Untuk prinsip kerjanya pada tahap awal, senyawa dalam sampel dipisahkan menggunakan kromatografi cair (LC) berdasarkan perbedaan sifat kimianya, seperti kepolaran atau kelarutan, sehingga setiap senyawa akan keluar dari kolom pada waktu yang berbeda (*retensi time*) (Aydoğan, 2020). Senyawa-senyawa yang telah terpisah ini kemudian masuk ke dalam spektrometer massa resolusi tinggi (HRMS), di mana senyawa diionisasi dan dianalisis berdasarkan rasio massa terhadap muatannya (m/z) dengan akurasi sangat tinggi (Salem, 2020). HRMS mampu membedakan senyawa dengan massa yang sangat mirip, bahkan dengan perbedaan hanya beberapa satuan massa kecil (ppm), sehingga memungkinkan identifikasi struktur kimia senyawa secara akurat (Luo, 2023). Kombinasi LC dan HRMS sangat efektif untuk analisis senyawa alami dalam ekstrak tumbuhan karena mampu memberikan data yang lengkap, mulai dari pemisahan, deteksi, hingga identifikasi senyawa secara cepat dan presisi (Queiroz, 2024).

Berdasarkan hasil analisis *LC-HRMS* terhadap ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*, diperoleh beberapa peak tertinggi yang menunjukkan keberadaan senyawa dominan dalam ekstrak tersebut. Analisis ini bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa metabolit sekunder yang berpotensi memiliki aktivitas farmakologis, khususnya sebagai agen antiinflamasi dan antioksidan, sejalan dengan uji biologis yang telah dilakukan, yaitu inhibisi enzim *COX* dan aktivitas peredaman radikal DPPH. Senyawa-senyawa yang berhasil diidentifikasi pada puncak tertinggi meliputi,

2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-6-yl)-3-methylbutyl 3-methylbut-2-enoate yang muncul pada waktu retensi 5.42 yang dapat dilihat pada gambar 4.1. Senyawa ini merupakan turunan dari kumarin, yang dikenal sebagai metabolit sekunder dengan beragam aktivitas biologis, terutama antiinflamasi dan antioksidan. Struktur senyawa ini menyerupai analog kumarin alami seperti *angelol K*, yang telah dilaporkan memiliki aktivitas penghambatan enzim *COX-2* serta mampu menekan ekspresi mediator inflamasi seperti PGE_2 dan $\text{TNF-}\alpha$ melalui jalur $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (Silva, 2020). Selain itu, keberadaan gugus fenolik dan metoksi pada struktur kumarin tersebut memperkuat potensi aktivitas antioksidan melalui mekanisme donasi elektron untuk menetralkan radikal bebas (Wahab, 2020). Oleh karena itu, keberadaan senyawa turunan kumarin ini dalam ekstrak *L. cernua* diduga berperan dalam aktivitas antiinflamasi dan antioksidan yang diamati.

Selanjutnya ada *2,4-Difluororesorcinol* yang muncul pada waktu retensi 0.66, dimana Senyawa ini merupakan turunan dari *resorsinol* (*1,3-dihidroksibenzena*) yang dimodifikasi dengan dua substituen fluorin. Meskipun *resorsinol* dikenal memiliki aktivitas antioksidan karena kehadiran gugus fenolik, tidak ditemukan data literatur yang secara spesifik membuktikan aktivitas biologis *2,4-difluororesorcinol* sebagai agen antiinflamasi maupun antioksidan. Oleh karena itu, kontribusinya terhadap aktivitas biologis ekstrak belum dapat dikonfirmasi secara ilmiah.

Lalu ada juga *(E)-2-Decenamide* yang muncul pada waktu retensi 0.75 yang dapat dilihat pada gambar 4.1 dimana senyawa ini tergolong dalam kelompok *alkilamida*, yaitu senyawa amida dari asam lemak tak jenuh rantai sedang. *Alkilamida* banyak ditemukan pada tanaman seperti *Echinacea purpurea*, dan telah terbukti memiliki aktivitas imunomodulator dan antiinflamasi, termasuk kemampuan menurunkan ekspresi $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan menghambat produksi PGE_2 melalui



Gambar 4. 1 Kromatogram analisis LC-HRMS

penghambatan enzim *COX-2* (Raso, 2020). Selain itu, senyawa alkilamida juga memiliki potensi antioksidan melalui aktivitas scavenging terhadap radikal bebas (Rios, 2018). Oleh karena itu, keberadaan (E)-2-decenamide dalam ekstrak ini sangat mungkin memberikan kontribusi terhadap efek farmakologis yang teramati.

Berdasarkan hasil analisis LC-HRMS terhadap ekstrak etanol *Lycopodiella cernua*, berhasil diidentifikasi beberapa senyawa dominan yang muncul pada puncak tertinggi, yaitu *2,3-dihydroxy-1-(7-methoxy-2-oxo-2H-chromen-6-yl)-3-methylbutyl 3-methylbut-2-enoate*, *2,4-difluororesorcinol*, dan *(E)-2-decenamide*. Dari ketiga senyawa tersebut, dua di antaranya, yakni turunan kumarin dan alkilamida, menunjukkan potensi kuat sebagai kandidat agen antiinflamasi dan antioksidan berdasarkan karakteristik struktur kimia serta dukungan literatur ilmiah. Senyawa turunan kumarin berperan melalui mekanisme penghambatan enzim *COX* dan donasi elektron sebagai antioksidan, sedangkan alkilamida berfungsi menurunkan mediator inflamasi dan menetralkan radikal bebas. Temuan ini mendukung hasil uji biologis yang menunjukkan adanya aktivitas antiinflamasi dan antioksidan pada ekstrak *L. cernua*, serta membuka peluang pengembangan lebih lanjut sebagai sumber senyawa bioaktif alami.

4.4 Hasil uji WAY2DRUG/Pass Online

PASS Online (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) adalah sebuah platform daring yang menyediakan layanan prediksi aktivitas biologis senyawa berbasis struktur kimianya secara gratis. Sistem ini dirancang untuk mengidentifikasi berbagai jenis aktivitas biologis lebih dari 4000 jenis mulai dari efek farmakodinamik utama hingga mekanisme aksi di tingkat molekul. Dengan tingkat akurasi yang mencapai sekitar 95%, PASS Online memanfaatkan algoritma berbasis data besar yang terdiri dari informasi struktur molekul dan klasifikasi aktivitas (aktif atau tidak aktif). Berkat pemanfaatan database yang mencakup ratusan ribu senyawa, platform ini mampu menghasilkan prediksi berbasis probabilitas mengenai potensi aktivitas suatu senyawa, sehingga dapat digunakan untuk menyaring dan memprioritaskan calon

senyawa aktif sebelum dilakukan uji biologis eksperimental lebih lanjut (Habibyar et al, 2024).

Dalam penelitian ini, senyawa-senyawa hasil identifikasi terlebih dahulu dicari *SMILES* (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) setiap senyawa hasil WAY2DRUG pada laman <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Notasi *SMILES* (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) ini selanjutnya digunakan sebagai input dalam perangkat uji ADMET untuk memprediksi karakteristik farmakokinetik dan toksikologi dari masing-masing senyawa. Daftar *SMILES* (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) senyawa yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.1.

Kriteria Dalam studi ini dinyatakan dalam dua parameter utama, yaitu P_a (*Probability to be Active*) dan P_i (*Probability to be Inactive*). Nilai P_a menunjukkan seberapa besar kemungkinan suatu senyawa akan memiliki aktivitas tertentu, sedangkan P_i menggambarkan kemungkinan senyawa tersebut tidak aktif terhadap aktivitas tersebut. Jika P_a lebih besar daripada P_i , maka senyawa dianggap berpotensi aktif. Nilai P_a tidak selalu berkebalikan dengan P_i ($P_a + P_i \neq 1$), karena keduanya dihitung secara independen berdasarkan data pelatihan struktur-aktivitas yang sangat besar. Interpretasi nilai P_a umumnya dibagi menjadi tiga kategori: $P_a > 0,7$ menunjukkan kemungkinan besar aktivitas tersebut akan terkonfirmasi secara eksperimen; P_a antara 0,5–0,7 menunjukkan potensi sedang; dan $P_a < 0,5$ namun tetap lebih besar dari P_i mengindikasikan kemungkinan aktivitas rendah namun berpeluang sebagai struktur baru. Berdasarkan dokumentasi dan publikasi sebelumnya, nilai P_a tertinggi yang umum ditemukan berkisar antara 0,8 hingga 0,95, yang mencerminkan tingkat kemiripan struktur senyawa dengan senyawa aktif yang telah diketahui. Oleh karena itu, prediksi menggunakan PASS Online menjadi salah satu pendekatan awal yang penting dalam mengevaluasi potensi farmakologis suatu senyawa sebelum dilakukan pengujian secara *in vitro* atau *in vivo*. (Kalpesh Patil, 2015) (Poroikov, 2019).

Pada uji ini data yang didapatkan dari hasil *LC-HRMS* sebanyak 593 senyawa, dimana hasil ini dianalisis menggunakan Pass Online dan dicari nilai P_a sebagai *antiinflammatory agent* dengan memasukkan nilai *SMILES* (*Simplified Molecular Input*

Line Entry System) dari setiap senyawa yang akan dianalisis yang dapat dilihat dari tabel 4.1. Berdasarkan hasil analisis menggunakan platform PASS Online, diperoleh daftar 10 senyawa yang memiliki nilai P_a (*probability of activity*) lebih besar dari 0,7 terhadap aktivitas antiinflamasi. Nilai $P_a > 0,7$ menunjukkan tingkat kepercayaan yang tinggi bahwa senyawa tersebut berpotensi memiliki efek antiinflamasi yang signifikan.

Pada Tabel 4.1 menunjukkan bahwa senyawa *alpha-Tocotrienol* memiliki nilai P_a tertinggi sebesar 0,866, diikuti oleh *ursolic acid* dengan nilai P_a sebesar 0,864. Nilai P_a yang mendekati 1 mengindikasikan bahwa struktur senyawa tersebut sangat mirip dengan senyawa-senyawa yang diketahui memiliki aktivitas antiinflamasi, sehingga prediksinya dapat dianggap kuat dan valid untuk diprioritaskan dalam studi lanjutan. Senyawa lainnya yang juga memiliki potensi kuat termasuk *15-HETE-G* (0,817) dan *(-)-Isopiperitenone* (0,795). Beberapa senyawa lainnya seperti *2-Arachidonoylglycerol* (2-AG) ($P_a = 0,736$), *Ganodecalone B* ($P_a = 0,763$), *punicesterone B* ($P_a = 0,766$), dan *Limonene-1,2-diol* ($P_a = 0,724$), juga menunjukkan potensi aktivitas, meskipun dengan tingkat kepercayaan yang sedikit lebih rendah dibandingkan kandidat utama. Senyawa dengan nilai P_a yang mendekati batas minimal (0,702–0,718), seperti *3-Deoxyvitamin D3* dan turunan vitamin D lainnya, tetap dipertimbangkan sebagai kandidat, namun interpretasi terhadap potensi aktivitasnya perlu lebih berhati-hati karena nilai P_a relatif mendekati ambang batas prediksi. Secara keseluruhan, nilai $P_a > 0,7$ pada senyawa-senyawa tersebut menunjukkan bahwa senyawa memiliki kemungkinan besar untuk bersifat aktif sebagai agen antiinflamasi.

Tabel 4. 1 nilai $P_a > 0,7$ sebagai *antiinflammatory* dan *SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System)*

No	Nama Senyawa	$P_a > 0,7$	<i>SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System)</i>
1	<i>2-Arachidonoylglycerol</i> (2-AG)	0,736	<chem>CCCCC/C=C/C/C=C/C/C=C/C=C/C\CCCC(=O)OC(CO)CO</chem>
2	<i>(22E,24E)-1alpha,25-dihydroxy-26,27-</i>	0,718	<chem>CCCC(CCC)/(C=C/C=C/[C@@H](C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1</chem>

No	Nama Senyawa	Pa >0,7	SMILES(Simplified Molecular Input Line Entry System)
	<i>diethyl-22,23,24,24a-tetradehydro-24a-homovitamin D3</i>		<chem>(CCC/C2=C\C=C/C/3\C[C@H])(C[C@@H](C3=C)O)O)C)O</chem>
3	<i>15-HETE-G</i>	0,817	<chem>CCCCC[C@@H](/C=C/C=C\C/C=C\C/C=C\CCCC(=O)OC(CO)CO)O</chem>
4	<i>3-Deoxyvitamin D3</i>	0,702	<chem>C[C@H](CCCC(C)C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CCC/C2=C\C=C/C/3\CCCCC3=C)C</chem>
5	<i>alpha-Tocotrienol</i>	0,866	<chem>CC1=C(C2=C(CC[C@@])(O2)(C)CC/C=C\C)/CC/C=C\C)/CCC=C(C)C)C(=C1O)C)C</chem>
6	<i>Ganodecalone B</i>	0,763	<chem>C[C@H](C/C=C/C(=O)C)[C@H]1CC[C@@]2([C@@]1(CC(=O)C3=C2CC[C@@H]4[C@@]3(CCC(=O)C4(C))C)C)C</chem>
7	<i>punicesterone B</i>	0,766	<chem>C[C@H](C[C@@H]1[C@@](OC(O1)(C)C)(C)[C@H]2CC[C@@]3([C@@2(CC[C@H]4C3=CC(=O)[C@H]5[C@]4(C[C@@H])([C@@H](C5)O)O)C)O)C(C)C</chem>
8	<i>ursolicacid</i>	0,864	<chem>C[C@@H]1CC[C@@]2(CC[C@@]C(=CC[C@H]4[C@]3(CC[C@@H]5[@]4(CC[C@@H](C5(C)C)O)C)C)[C@@H]2[C@H]1C)C(=O)O</chem>
9	<i>(-)-Isopiperitenone</i>	0,795	<chem>CC1=CC(=O)[C@H](CC1)C(=C)C</chem>
10	<i>Limonene-1,2-diol</i>	0,724	<chem>CC(=C)C1CCC(C(C1)O)(C)O</chem>

4.5 Hasil uji ADMET

Analisis ADMET (Absorpsi, Distribusi, Metabolisme, Ekskresi, dan Toksisitas) merupakan metode prediktif berbasis *In Silico* yang digunakan untuk mengevaluasi perilaku farmakokinetik serta potensi toksisitas suatu senyawa di dalam tubuh manusia. Evaluasi ini penting dilakukan untuk memastikan bahwa senyawa kandidat memiliki profil keamanan yang memadai dan tidak menimbulkan efek toksik yang merugikan.

Pengujian ADMET dilakukan dengan cara memasukkan notasi *SMILES* (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) dari setiap senyawa ke dalam laman *pkCSM* yang dapat diakses melalui tautan <https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsml/>. Sebelum melakukan pengujian tersebut, tahap pertama dilakukan evaluasi *Lipinski*, evaluasi terhadap kepatuhan senyawa terhadap aturan *Lipinski* dilakukan melalui situs <https://toxnew.charite.de/>. Situs ini menyediakan data terkait parameter-parameter penting yang digunakan untuk menilai kelayakan suatu senyawa sebagai kandidat obat. Aturan *Lipinski* sendiri merupakan seperangkat lima kriteria farmakokimia yang harus dipenuhi oleh suatu senyawa agar dianggap memiliki potensi sebagai obat oral yang baik. Hasil analisis terhadap kelima kriteria tersebut pada masing-masing senyawa ditampilkan dalam Tabel 4.2.

UNIVERSITAS
MA CHUNG

Tabel 4. 2 Tabel Hasil Uji *Lipinski*

No	Nama Senyawa	BM	Log P	H- donor	H- akseptor
1	2-Arachidonoylglycerol (2-AG)	378.553	5,0285	2	4
2	(22E,24E)-1alpha,25-dihydroxy-26,27-diethyl-22,23,24,24a-tetradecahydro-24a-homovitamin D3	482.74	7.21	3	3
3	15-HETE-G	394.552	3,9993	3	5
4	3-Deoxyvitamin D3	368,64	8,65	0	0
5	alpha-Tocotrienol	424.66	8,60056	1	2
6	Ganodecalone B	438.652	6,6552	0	3
7	punicesterone B	518.735	4,7834	3	6
8	ursolicacid	456.711	7,0895	2	3
9	(-)-Isopiperitenone	150.221	2,4879	0	1
10	Limonene-1,2-diol	170.252	1,4745	2	2

*Keterangan : yang yang **ditebalkan** semua masuk kriteria uji *Lipinski*

Aturan *Lipinski* (*Rule of Five*) merupakan pedoman dalam penapisan sifat “drug-like” suatu molekul obat oral (Walid *et al.*, 2025). Molekul obat yang terserap baik biasanya memiliki empat sifat fisikokimia dalam batas tertentu meliputi berat molekul ≤ 500 Da, logaritma koefisien partisi oktanol-air ($\log P$) ≤ 5 , jumlah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , dan jumlah akseptor ikatan hidrogen ≤ 10 (Walid *et al.*, 2025).

Batasan ini didasarkan atas pengamatan bahwa mayoritas obat oral efektif menempati rentang nilai yang relatif sempit, apabila senyawa melanggar dua atau lebih kriteria tersebut, penyerapan obat cenderung buruk (Nurjannah, 2024). Sebaliknya, senyawa yang memiliki satu pelanggaran masih dianggap berpotensi sebagai calon obat oral (Nurjannah, 2024) terutama jika senyawa memiliki strategi khusus seperti struktur siklik, transporter aktif, atau formulasi yang mendukung. Contohnya, siklosporin A memiliki berat molekul >1.000 Da dan melanggar beberapa kriteria,

namun tetap efektif sebagai obat oral karena struktur tertutup dan adanya mekanisme transport aktif di usus. Dengan demikian, kriteria *Lipinski* digunakan untuk memprediksi kelayakan bioavailabilitas oral senyawa berdasarkan batas-batas empiris tersebut (Nurjannah, 2024). Berat molekul yang melebihi 500 Dalton cenderung memperlambat penetrasi membran sel secara pasif, menyebabkan rendahnya absorpsi di saluran cerna dan dapat menghambat penyerapan karena sulit menembus membran sel. Selain itu, senyawa dengan $\log P > 5$ menunjukkan lipofilisitas tinggi, yang meskipun dapat meningkatkan penetrasi membran, akan menurunkan kelarutan dalam air dan berisiko menyebabkan akumulasi di jaringan serta metabolisme yang cepat melalui enzim hati seperti CYP3A4 (Ranjan & Dubey, 2023). Jumlah donor dan akseptor hidrogen yang tinggi ($HBD > 5$ atau $HBA > 10$) membuat senyawa menjadi lebih polar, sehingga menghambat permeabilitas membran sel dan menyebabkan penyerapan yang buruk dan menyulitkan senyawa untuk melewati membran lipid secara pasif (Ranjan, 2023).

Berdasarkan data dalam tabel 4.2, ditemukan bahwa tiga senyawa (no.3 *15-HETE-G*, no.10 *(-)-Isopiperitenone*, dan no.11 *Limonene-1,2-diol*) memenuhi semua empat kriteria *Lipinski* (0 pelanggaran). Misalnya, *15-HETE-G* (BM = 394,55 Da; $\log P = 3,999$; donor H = 3; akseptor H = 5) semuanya berada di bawah batas maksimum. Kondisi ini menunjukkan kepatuhan penuh terhadap pedoman *Lipinski* dan mengindikasikan potensi penyerapan oral yang baik (Fahmi, 2023). Demikian pula, *(-)-Isopiperitenone* (BM 150,22; $\log P$ 2,488; donor 0; akseptor 1), dan *Limonene-1,2-diol* (BM 170,25; $\log P$ 1,475; donor 2; akseptor 2) semuanya memenuhi batas *Lipinski* (BM ≤ 500 , $\log P \leq 5$, donor ≤ 5 , akseptor ≤ 10) (Fahmi, 2023). Ketiga senyawa ini tidak memiliki pelanggaran sama sekali, sehingga secara teori mereka lebih mendekati profil obat-oral “*ideal*” dengan kemungkinan bioavailabilitas yang baik (Fahmi, 2023).

Sebaliknya, delapan senyawa lainnya masing-masing memiliki satu pelanggaran terhadap kriteria *Lipinski*. Enam senyawa (no.1 2-Arachidonoylglycerol, no.2 (22E,24E)-vitamin D3, no.6 3-Deoxyvitamin D3, no.7 α -Tocotrienol, no.8 Ganodecalone B, no.10 Ursolic acid) melanggar batas lipofilisitas $\log P$ karena nilai $\log P$ -nya melebihi 5 (misal $\log P$ 2-Arachidonoylglycerol = 5.0285; $\log P$ Vitamin D3

= 7.21; $\log P$ α -Tocotrienol \approx 8.60; dst.) (Walid et al., 2025). Satu senyawa lain, punicesterone B (no.9), melanggar batas berat molekul karena BM = 518,74 Da (> 500 Da). Perlu dicatat bahwa masing-masing senyawa ini tetap memenuhi kriteria lainnya (jumlah donor H dan akseptor H dalam batas), sehingga jumlah pelanggaran per senyawa adalah tepat satu. Misalnya, 2-Arachidonoylglycerol memiliki $\log P$ sedikit di atas ambang (5.0285), tetapi BM = 378,55 Da, donor H = 2, dan akseptor H = 4 sesuai batas, sehingga total pelanggaran = 1 (pada $\log P$) (Walid et al., 2025). Punicesterone B hanya melanggar batas BM, sedangkan limit $\log P$ (4.783) dan jumlah ikatan hidrogen sudah sesuai.

Karena aturan *Lipinski* membolehkan maksimal satu pelanggaran untuk obat oral (Nurjannah, 2024), semua senyawa dalam tabel 4.2 ini secara teknis masih dalam kategori “*drug-like*”. Artinya, hanya satu kriteria yang dilanggar, sehingga senyawa-senyawa tersebut tidak sepenuhnya diabaikan dalam pengembangan obat. Namun, perlu diperhatikan bahwa jika suatu senyawa melanggar lebih dari satu kriteria (misalnya berat molekul tinggi dan $\log P$ tinggi), prediksi penyerapan menjadi sangat buruk (Nurjannah, 2024). Pada kasus ini tidak ada senyawa yang melanggar dua kriteria sekaligus. Dengan demikian, analisis *Lipinski* menunjukkan bahwa sebagian besar senyawa dalam tabel ini masih sesuai dengan pedoman “*Rule of Five*” (senyawa yang melanggar paling banyak satu kriteria), yang mendukung potensi bioavailabilitas oral senyawa. Akan tetapi pada penelitian kali ini yang dilakukan uji *pkCSM* hanya senyawa yang memenuhi semua syarat *Lipinski* yaitu senyawa 15-HETE-G, (-)-Isopiperitenone, dan Limonene-1,2-diol, sehingga senyawa yang melekat pada kriteria tersebut umumnya dianggap memiliki bioavailabilitas oral yang lebih baik. Senyawa senyawa tersebut kemudian juga dilihat profil farmakokinetika dan prediksi toksisitas pada website *pkCSM*. Kemudian hasil uji *pkCSM* disajikan pada tabel 4.3.

Tabel 4. 3 Hasil uji pkCSM

Kategori	Satuan	Syarat	1	2	3
		> -4.0			
Kelarutan pada air	log mol/L	(semakin tinggi, semakin larut)	-4.973	-2.333	-1.297
Permeabilitas CaCO ₂	log Papp 10 ⁻⁶ cm/s	> 0.90 (Papp > 10 ⁻⁶ cm/s = permeabel)	0.713	1.316	1.58
Absorpsi intestinal	% Absorpsi	> 80% (baik diserap di usus)	92.592	97.27	93.97
Permeabilitas kulit	log Kp	< -2.5 (nilai negatif kecil = cepat menembus)	-2.754	-2.109	-3.569
Substrat P-glycoprotein	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	Yes	No	No
Inhibitor P-glycoprotein I	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	Yes	No	No
Inhibitor P-glycoprotein II	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	Yes	No	No
		0.0-1.0			
VD _{ss}	log L/kg	(distribusi moderat)	-0.786	0.182	0.035
		> 0.1 (lebih banyak obat bebas aktif)			
Fraksi tidak terikat	Fu		0.193	0.533	0.639

Kategori	Satuan	Syarat	1	2	3
Permeabilitas sawar darah otak	log BB	> 0.3 (baik untuk CNS) / < -1 = buruk	-1.144	0.585	-0.177
Permeabilitas CNS	log PS	> -2.0 (lebih mudah menembus CNS)	-3.509	-2.472	-3.049
Substrat CYP2D6	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Substrat CYP3A4	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor CYP1A2	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor CYP2C19	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor CYP2C9	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor CYP2D6	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor CYP3A4	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Total clearance	log mg/min/kg	Moderate: $\sim 0-1$	2.341	0.223	1.293
Substrat renal OCT2	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Toksistas AMES	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No

Kategori	Satuan	Syarat	1	2	3
Dosis maksimum (MRTD)	log mg/kg/hari	> 0.0 (semakin tinggi, semakin aman)	0.256	0.8	1.134
Inhibitor hERG I	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Inhibitor hERG II	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Toksisitas akut oral	mol/kg	> 2.0 (semakin besar, semakin aman)	1.549	1.855	1.605
Toksisitas kronis oral	log mg/kg bw/day	> 0.5 (semakin besar, semakin aman)	2.807	1.988	2.529
Hepatotoksisitas	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	No	No	No
Sensitisasi kulit	Kategorikal (Ya/Tidak)	Tidak	Yes	Yes	Yes
Toksisitas T. pyriformis	log ug/L	> 0.5 (semakin besar, semakin tidak toksik)	0.292	0.367	-0.786
Toksisitas Minnow (LC50)	log mM	> 0.5 (lebih besar = lebih aman)	-0.262	1.546	2.485

*Keterangan: 1(*15-HETE-G*), 2(*(-)-Isopiperitenone*), dan 3(*Limonene-1,2-diol*)

Beberapa parameter ADMET dianggap krusial dalam penemuan obat karena sangat menentukan keberhasilan dan keamanan. Penyerapan obat terutama dipengaruhi oleh kelarutan air dan permeabilitas usus (misalnya Caco-2). Obat harus cukup larut agar terserap optimal. Metabolisme lewat enzim CYP (terutama CYP2D6 dan

CYP3A4) juga penting, karena interaksi pada jalur ini dapat mempercepat atau menghambat eliminasi obat. Selain itu, indikator keamanan utama seperti toksisitas mutagenik (tes Ames) dan efek kardial (hERG) sering diwaspadai. Misalnya, hambatan saluran hERG banyak menyebabkan obat ditarik dari peredaran, dan hasil positif tes Ames menunjukkan potensi karsinogenik tinggi (Lab, 2025).

Dari tabel 4.3 diatas untuk absorpsi oral (Kelarutan, Permeabilitas dan Absorpsi Intestinal), Kelarutan air (*water solubility, logS*) menunjukkan kemampuan senyawa larut dalam air pada 25°C, yang berpengaruh kuat terhadap bioavailabilitas sediaan oral (Pires, 2015). Nilai logS yang lebih tinggi (kurang negatif) mencerminkan senyawa yang lebih mudah larut dalam air. Sebaliknya, nilai logS yang rendah (sangat negatif) mengindikasikan kelarutan buruk dan potensi absorpsi rendah. Hasil *pkCSM* menunjukkan bahwa *15-HETE-G* memiliki nilai logS sangat rendah (sangat negatif), menunjukkan kelarutan air yang minimal, sehingga diperkirakan absorpsi ususnya terbatas. Sebaliknya, *(-)-Isopiperitenone*, dan *Limonene-1,2-diol* memiliki logS relatif lebih tinggi (kurang negatif), menandakan kelarutan sedang hingga baik. Hal ini mengindikasikan bahwa ketiga senyawa terakhir kemungkinan larut lebih baik dalam cairan tubuh dan berpotensi menunjukkan absorpsi usus yang lebih tinggi dibanding *15-HETE-G* (Lab, 2025). Permeabilitas sel Caco-2 (*Caco-2 permeability*) adalah model *In vitro* yang menggambarkan permeabilitas usus manusia terhadap senyawa dan ukuran kemampuan menembus lapisan sel usus (model Caco-2) untuk memprediksi seberapa baik obat diserap lewat saluran pencernaan, diukur sebagai logaritma koefisien permeabilitas (log Papp) (Lab, 2025). Pada model *pkCSM*, nilai log Papp >0.90 (setara Papp > 8×10^{-6} cm/s) dianggap tinggi (Lab, 2025). Dalam konteks ini, *15-HETE-G* menunjukkan nilai log Papp jauh di bawah 0.90, mempertegas bahwa permeabilitas ususnya rendah. Sebaliknya *(-)-Isopiperitenone* dan *Limonene-1,2-diol* menampilkan nilai sedang. Persentase absorpsi intestinal manusia yang diprediksi (*Intestinal Absorption*) menunjukkan bagian senyawa yang diasorpsi melalui dinding usus (Pires, 2015). Senyawa dengan absorpsi <30% dianggap kurang terserap atau buruk (Lab, 2025). Hasil *pkCSM* memperlihatkan bahwa *15-HETE-G* memiliki absorpsi intestinal jauh di bawah 30%, menegaskan absorpsi oral yang buruk.

Sebaliknya, *(-)-Isopiperitenone* dan *Limonene-1,2-diol* menunjukkan absorpsi tinggi (>30%), selaras dengan kelarutan dan permeabilitasnya yang lebih baik. Kombinasi data ini mengindikasikan bahwa *15-HETE-G* berpotensi memiliki bioavailabilitas oral paling rendah di antara ketiga senyawa. Permeabilitas Kulit: Parameter logKp (*skin permeability*) mengukur kemampuan menembusnya senyawa melalui kulit (Lab, 2025). Nilai logKp lebih tinggi dari -2,5 menunjukkan permeabilitas kulit yang relatif rendah (Lab, 2025). Ketiga senyawa di uji (termasuk *Limonene-1,2-diol*) memiliki nilai logKp di atas -2,5, mengindikasikan permeabilitas kulit rendah. Dengan demikian, ketiga senyawa diperkirakan tidak mudah menembus kulit, yang wajar karena sifat kimianya yang relatif polar (khususnya *Limonene-1,2-diol*) atau berukuran besar (*15-HETE-G*). Parameter ini kurang berpengaruh signifikan pada administrasi oral, tetapi penting jika mempertimbangkan rute topikal. Distribusi (*P-glycoprotein* dan Sawar Darah-Otak): P-glycoprotein (P-gp) adalah protein pembawa (*ATP-binding cassette*) yang berfungsi mengekstrusi xenobiotik keluar sel, terutama di usus dan sawar darah-otak (Lab, 2025). Senyawa yang merupakan substrat P-gp akan diekskresikan kembali ke lumen usus atau dicegah memasuki sistem saraf pusat, sehingga mengurangi bioavailabilitas dan penetrasi otak. Menurut *pkCSM*, *15-HETE-G* diprediksi sebagai substrat P-gp, yang selanjutnya menurunkan efek absorpsi usus (dan mencegah akumulasi berlebih di otak). Sebaliknya, *(-)-Isopiperitenone* dan *Limonene-1,2-diol* tidak diprediksi sebagai substrat P-gp. Adanya sifat inhibitor P-gp (tipe I atau II) juga penting, inhibitor P-gp dapat meningkatkan konsentrasi obat lain dengan menghambat kerja P-gp (Lab, 2025). Namun, ketiga senyawa pada tabel tidak menunjukkan sifat penghambat P-gp utama (hasil negatif), sehingga risiko interaksi melalui mekanisme ini relatif rendah. Kemampuan melintasi sawar darah-otak (BBB permeability, logBB) menentukan distribusi senyawa ke sistem saraf pusat (Lab, 2025). Senyawa dengan logBB >0.3 mudah menembus sawar darah-otak, sedangkan logBB <-1 sangat miskin penetrasinya (Lab, 2025). Hasil prediksi *pkCSM* menunjukkan *(-)-Isopiperitenone* memiliki nilai logBB mendekati 0 (fasih melewati BBB sedang), sementara *15-HETE-G* dan *Limonene-1,2-diol* memiliki logBB di bawah -1, menunjukkan penetrasi otak sangat rendah. Dengan demikian, hanya *(-)-Isopiperitenone* yang berpotensi mencapai

konsentrasi efektif di otak, sedangkan *15-HETE-G* dan *Limonene-1,2-diol* terhalang oleh BBB. Metabolisme (Enzim *CYP450*): Enzim *sitokrom P450* (CYP) adalah jalur utama detoksifikasi dan metabolisme obat di hati (Lab, 2025) yang mampu berperan sebagai substrat CYP (seperti *CYP2D6* atau *CYP3A4*) berarti senyawa tersebut dimetabolisme oleh isoform tersebut (Pires, 2015). Sebaliknya, jika senyawa menjadi inhibitor CYP (konsentrasi $IC_{50} < 10 \mu M$) (Lab, 2025), maka ia dapat mengganggu metabolisme obat lain dan menimbulkan interaksi obat. Dari hasil pkCSM, *15-HETE-G* diprediksi sebagai substrat *CYP3A4*, menandakan metabolisme utamanya melalui jalur ini, namun tidak menghambat isoform utama manapun (Lab, 2025).

Senyawa selanjutnya yaitu, *(-)-Isopiperitenone* dan *Limonene-1,2-diol* tampaknya tidak menghambat enzim CYP utama dan tidak merupakan substrat spesifik isoform CYP utama. Sementara *15-HETE-G*, *(-)-Isopiperitenone*, dan *Limonene-1,2-diol* cenderung memiliki efek minimal pada jalur metabolik CYP utama. Ekskresi (*Total Clearance*): *Total clearance* (CL_{tot}) mencerminkan laju pembuangan obat dari tubuh (gabungan eliminasi renal dan hepatic) (Lab, 2025). Nilai yang diprediksi diberikan sebagai logaritma (ml/min/kg) (Lab, 2025).

Clearing tinggi berarti obat cepat dieliminasi (paruh waktu pendek), sedangkan *clearance* rendah menunjukkan obat bertahan lama. Dari data pkCSM, *Limonene-1,2-diol* memiliki log CL_{tot} tertinggi dibanding yang lain (pembuangan cepat, kemungkinan paruh waktu pendek), sedangkan *15-HETE-G* memiliki nilai terendah (eliminasi lambat). *(-)-Isopiperitenone* menunjukkan *clearance* sedang. Interpretasi ini menandakan bahwa *Limonene-1,2-diol* kurang akumulatif dan dapat dikeluarkan lebih cepat, sedangkan *15-HETE-G* mungkin tertahan lebih lama dalam tubuh dan memerlukan pemantauan hati/erata dosisi yang tepat. Toksisitas: Uji toksisitas meliputi beberapa parameter kritis. Hasil prediksi Ames (mutagenitas) menunjukkan apakah senyawa kemungkinan bersifat mutagenik (karena menginduksi mutasi genetik) (Tang H., 2019). Semua senyawa dalam penelitian ini diprediksi negatif pada uji Ames, menandakan potensi karsinogenisitas genetik rendah. Toksisitas hepatic (hubungan dengan kerusakan hati) diestimasi berdasarkan data kejadian gangguan fungsi hati pada manusia (Lab, 2025). *15-HETE-G*, yang tercatat sebagai substrat

CYP3A4, diprediksi bersifat hepatotoksik ringan, sedangkan *Limonene-1,2-diol* tidak menunjukkan prediksi efek hepatotoksik. Hal ini berarti *15-HETE-G* memiliki risiko gangguan fungsi hati yang relatif lebih tinggi dibandingkan senyawa lain.

Untuk toksisitas akut oral (LD50), *pkCSM* memprediksi nilai LD50 tikus dimana dosis yang lebih rendah menunjukkan toksisitas akut yang lebih tinggi (Lab, 2025). Ketiga senyawa berada pada kategori toksisitas rendah hingga sedang (LD50 relatif besar). Toksisitas kronik oral (level rendah toksikasi jangka panjang) diperkirakan melalui LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*), namun secara keseluruhan semua senyawa menunjukkan LOAEL tinggi, menyiratkan margin keamanan yang memadai selama paparan jangka panjang. Pertimbangan toksisitas jantung, yaitu potensi menghambat saluran ion hERG, juga dianalisis. Inhibisi hERG dapat memicu aritmia fatal (*Long QT Syndrome*) (Lab, 2025). Pada tabel, tidak ada senyawa yang diprediksi sebagai inhibitor hERG tipe I atau II, menunjukkan risiko kardiotoxisitas minimal untuk semua senyawa. Selain itu, prediksi LC50 ikan (toksisitas akuatik) memperlihatkan bahwa *15-HETE-G* memiliki nilai logLC50 mendekati batas toksik tinggi (kurang tahan terhadap organisme akuatik), sementara ketiga senyawa lainnya tergolong rendah toksisitas akuatik (Lab, 2025).

Secara keseluruhan, parameter ADMET yang dianalisis mengindikasikan bahwa ketiga senyawa memiliki karakteristik yang cukup bervariasi. *15-HETE-G* memiliki kelarutan air dan absorpsi usus paling rendah, clearance lambat, serta potensi hepatotoksitas tertinggi. *(-)-Isopiperitenone* berada di tengah-tengah dengan profil umum yang moderat. *Limonene-1,2-diol* memiliki kelarutan dan absorpsi sedang, clearance tinggi (pengeluaran cepat), serta profil toksisitas terendah. Analisis ini membantu memperkirakan kelayakan farmakokinetik tiap senyawa untuk penggunaan terapeutik lebih lanjut, dengan kekuatan maupun keterbatasan masing-masing (mis. bioavailabilitas rendah pada *15-HETE-G* dan potensi interaksi obat pada *(-)-Isopiperitenone*). Semua interpretasi di atas didukung oleh dokumentasi *pkCSM* dan literatur farmakokinetik terkait (Pires, 2015).

4.6 Hasil Molukelar Doking

Penambatan molekuler (*molecular docking*) merupakan teknik berbasis komputer yang digunakan untuk mengevaluasi dan memprediksi interaksi antara suatu molekul kecil, seperti kandidat obat (*ligan*), dengan target biologisnya, seperti protein (reseptor). Dalam penelitian ini, teknik docking dimanfaatkan untuk memperkirakan kebutuhan energi dari suatu senyawa agar dapat berikatan dengan protein target secara efektif.

Setelah senyawa-senyawa diuji menggunakan pkCSM, langkah selanjutnya adalah mempersiapkan senyawa tersebut untuk proses docking. Senyawa-senyawa yang sebelumnya digambar menggunakan *ChemDraw Ultra 12.0* kemudian dikonversi menjadi model 3 dimensi dengan bantuan *Chem3D Pro 12.0*, lalu disimpan dalam format file .pdb (*Protein Data Bank*). Selain senyawa uji, ligand kontrol berupa *Celecoxib* juga dipersiapkan melalui proses yang sama dimulai dari penggambaran struktur 2D hingga pembuatan model 3D dan penyimpanan dalam format .pdb. Kontrol tambahan berupa asam askorbat juga disiapkan dengan metode serupa. Setelah seluruh senyawa dan kontrol siap, tahap berikutnya adalah menentukan target protein yang menjadi tempat interaksi senyawa. Pemilihan protein target dilakukan berdasarkan tinjauan literatur dari berbagai jurnal yang membahas docking pada protein yang berperan dalam aktivitas antioksidan. Informasi rinci mengenai protein diperoleh dari situs RCSB Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org>). Dari sejumlah kandidat, dipilihlah protein dengan kode 5KIR (*COX-2*) sebagai target utama dalam penelitian ini.

Proses persiapan protein dilakukan menggunakan perangkat lunak *BIOVIA Discovery Studio*, dengan menghapus molekul air dan ligand bawaan dari struktur protein untuk mencegah gangguan dalam proses docking. Protein yang telah disesuaikan ini kemudian disimpan kembali dalam format .pdb. Setelah semua komponen baik senyawa bioaktif, kontrol *Celecoxib*, maupun protein target telah dipersiapkan, proses docking dilakukan menggunakan aplikasi *PyRx*. Tahapannya dimulai dengan mengimpor protein dan mengubahnya menjadi makromolekul. Selanjutnya, senyawa-senyawa dimasukkan ke dalam Open Babel dan dilakukan

proses *minimisasi energi* untuk menurunkan energi potensialnya. Hal ini bertujuan agar interaksi antara protein dan ligand menjadi lebih stabil.

Setelah proses minimisasi dan konversi ke bentuk makromolekul selesai, *AutoDock Vina* dijalankan dengan memilih protein, senyawa uji, dan kontrol sebagai input. Hasil docking kemudian dianalisis dengan memeriksa nilai *binding affinity* dan *RMSD* (*Root Mean Square Deviation*). Nilai *RMSD* digunakan untuk menilai kesamaan posisi atom antara struktur yang diuji dengan struktur referensi dengan nilai *RMSD* yang paling kecil (idealnya 0) menunjukkan kesesuaian terbaik. Nilai *RMSD* dinyatakan dalam satuan angstrom (Å) dan mencerminkan seberapa jauh deviasi atau penyimpangan posisi ligan hasil docking dari posisi aslinya. Dalam praktiknya, *RMSD* $\leq 2,0$ Å dianggap sebagai nilai yang baik, karena menunjukkan bahwa pose ligan hasil prediksi sangat mirip dengan pose aslinya, sehingga metode docking yang digunakan dapat dikatakan valid. Nilai *RMSD* antara 2,0–3,0 Å masih dapat ditoleransi, namun tingkat akurasi mulai menurun. Sementara itu, *RMSD* $> 3,0$ Å menunjukkan bahwa hasil docking menyimpang cukup jauh dari posisi referensi, sehingga keandalan metode tersebut perlu ditinjau kembali. Sementara itu, nilai *binding affinity* menunjukkan kekuatan interaksi antara ligand dengan reseptor. Semakin negatif nilai *binding affinity*, maka afinitas ligan terhadap reseptor semakin tinggi, yang berarti energi yang dibutuhkan untuk membentuk ikatan stabil semakin rendah. Oleh karena itu, senyawa dengan nilai *binding affinity* paling rendah dianggap memiliki potensi aktivitas biologis yang lebih kuat (Kastritis, 2018).

Cyclooxygenase-2 (*COX-2*, *PTGS2*) adalah isoform enzim siklooksigenase yang inducible oleh rangsangan inflamasi (Faki, 2021). Ekspresi *COX-2* meningkat pada sel-sel inflamasi (misalnya makrofag) setelah paparan LPS dan sitokin proinflamasi, sedangkan *COX-1* bersifat konstitutif untuk fungsi fisiologis dasar (Attiq A, 2018). *COX-2* mengkatalisis konversi asam arakidonat menjadi prostaglandin (termasuk *PGE₂*) yang bertindak sebagai mediator utama inflamasi. *PGE₂* menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas vaskular serta sensitisasi ujung saraf nyeri, sehingga memicu gejala khas peradangan (kemerahan, bengkak, nyeri, demam) (Attiq A, 2018) (Faki, 2021). Dengan kata lain, *COX-2* memainkan

peran sentral dalam respons inflamasi menimbulkan rasa sakit dan demam melalui produksi prostanoid pro-inflamasi.

Karena peran utamanya dalam sintesis prostaglandin inflamasi, *COX-2* menjadi target utama terapi antiinflamasi. Inhibisi farmakologis *COX-2* terbukti efektif meredakan rasa sakit dan peradangan (Qureshi O, 2025). NSAID selektif *COX-2* (*COXib*) dirancang untuk menekan *COX-2* tanpa banyak mengganggu fungsi *COX-1* (yang melindungi mukosa lambung) (Faki, 2021). Sebagai contoh, penghambatan *COX-2* secara dramatis menurunkan produksi prostaglandin; model tikus menunjukkan bahwa penghapusan *COX-2* menurunkan ~75% total prostanoid inflamasi (*COX-1* hanya ~25%) (Attiq A, 2018). Dengan demikian menarget *COX-2* secara selektif memungkinkan pengendalian inflamasi dan nyeri secara efisien (Attiq A, 2018). Meskipun obat *COX-2* selektif seperti rofe*COXib* pernah ditarik karena efek kardiovaskular, penelitian antiinflamasi tetap mengutamakan *COX-2* sebagai sasaran kunci untuk mengembangkan obat baru dengan profil keamanan yang lebih baik

PDB *5KIR* adalah struktur kristal human *COX-2* kompleks dengan inhibitor selektif rofe*COXib* (Vioxx) (Orlando, 2016). Struktur ini dipecahkan dengan difraksi sinar-X pada resolusi 2,70 Å (Orlando, 2016), memberikan gambaran atomik rinci tentang situs pengikatan *COX-2*. Keberadaan ligand tersirkulasi (rofe*COXib*) dalam struktur memfiksasi konformasi situs aktif, termasuk kantong samping (side pocket) khas *COX-2* yang tidak ada pada *COX-1* (Rouzer, 2020). Sisi pocket ini muncul karena substitusi Ile-523 (*COX-1*) menjadi Val-523 (*COX-2*), dan memungkinkan inhibitor besar seperti rofe*COXib* mengikat dengan afinitas tinggi. Kualitas struktur *5KIR* (resolusi tinggi dan ko-kristalisasi inhibitor) menjadikannya templat yang ideal untuk simulasi docking: posisi residu aktif ditentukan dengan jelas dan kerangka kerja protein sudah dalam keadaan terikat inhibitor (Rouzer, 2020). Dengan demikian *5KIR* sering digunakan untuk validasi dan pemodelan *In Silico* senyawa penghambat *COX-2* baru. Hasil doking bisa dilihat pada tabel 4.4.

Tabel 4. 4 Hasil *Molecular Doking 5KIR*

Senyawa	<i>Binding affinity</i>
<i>15-HETE-G</i>	-6,5
<i>(-)-Isopiperitenone</i>	-5,6
<i>Limonene-1,2-diol</i>	-6,6
<i>Celecoxib</i>	-8,5

Hasil *molecular docking* pada tabel 4.4 antara senyawa uji dan protein *COX-2* (kode PDB: *5KIR*) menunjukkan variasi nilai *binding affinity* yang merefleksikan kekuatan interaksi masing-masing ligan terhadap situs aktif enzim. Senyawa kontrol positif *Celecoxib* menunjukkan nilai *binding affinity* paling rendah yaitu sebesar $-8,5$ kcal/mol, yang mengindikasikan interaksi yang sangat kuat dan stabil dengan *COX-2*. Nilai ini sejalan dengan fakta bahwa *Celecoxib* merupakan inhibitor selektif *COX-2* yang telah digunakan secara klinis sebagai obat antiinflamasi non-steroid (OAINS) selektif.

Senyawa uji lainnya menunjukkan nilai *binding affinity* yang lebih tinggi (kurang negatif) dibandingkan *Celecoxib*, namun beberapa di antaranya tetap menunjukkan potensi interaksi yang baik. *Limonene-1,2-diol* mencatat nilai sebesar $-6,6$ kcal/mol, yang juga mengindikasikan kemampuan pengikatan yang cukup baik. Selanjutnya, *15-HETE-G* menunjukkan nilai *binding affinity* sebesar $-6,5$ kcal/mol, yang tergolong sedang dalam hal stabilitas interaksi terhadap enzim target. Adapun senyawa *(-)-Isopiperitenone* memiliki nilai tertinggi, yakni $-5,6$ kcal/mol, yang mengindikasikan interaksi paling lemah di antara semua senyawa yang diuji, serta menunjukkan potensi penghambatan terhadap *COX-2* yang relatif rendah.

Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa meskipun semua senyawa uji memiliki potensi interaksi dengan *COX-2*, *Limonene-1,2-diol* menunjukkan nilai *binding affinity* yang paling mendekati *Celecoxib*, sehingga dapat dipertimbangkan sebagai kandidat inhibitor *COX-2* potensial dari sumber alami.

Tabel 4. 5 Residu Asam Amino Hasil Uji Doking

Senyawa	Residu Asam Amino	Interaksi Ikatan
<i>Celecoxib</i>	SER49, CYS47, CYS36, PRO156, PRO153, VAL155	<u>conventional hydrogen</u> <u>bond, halogen (fluorine),</u> <u>unfavorite donor-donor,</u> <u>amide-pi stacked, alkyl,</u> <u>pi-alkyl</u>
<i>15-HETE-G</i>	TYR130, PRO153, CYS47, GLN461, ASN43, ARG44, GYL45, THR60, VAL46	<u>conventional hydrogen</u> <u>bond, alkyl, pi-alkyl</u>
<i>(-)-Isopiperitenone</i>	PRO127, PHE142, TRP139, LYS137	<u>alkyl, pi-alkyl</u>
<i>Limonene-1,2-diol</i>	PHE518, LEU352, VAL523, HIS90, TYR355, ALA527	<u>conventional hydrogen</u> <u>bond, alkyl, pi-alkyl</u>

Untuk memahami interaksi ligan terhadap protein target *COX-2* secara lebih mendalam, penting untuk mengidentifikasi residu-residu asam amino yang berperan dalam aktivitas katalitik dan pengikatan ligan di dalam situs aktif enzim. Salah satu residu kunci dalam aktivitas katalitik *COX-2* adalah *Tirosin-385 (Tyr-385)*. Residu ini berfungsi sebagai pusat reaksi yang sangat penting, di mana radikal tirosil terbentuk setelah oksidasi heme dan memulai reaksi siklooksigenase dengan mengabstraksi atom hidrogen dari karbon-13 pada asam arakidonat (AA) (Smith, 2019), sehingga menghasilkan prostaglandin G_2 (PGG_2). Selain itu, Tyr-385 juga berkontribusi dalam pembentukan ikatan hidrogen dengan berbagai inhibitor, seperti gugus karbonil dari diklofenak yang berikatan dengan residu ini dalam situs aktif *COX-2* (Ahmadi, 2022).

Selain Tyr-385, terdapat dua residu penting lainnya di mulut kanal siklooksigenase, yaitu *Arginin-120 (Arg-120)* dan *Tirosin-355 (Tyr-355)*. Kedua residu ini bersama dengan *Glutamat-524 (Glu-524)* membentuk “gerbang” masuk kanal aktif

yang membantu mengarahkan gugus karboksilat dari substrat atau ligan (Uddin, 2019). Ikatan hidrogen antara Asrg-120 dan Tyr-355 dengan gugus karboksilat senyawa inhibitor, seperti NSAID klasik, sangat penting dalam menstabilkan orientasi dan posisi ligan dalam kanal enzim. Misalnya, interaksi antara diclofenac atau oksikam dengan kedua residu ini diketahui meningkatkan kekuatan pengikatan terhadap COX-2 (Ahmadi, 2022).

Residu penting lainnya adalah *Serin-530 (Ser-530)*, yang merupakan lokasi utama asetilasi oleh aspirin. Asetilasi Ser-530 diketahui menghambat akses asam arakidonat ke situs aktif COX-2, sehingga menghambat sintesis prostaglandin. Selain berperan dalam regulasi, Ser-530 juga sering terlibat dalam pengikatan berbagai inhibitor melalui ikatan hidrogen, yang menjadikannya salah satu residu penting dalam afinitas pengikatan ligan terhadap COX-2 (Uddin, 2019).

COX-2 juga memiliki kantung sisi (*side pocket*) yang tidak dimiliki oleh isoform COX-1, yang dibentuk oleh residu seperti *Valin-523 (Val-523)*, *Arginin-513 (Arg-513)*, dan *Histidin-90 (His-90)*. Perubahan struktur residu seperti penggantian Ile-523 menjadi Val-523, serta Ile-434 menjadi Val-434 dan Phe-503 menjadi Leu-503 memperlebar kantung ini. *Celecoxib* dan inhibitor selektif COX-2 lainnya memanfaatkan kantung ini untuk meningkatkan afinitas dan selektivitas pengikatan, melalui pembentukan ikatan hidrogen dengan Arg-513 dan His-90 (Musfiroh I, 2023). Selain itu, residu-residu di dalam saluran *hidrofobik* seperti *Trp-387*, *Phe-518*, *Tyr-248*, dan *Leu-352* juga berperan penting dalam menstabilkan bagian non-polar dari ligan melalui interaksi *van der Waals* dan π - π *stacking*. Interaksi ini sangat berpengaruh terhadap kestabilan kompleks protein-ligan, terutama bagi senyawa yang mengandung gugus aromatik atau alifatik besar (Musfiroh I, 2023). Adapun *Glu-524*, selain terlibat dalam gerbang kanal, juga membentuk jembatan air dengan *Arg-120* dan *Tyr-355* untuk membantu penempatan substrat pada posisi aktif (Dong, 2016). Dengan demikian, pemahaman terhadap peran masing-masing residu ini sangat penting dalam menjelaskan hasil interaksi ligan dalam studi *molecular docking*, terutama dalam mengevaluasi kekuatan dan selektivitas ikatan inhibitor terhadap enzim COX-2. Berdasarkan hasil analisis docking molekuler antara ligan uji dan protein COX-2 (kode

PDB: 5KIR) pada tabel 4.5 diketahui bahwa interaksi yang terbentuk melibatkan berbagai residu asam amino pada situs aktif enzim. Beberapa residu penting yang diketahui berperan dalam aktivitas katalitik dan pengikatan inhibitor *COX-2* antara lain *Tyr-385*, *Arg-120*, *Tyr-355*, *Ser-530*, *His-90*, *Val-523*, *Phe-518*, *Leu-352*, dan *Glu-524*.

Celecoxib merupakan obat antiinflamasi nonsteroid (NSAID) yang bekerja secara selektif menghambat enzim *Cyclooxygenase-2 (COX-2)*, enzim kunci dalam biosintesis prostaglandin yang berperan dalam proses peradangan. Berdasarkan studi molekular docking menggunakan struktur kristal *COX-2* dengan PDB ID: 5KIR, diketahui bahwa *Celecoxib* berinteraksi dengan beberapa residu penting pada situs aktif enzim. Residu-residu asam amino yang berperan penting dalam pengikatan *Celecoxib* meliputi *Arg-120*, *His-90*, *Gln-192*, *Ser-353*, *Leu-352*, *Phe-518*, *Arg-513*, *Ile-517*, dan *Tyr-355*. Ikatan yang terjadi antara *Celecoxib* dan *COX-2* mencakup ikatan hidrogen, interaksi hidrofobik, serta interaksi π - π dan π -kation. Gugus sulfonamida dari *Celecoxib* membentuk ikatan hidrogen dengan *Ser-353*, *Leu-352*, dan *Phe-518*, yang berperan dalam menstabilkan orientasi molekul dalam kantong aktif. *Arg-120* membentuk interaksi π -kation dengan cincin aromatik *Celecoxib* di pintu masuk situs aktif, sedangkan *Tyr-355* membentuk interaksi π - π stacking dengan cincin fenil *Celecoxib*. Residu *Arg-513* menjadi sangat penting karena hanya ditemukan pada *COX-2* (tidak ada pada *COX-1*), sehingga ikatan hidrogennya dengan gugus sulfonamida *Celecoxib* berperan dalam selektivitas *Celecoxib* terhadap *COX-2*. Selain itu, *His-90* dan *Gln-192* juga membentuk ikatan hidrogen tambahan yang memperkuat stabilitas kompleks ligan-enzim. Interaksi tersebut secara keseluruhan menyebabkan penghambatan jalur katalitik *COX-2*, sehingga sintesis prostaglandin terhambat dan respons inflamasi dapat ditekan. Dengan demikian, pengikatan selektif *Celecoxib* terhadap residu-residu penting pada *COX-2* menjelaskan efektivitas dan selektivitasnya sebagai agen antiinflamasi.

Senyawa kontrol positif, *Celecoxib*, menunjukkan nilai afinitas pengikatan paling rendah yaitu $-8,5$ kcal/mol, menandakan afinitas tinggi terhadap *COX-2*. Interaksi *Celecoxib* terutama melibatkan residu *Cys47*, *Cys36*, *Pro153*, dan *Val155*,

meskipun tidak secara langsung bersinggungan dengan residu aktif klasik seperti *His-90* atau *Val-523* sebagaimana dilaporkan dalam literatur. Namun, afinitas tinggi ini tetap menunjukkan bahwa *Celecoxib* berinteraksi kuat dengan situs aktif *COX-2*. Untuk hasil dapat dilihat pada lampiran J. Sementara itu, senyawa uji *Limonene-1,2-diol* menunjukkan hasil yang sangat menjanjikan. Senyawa ini berinteraksi langsung dengan beberapa residu penting *COX-2*, yaitu *Phe518*, *Leu352*, *Val523*, *His90*, *Tyr355*, dan *Ala527*. Interaksi ini menunjukkan keterlibatan kantung sisi *COX-2* yang khas, yang tidak dimiliki oleh *COX-1*, sehingga dapat diasumsikan bahwa *Limonene-1,2-diol* memiliki potensi selektivitas terhadap *COX-2* yang dapat dilihat pada lampiran N.

Berbeda dengan kedua senyawa tersebut, *15-HETE-G* dan *(-)-Isopiperitenone* tidak menunjukkan interaksi yang signifikan dengan residu-residu penting *COX-2*. *15-HETE-G* berinteraksi dengan *Pro153* dan *Cys47* yang merupakan 2 residu asam amino yang sama dengan *Celecoxib* hasil analisis docking menunjukkan bahwa residu *CYS47* dan *PRO153* merupakan dua asam amino yang sama-sama berinteraksi dengan senyawa *Celecoxib* maupun *15-HETE-G*. Kesamaan ini mengindikasikan bahwa kedua ligan berikatan pada wilayah aktif yang serupa dalam enzim *COX-2*. Residu *CYS47* berperan penting dalam interaksi hidrofobik, seperti ikatan *alkil* atau *pi-alkil*, yang membantu menstabilkan ligan di dalam kantong enzim. Sementara itu, *PRO153* yang merupakan residu prolin dengan struktur kaku, berkontribusi dalam menjaga struktur lokal saluran aktif enzim dan sering berinteraksi melalui ikatan *pi-alkil* atau interaksi non-kovalen lainnya. Keterlibatan *CYS47* dan *PRO153* dalam interaksi kedua ligan ini menunjukkan bahwa bagian struktur senyawa *Celecoxib* dan *15-HETE-G* diarahkan ke area penting dalam enzim, sehingga berpotensi memengaruhi aktivitas enzim tersebut. Namun, efektivitas inhibisi tetap bergantung pada jumlah dan jenis interaksi tambahan lainnya yang terbentuk dalam kompleks ligan-enzim.

. Sementara itu, *(-)-Isopiperitenone* hanya menunjukkan interaksi dengan residu umum seperti *Pro127*, *Phe142*, dan *Trp139*, yang tidak terkait dengan aktivitas spesifik enzim *COX-2* yang masing-masing dapat dilihat pada lampiran K dan M. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa dari lima senyawa yang diuji, *Limonene-1,2-diol*

merupakan senyawa uji dengan interaksi paling relevan terhadap residu aktif *COX-2* , dan *15-HETE-G* karena memiliki residu asam amino yang sama dengan kontrol, senyawa ini berpotensi sebagai inhibitor selektif *COX-2* dan patut ditelusuri lebih lanjut secara eksperimental.

4.7 Hasil uji Antioksidan dengan metode DPPH

Salah satu metode yang umum digunakan untuk menguji aktivitas antioksidan adalah metode DPPH (*2,2-difenil-1-pikrilhidrazil*). Metode ini mengandalkan kemampuan senyawa antioksidan dalam mereduksi radikal bebas DPPH, yang dapat diamati melalui perubahan absorbansi menggunakan spektrofotometer. DPPH sering dipilih karena proses pengujiannya yang sederhana, cepat, sensitif, dan hanya memerlukan jumlah sampel yang sedikit untuk mengukur kapasitas antioksidan suatu senyawa dari bahan alam. Keunggulan lain dari DPPH adalah sifatnya yang stabil sebagai radikal bebas, sehingga tidak mudah mengalami dimerisasi seperti jenis radikal lainnya. Mekanisme kerja metode ini melibatkan donasi atom hidrogen dari antioksidan ke radikal DPPH, yang mengubah bentuknya menjadi senyawa non-radikal, yaitu *diphenylpicrylhydrazine* (Gulcin & Alwasel, 2023).

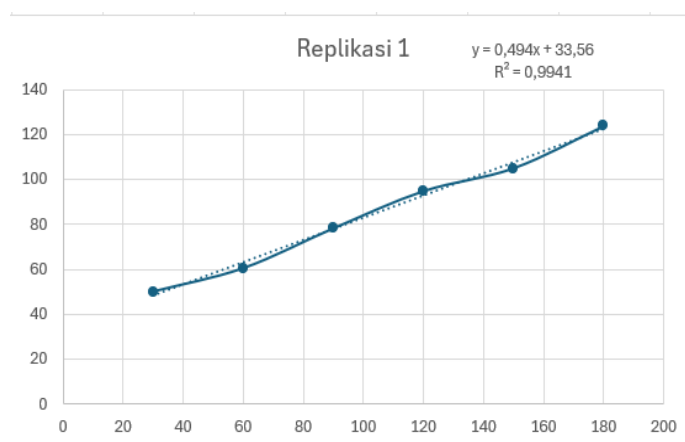
Dalam pelaksanaan uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH, diperlukan penanganan khusus yaitu proses pengujian dilakukan di ruangan yang gelap dan terlindung dari paparan sinar matahari. Hal ini disebabkan oleh sifat DPPH yang peka terhadap cahaya, sehingga paparan cahaya dapat mempengaruhi stabilitasnya dan mengganggu keakuratan hasil pembacaan aktivitas reduksi radikal bebas (Vejerano EP, 2025). Selain itu, tahapan inkubasi atau pendiaman selama 30 menit juga diperlukan sebagaimana disarankan dalam literatur. Waktu ini diberikan untuk memungkinkan terjadinya interaksi antara senyawa antioksidan dalam sampel dengan radikal DPPH, sehingga proses reduksi dapat berlangsung secara optimal (Gulcin, 2023).

Pengujian aktivitas antioksidan terhadap larutan sampel dilakukan dengan menyiapkan berbagai variasi konsentrasi, yaitu mulai dari 30 ppm hingga 180 ppm, dan masing-masing konsentrasi diuji sebanyak tiga kali ulangan. Rincian perhitungan untuk pembuatan larutan DPPH, larutan sampel, larutan negatif serta larutan positif

dapat ditemukan pada Lampiran C, D, dan E. Ketika larutan DPPH dicampurkan dengan larutan ekstrak sampel, tampak perubahan warna dari ungu tua menjadi ungu yang lebih terang. Fenomena ini disebabkan oleh adanya interaksi antara elektron bebas dari DPPH dengan atom hidrogen yang disumbangkan oleh senyawa antioksidan dalam sampel, sehingga DPPH kehilangan sifat radikal bebasnya (Kedare & Singh, 2011). Perubahan warna tersebut menjadi indikator bahwa senyawa antioksidan dalam sampel aktif dalam mereduksi radikal bebas.

Penentuan panjang gelombang maksimum dilakukan untuk memperoleh daerah serapan tertinggi dari DPPH, sehingga meningkatkan sensitivitas dan akurasi pengukuran. Dalam penelitian ini, diperoleh panjang gelombang sebesar 516,5 nm, yang berada dalam rentang yang telah dilaporkan oleh Rahmat pada tahun 2025, yaitu antara 515 nm hingga 520 nm sebagai rentang optimal untuk pengukuran absorbansi DPPH. Data hasil penentuan panjang gelombang setelah inkubasi selama 30 menit dapat dilihat pada Lampiran F.

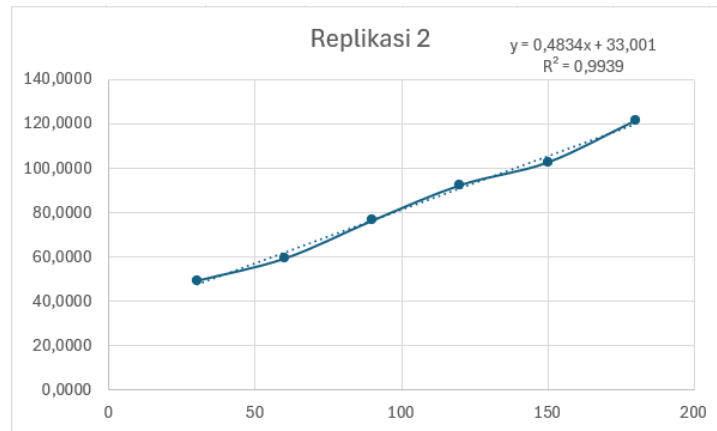
Aktivitas antioksidan suatu sampel diukur berdasarkan kemampuannya dalam menghambat penyerapan radikal DPPH, yang dinyatakan dalam bentuk persentase inhibisi. Parameter utama dalam metode DPPH adalah nilai IC_{50} , yaitu konsentrasi sampel yang diperlukan untuk mereduksi aktivitas radikal DPPH sebesar 50%. Nilai IC_{50} menggambarkan seberapa besar jumlah ekstrak (dalam ppm) yang efektif dalam menghambat proses oksidasi hingga setengahnya. Penentuan nilai ini dilakukan melalui analisis regresi linier, yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi senyawa uji (x) dan persentase inhibisi (y), sehingga dapat diperoleh persamaan regresi linear berbentuk $y = bx + a$.

Gambar 4. 2 grafik IC₅₀ Replikasi 1

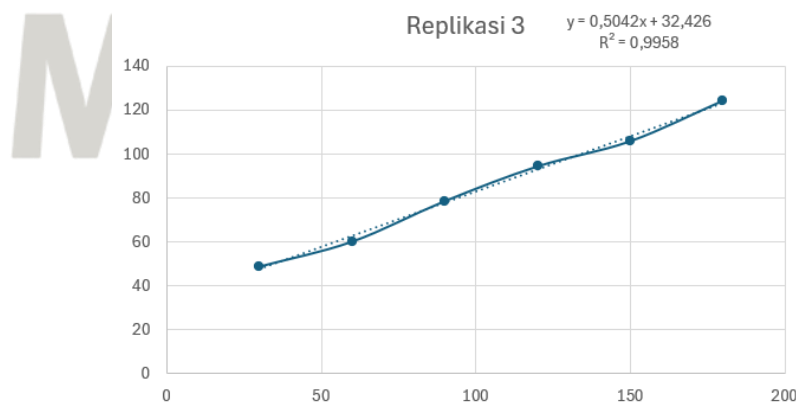
Tabel 4. 1 Hasil uji antioksidan %inhibisi replikasi 1,2, dan 3

Konsentrasi (ppm)	1	2	3
30	50,1118	49,4115	48,8909
60	60,5212	59,4839	60,2103
90	78,2558	76,5731	78,6187
120	94,8338	92,5306	94,3974
150	105,0505	102,8293	105,8312
180	123,8260	121,7293	124,2396

Berdasarkan Tabel 4.1, terlihat bahwa peningkatan konsentrasi sampel replikasi 1 sebanding dengan meningkatnya persentase inhibisi, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, maka aktivitas antioksidan atau kemampuan peredaman radikal bebas juga meningkat. Setelah memperoleh nilai persentase inhibisi, dilakukan analisis regresi linier yang menghasilkan persamaan $y = 0,494x + 33,56$. Visualisasi hubungan antara konsentrasi dan aktivitas antioksidan ditampilkan pada Gambar 4.2. Berdasarkan persamaan regresi tersebut, dihitung nilai IC₅₀ yang diperoleh sebesar 33,28ppm. Rincian perhitungan IC₅₀ secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran G.

Gambar 4. 3 grafik IC₅₀ Replikasi 2

Berdasarkan Tabel 4.1, pada replikasi 2 terlihat bahwa peningkatan konsentrasi sampel sebanding dengan meningkatnya persentase inhibisi, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, maka aktivitas antioksidan atau kemampuan peredaman radikal bebas juga meningkat. Setelah memperoleh nilai persentase inhibisi, dilakukan analisis regresi linier yang menghasilkan persamaan $y = 0,4834x + 33,001$. Visualisasi hubungan antara konsentrasi dan aktivitas antioksidan ditampilkan pada Gambar 4.3. Berdasarkan persamaan regresi tersebut, dihitung nilai IC₅₀ yang diperoleh sebesar 35,1582 ppm. Rincian perhitungan IC₅₀ secara lengkap dapat dilihat pada Lampiran G.

Gambar 4. 4 grafik IC₅₀ Replikasi 3

Untuk yang terakhir yaitu replikasi 3 berdasarkan Tabel 4.1, terlihat bahwa peningkatan konsentrasi sampel sebanding dengan meningkatnya persentase inhibisi, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi, maka aktivitas antioksidan atau kemampuan peredaman radikal bebas juga meningkat. Setelah memperoleh nilai persentase inhibisi, dilakukan analisis regresi linier yang menghasilkan persamaan $y = 0, \quad + 32,426$. Visualisasi hubungan antara konsentrasi dan aktivitas antioksidan ditampilkan pada Gambar 4.4. Berdasarkan persamaan regresi tersebut, dapat dihitung nilai IC_{50} dan diperoleh nilai sebesar 34,855 ppm (Lampiran G).

Hasil uji aktivitas antioksidan menggunakan metode DPPH menunjukkan bahwa ekstrak tanaman *Lycopodiella cernua* memiliki potensi sebagai antioksidan yang sangat kuat. Penilaian ini merujuk pada klasifikasi IC_{50} , di mana senyawa dengan nilai di bawah 50 ppm dikategorikan sebagai antioksidan sangat kuat, 50–100 ppm termasuk kuat, 100–150 ppm diklasifikasikan sedang, dan 151–200 ppm dianggap lemah. Nilai IC_{50} dari ekstrak *Lycopodiella cernua* ini secara berturut-turut tercatat sebesar 33,28 ppm pada replikasi pertama, 35,52 ppm pada replikasi kedua, dan 34,86 ppm pada replikasi ketiga, dengan rata-rata menunjukkan aktivitas tinggi dan standar deviasi sebesar 1,008 yang ditunjukkan pada tabel 4.6, yang menandakan konsistensi hasil antar replikasi.

Tabel 4. 6 Tabel IC_{50}

Replikasi	IC_{50} (ppm)
1	33,28
2	35,1582
3	34,855
Rata- rata	$34,4311 \pm 1,008315$

Dalam proses penyembuhan, aktivitas antioksidan dan antiinflamasi memiliki hubungan yang saling berkesinambungan dan saling mendukung. Ketika tubuh mengalami cedera, infeksi, atau stres fisiologis lainnya, sistem imun akan mengaktifkan respons inflamasi akut yang ditandai dengan pelepasan berbagai mediator seperti sitokin (misalnya $TNF-\alpha$, $IL-1\beta$), prostaglandin, dan leukotrien.

Aktivasi sel imun seperti makrofag dan neutrofil juga menghasilkan spesies oksigen reaktif (Reactive Oxygen Species/ROS) secara berlebihan sebagai bagian dari mekanisme pertahanan tubuh (Mittal, 2015).

Namun, produksi ROS yang berlebihan dapat menyebabkan stres oksidatif, yakni ketidakseimbangan antara radikal bebas dan sistem antioksidan endogen tubuh. Stres oksidatif ini dapat memperparah kerusakan jaringan, mengoksidasi lipid, protein, dan DNA, serta memperpanjang durasi peradangan (Reuter, 2015). Dengan kata lain, ROS tidak hanya menjadi produk dari peradangan, tetapi juga pemicu peradangan lebih lanjut, sehingga membentuk lingkaran yang tiada habisnya antara stres oksidatif dan inflamasi kronis.

Senyawa antioksidan bekerja dengan menetralkan ROS, menghambat peroksidasi lipid, dan mendukung aktivitas enzim antioksidan seperti superoksida dismutase (SOD) dan katalase. Dengan menekan stres oksidatif, antioksidan secara tidak langsung mengurangi aktivasi jalur inflamasi seperti *NF- κ B* dan *MAPK*, yang berperan penting dalam ekspresi gen-gen proinflamasi (Hussain, 2016). Di sisi lain, agen antiinflamasi menekan produksi mediator inflamasi, yang juga akan mengurangi aktivitas ROS sekunder. Oleh karena itu, penggunaan senyawa yang memiliki kedua aktivitas antioksidan dan antiinflamasi akan memberikan efek sinergis dalam mempercepat resolusi peradangan, mengurangi kerusakan jaringan, dan mempercepat proses penyembuhan.

Dalam konteks fitokimia, banyak senyawa alami seperti flavonoid, kumarin, dan alkaloid telah dilaporkan memiliki aktivitas ganda tersebut. Misalnya, flavonoid quercetin dapat menekan ekspresi *COX-2* dan *TNF- α* , sekaligus bertindak sebagai pemulung radikal bebas. Aktivitas sinergis ini menjadi alasan kuat mengapa ekstrak tanaman yang mengandung senyawa antioksidan dan antiinflamasi sangat potensial untuk pengobatan berbasis bahan alam.

Bab V

Kesimpulan dan Saran

5.1 Kesimpulan

1. Pada pengujian metabolit sekunder pada tanaman *Lycopodiella cernua* menggunakan analisis *LC-HRMS* terdapat 593 senyawa yang terdeteksi.
2. Pada uji antioksidan secara *In vitro* dengan metode DPPH mengatakan bahwa ekstrak *Lycopodiella cernua* memiliki nilai IC_{50} sebesar 33,28 ppm pada replikasi pertama, 35,52 ppm pada replikasi kedua, dan 34,86 ppm pada replikasi ketiga. Sehingga dapat disimpulkan bahwa *Lycopodiella cernua* memiliki sifat antioksidan yang sangat kuat dan standar deviasi sebesar 1,008, yang menandakan konsistensi hasil antar replikasi .
3. Hasil *molecular docking* menyatakan senyawa senyawa yang terkandung dalam ekstrak *Lycopodiella cernua* berpotensi untuk dikembangkan menjadi senyawa obat serta senyawa yang paling poten sebagai antiinflamasi yaitu *Limonene-1,2-diol* dan *15-HETE-G*.

5.2 Saran

Perlu dilakukan elusidasi struktur untuk tiga kandidat senyawa baru dan perlu dilakukan pula uji molekuler dinamik untuk masing masing senyawa dari ekstrak *Lycopodiella cernua*.

Daftar Pustaka

- Agustina, R. I. (2015). Aktivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia Poyantha*) Sebagai Antiinflamsi Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*). *J. Trop. Pharm.* , 3(2), 120-123.
- Ahmadi. (2022). *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Recent Advances In The Use Of Synthetic Cox-2 Inhibitors*. *Rsc Med Chem*, 14;13(5):471-496. Doi: 10.1039/D1md00280e. Pmid: 35685617; Pmcid: Pmc9132194.
- Ahmadi M, B. S. (2022). *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs: Recent Advances In The Use Of Synthetic Cox-2 Inhibitors*. *Rsc Med Chem*, 14;13(5):471-496. Doi: 10.1039/D1md00280e. Pmid: 35685617; Pmcid: Pmc9132194.
- Amudha, T. &. (2022). *In Silico Screening And Prediction Of Lycopodiella Cernua L. Against Crystal Structure Of Dna Gyrase*. *Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research*, 15(3), 118-123.
- Angriani, L. (2019). Potensi Ekstrak Bunga Telang (*Clitoria Ternatea*) Sebagai Pewarna Alami Lokal Pada Berbagai Industri Pangan. *Canrea Journal*, 2(1), Pp. 32-37.
- Attiq A, J. J. (2018). *Raging The War Against Inflammation With Natural Products*. *Front Pharmacol*, Sep 7;9:976. Doi: 10.3389/Fphar.2018.00976. Pmid: 30245627; Pmcid: Pmc6137277.
- Aulia, L. P. (2018). Optimasi Proses Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona Muricata L*) Metode Mae (Microwave Assisted Extraction) Dengan Respon Aktivitas Antioksidan Dan Total Fenol. *Jurnal Agroindustri Halal*, 4(1), Pp. 079-087.
- Aydoğ̃an, C. (2020). *Recent Advances And Applications In Lc-Hrms For Food And Plant Natural Products: A Critical Review*. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 412(9), 2193–2209. <https://doi.org/10.1007/S00216-019-02396-4>.

- Bickerton Gr, P. G. (2015). *Quantifying The Chemical Beauty Of Drugs*. *Nat Chem*, Jan 24;4(2):90-8. Doi: 10.1038/Nchem.1243. Pmid: 22270643; Pmcid: Pmc3524573.
- Bing-Rui Liu, S. X.-L. (2023). *A High-Resolution A-Glucosidase Inhibition Profiling For Targeted Identification Of Natural Antidiabetic Products From Lycopodiella Cernua (L.) Pic. Serm And Their Inhibitory Mechanism Study*. *Natural Product Research*, 37(24), 4099–4111.
- Bischoff-Kont, I. (2021). *Benefits Of Ginger And Its Constituent 6-Shogaol In Inhibiting Inflammatory Processes*. *Pharmaceuticals* , 14(6), 571; <https://doi.org/10.3390/Ph14060571>.
- Burhamin, Y. K. (2023). Uji Aktivitas Antioksidan Fraksi N-Heksan Daun Matoa (*Pometia Pinnata*) Dengan Menggunakan Metode Dpph (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl). *Jurnal Kesehatan Yamas Makassar*, 7(1).
- Burley, S. K. (2022). *Protein Data Bank: A Comprehensive Review Of 3d Structure Holdings And Worldwide Utilization By Researchers, Educators, And Students*. *National Library Of Medicine*.
- Christopher Andrew, F. L. (2015). *Experimental And Computational Approaches To Estimate Solubility And Permeability In Drug Discovery And Development Settings*. *Advanced Drug Delivery Reviews* 64(1–3):4-17 Doi:10.1016/J.Addr.2012.09.019.
- Dong, Y. C. (2016). *Fatty Acid Binding To The Allosteric Subunit Of Cyclooxygenase-2 Relieves A Tonic Inhibition Of The Catalytic Subunit*. *J Biol Chem*, 2;291(49):25641-25655. Doi: 10.1074/Jbc.M116.757310. Epub 2016 Oct 18. Pmid: 27756840; Pmcid: Pmc5207261.
- Fahmi, M. A. (2023). Studi In Silico Aktivitas Neuroprotektif Fraksi Etil Asetat Daun Semanggi (*Marsilea Crenata* C. Presl) Pada Reseptor 5btr. *Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*.
- Faki, E. A. (2021). *Different Chemical Structures And Physiological/Pathological Roles Of Cyclooxygenases*. *Rambam Maimonides Med J*, Jan 19;12(1):E0003. Doi: 10.5041/Rmmj.10426. Pmid: 33245277; Pmcid: Pmc7835113.

- Géhin, A. F. (2021). *Advances In High-Resolution Mass Spectrometry Applied To Pharmaceuticals. Journal Of Separation Science*, 44(5), 935–950. <https://doi.org/10.1002/Jssc.202001123>.
- González, V. (2022). *Anti-Inflammatory And Antinociceptive Activities Of The Essential Oil Of Tagetes Parryi A. Gray (Asteraceae) And Verbenone. Molecules*, 27(9):2612.
- Gulcin, İ. &. (2023). *Dpph Radical Scavenging Assay. Processes*, 11(8), 2248. <https://doi.org/10.3390/Pr11082248>.
- Habibyar Et Al, M. M. (2024). *In Silico Design, Molecular Docking, And Pass Prediction Of New Thiazole Derivatives As Potential Antidiabetic Agents. Journal Of Molecular Structure*, 1296, 133471. <https://doi.org/10.1016/J.Molstruc.2023.133471>.
- Halim, M. (2022). Validitas Metode Pengukuran Nilai Aktivitas Dan Total Antioksidan Pada Antioksidan Polar Dan Non Polar. . *Skripsi. Universitas Katolik Soegijapranata*.
- Hung, T. M. (2015). *Kinetics And Molecular Docking Studies Of Cholinesterase Inhibitors Derived From Water Layer Of Lycopodiella Cernua (L.) Pic. Serm. (Ii). Chemico-Biological Interactions*, 240, 74-82.
- Hussain, T. T. (2016). *Oxidative Stress And Inflammation: What Polyphenols Can Do For Us? Oxidative Medicine And Cellular Longevity*, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>.
- Intertek. (2023). *Lc-Hrms Protein Analysis For Use In Drug Development, Biomedical Discovery, And Quality Assessment*. .
- Isdiyanti, S. I. (2021). Ekstraksi Flavonoid Dari Daun Kersen (Muntinga Calabura L) Menggunakan Pelarut Etanol Dengan Metode Mae (Microwave Assisted Extraction) Dan Uae (Ultrasonic Assisted Extraction). . *Jurnal Inovasi Teknik Kimia*, 6(2), Pp. 105–109.
- Jayakody, L. J.-E.-I.-W.-M.-S. (2024). *The Influence Of Solvent Choice On The Extraction Of Bioactive Compounds From Asteraceae: A Comparative Review*. 13(19), 3151. <https://doi.org/10.3390/Foods13193151>.

- Kalpesh Patil, P. H. (2015). *Pentacyclic Triterpenoids Inhibit Ikk β Mediated Activation Of Nf-Kb Pathway: In Silico And In Vitro Evidences*. Doi:10.1371/Journal.Pone.0125709.
- Kastritis, P. A. (2018). "On The Binding Affinity Of Macromolecular Interactions: Daring To Ask Why Proteins Interact. *Journal Of The Royal Society Interface*, 10(79), P. 20120835. Available At: <https://doi.org/10.1098/rsif.2012.0835>.
- Kristian, S. (2018). *Effectiveness And Safety Of Celecoxib For The Treatment Of Rheumatoid Arthritis*. *Am Fam Physician*, 97(9):573.
- Lab, B. (2025). *PkcsM Theory – How To Interpret PkcsM Results*. Australia: University Of Queensland.
- Luo, R. Y. (2023). *Comparison Of Lc-High-Resolution-MS² And MS³ For Screening Toxic Natural Products*. *Journal Of Mass Spectrometry And Advances In The Clinical Lab*, 30, 38–44.
- Marin De, T. I. (2023). *Using In Silico Approach For Metabolomic And Toxicity Prediction Of Alternariol*. *National Research And Development Institute For Biology And Animal Nutrition*.
- Mayangsari, E. K. (2020). Efek Ekstrak Daun Kencana Ungu (*Ruellia Tuberosa*) Terhadap Kadar Malondialdehida (Mda) Usus Tikus Yang Diinduksi Indometasin. *Majalah Kesehatan*, 7(2), 97–101.
- Maynita, S. P. (2024). Analisis Rendemen Ekstrak Etanol Daun Genitri Dari Semarang. *Prosiding Seminar Nasional Program Studi Farmasi Unipma*.
- Mittal, M. S. (2015). *Reactive Oxygen Species In Inflammation And Tissue Injury*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(7), 1126–1167. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5149>.
- Musfiroh I, K. R. (2023). *Stability Analysis Of The Asiatic Acid-Cox-2 Complex Using 100 Ns Molecular Dynamic Simulations And Its Selectivity Against Cox-2 As A Potential Anti-Inflammatory Candidate*. *Molecules*, 27;28(9):3762. Doi: 10.3390/Molecules28093762. Pmid: 37175172; Pmcid: Pmc10180211.
- Nababan, J. S. (2018). Pengaruh Suhu Pemanasan Terhadap Rendemen Dan Mutu Minyak Biji Kemiri (*Aleurites Moluccana*) Dengan Metode Maserasi

- Menggunakan Pelarut Heksana. *Seminar Nasional Fakultas Pertanian Universitas Jambi*, Pp. 368–376.
- Ni Ketut Linda Puspa Yanti, 2. N. (2023). *The Effect Of Different Types Of Solvents On Total Levels Of Flavonoid Extract (Annona Muricata L.)*. *Universitas Muhamadiyah Palangkaraya*.
- Ningsih, A. W. (2020). Pengaruh Perbedaan Metode Ekstraksi Rimpang Kunyit Terhadap Rendemen. *Journal Of Pharmaceutical Care Anwar Medika (J-Pham)*, 2(2), 96–104.
- Núñez, N. S. (2023). *Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry (Lc-Hrms) Fingerprinting And Chemometrics For Coffee Classification And Authentication*. *Molecules*, 29(1), 232.
- Nurjannah, S. (2024). Studi In Silico Senyawa Peronemin C1 Dan Turunannya Dari Daun Sungkai (*Peronema Canescens* Jack) Sebagai Anti-Inflamasi. *Universitas Jambi*.
- Octavian, I. P. (2022). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Tanaman Patah Tulang (*Euphorbia Tirucallil.*). . *Universitas Udayana*.
- Orlando, B. M. (2016). *Cyclooxygenase-2, Crystal Structure Of Rofecoxib Bound To Human*. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun*, 72: 772-776 Pubmed: 27710942 Search On Pubmedsearch On Pubmed Central Doi: <https://doi.org/10.1107/S2053230X16014230>.
- Pastene, M.-N. E.-C.-N.-E. (2024). *Ceanothanes Derivatives As Peripheric Anionic Site And Catalytic Active Site Inhibitors Of Acetylcholinesterase: Insights For Future Drug Design*. *Int J Mol Sci*, 3;25(13):7303. Doi: 10.3390/Ijms25137303. Pmid: 39000410; Pmcid: Pmc11242892.
- Pires, B. T. (2015). *PkcsM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic And Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures*. *J. Med. Chem*, 58(9), 4066–4072.
- Popova, M. B. (2023). *Contemporary Methods For The Extraction And Isolation Of Natural Products*. *Bmc Chemistry*, <https://doi.org/10.1186/S13065-023-00960-Z>.

- Poroikov, V. V. (2019). *Computer-Aided Prediction Of Biological Activity Spectra For Organic Compounds: The Possibilities And Limitations. Russian Chemical Bulletin*, 68(12), 2143–2154. <https://doi.org/10.1007/S11172-019-2645-7>.
- Porquis, H. C. (2018). Studi Anti-Inflamasi, Antioksidan Dan Sitotoksitas Pada *Lycopodiella Cernua* (L.) J. Sm. Di Bukidnon, Filipina. *Departemen Biologi, Fakultas Seni Dan Sains Universitas Mindanao Filipina*.
- Queiroz, E. F. (2024). *Advanced High-Resolution Chromatographic Strategies For Efficient Isolation Of Natural Products: From Metabolite Profiling To Pure Chemical Entities. Phytochemistry Reviews*, 23, 1415–1442. <https://doi.org/10.1007/S11101-023-09866-W>.
- Qureshi O, D. A. (2025). *Cox Inhibitors. Statpearls Publishing*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/Nbk549795/>.
- R. Vanlalpeka, E. V. (2024). *Phytochemical Profiling And Pharmacognostic Activity Of Lycopodiella Cernua (L.) Pic. Serm. A Lesser-Known Plant From Mizoram, North East India. Department Of Botany, Mizoram University, Tanhril, 796004, India*.
- Rachmi Afriani, H. A. (2020). Identifikasi Tumbuhan Paku (Pteridophyta) Di Kelurahan Kapuas Kiri Hilir. *Jurnal Keguruan Dan Ilmu Pendidikan.*, Universitas Kapuas Sintang.
- Rahman, F. C. (2025). *Spectroscopic Evaluation Of Dpph And Abts Radical Systems Under Variable Solvent Polarity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy*, 312, 122125. Doi: 10.1016/J.Saa.2025.122125.
- Ranjan, S. &. (2023). *Toxicity Alerts In Clinical Candidates. International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*.
- Raso, G. M. (2020). *In-Vivo And In-Vitro Anti-Inflammatory Effect Of Echinacea Purpurea: Inhibition Of Lipopolysaccharide-Induced Nitric Oxide And Tumor Necrosis Factor-Alpha Production. Immunopharmacology*, 46(1), 65–74. [https://doi.org/10.1016/S0162-3109\(99\)00136-6](https://doi.org/10.1016/S0162-3109(99)00136-6).

- Reuter, S. G. (2015). *Oxidative Stress, Inflammation, And Cancer: How Are They Linked? Free Radical Biology And Medicine*, 49(11), 1603–1616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.
- Rina, S. S. (2023). Pengaruh Ukuran Partikel, Komposisi Pelarut, Dan Rasio Simplisia-Pelarut Terhadap Kadar Flavonoid Total Pada Ekstraksi Herba Pegagan (*Centella Asiatica* (L.) Urb). *Ugm Press*.
- Rintjap, D. S. (2020). Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Pada Ekstrak Etanol Tangkai Dan Kelopak Buah Manggis (*Garcinia Mangostana* L.). *Politeknik Kesehatan Kemenkes Manado, Indonesia*.
- Rios, J. L. (2018). *Natural Compounds As Modulators Of Inflammation And Oxidative Stress. Current Topics In Medicinal Chemistry*, 8(20), 1705–1714. <https://doi.org/10.2174/1568026618666180806151131>.
- Rouzer, M. L. (2020). *Structural And Chemical Biology Of The Interaction Of Cyclooxygenase With Substrates And Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs. Chem Rev*, 12;120(15):7592-7641. Doi: 10.1021/Acs.Chemrev.0c00215. Epub 2020 Jul 1. Pmid: 32609495; Pmcid: Pmc8253488.
- Sahumena, M. H. (2020). Identifikasi Jamu Yang Beredar Di Kota Kendari Menggunakan Metode Spektrofotometer Uv-Vis. *Journal Syifa Sciences And Clinical Research*, 65-72.
- Salem, M. A. (2020). *Metabolomics In The Context Of Plant Natural Products Research: From Sample Preparation To Metabolite Analysis. Metabolites*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.3390/Metabo10010037>.
- Sanshita. (2025). *From Citrus To Clinic: Limonene's Journey Through Preclinical Research, Clinical Trials, And Formulation Innovations. Int J Nanomedicine*, 20:4433–4460.
- Sheskey, P. J. (2017). *Handbook Of Pharmaceutical Excipients Eighth Edition. Pharmaceutical Press*.
- Shipeng, Y. M. (2019). *Extraction Of Bioactive Compounds From Stems Of Undaria Pinnatifida. Food Science And Technology Research*, P. 765-773 Doi <https://doi.org/10.3136/Fstr.25.765>.

- Sianturi, R. S. (2020). Eksplorasi Tumbuhan Paku Pteridophyta Di Wilayah Ketinggian Yang Berbeda. *Lppm Universitas Negeri Semarang*.
- Silva. (2020). *Antiinflammatory And Antioxidant Effects Of Umbelliferone In A Murine Model Of Acute Lung Injury Induced By Lps*. *Inflammopharmacology*, 28(1), 95–104. <https://doi.org/10.1007/S10787-019-00605-1>.
- Smith, W. L. (2019). *Interactions Of Fatty Acids, Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, And Coxibs With The Catalytic And Allosteric Subunits Of Cyclooxygenases-1 And -2*. *Journal Of Biological Chemistry*, Volume 294, Issue 5, 1697 - 1705.
- Sottriffer, C. A. (2016). *In Silico Drug Discovery And Design Theory, Methods, Challenges, And Applications*. In C. N. Cavasotto (Ed.), *In Silico Drug Discovery And Design: Theory, Methods, Challenges, And Applications*. . Crc Press.
- Tang H., Z. H. (2019). **Admetlab 2.0: An Integrated Online Platform For Accurate And Comprehensive Predictions Of Admet Properties**. *Nucleic Acids Research*, 47(W1): W735–W742.
- Uddin, B. S. (2019). *Fluorescent Indomethacin-Dansyl Conjugates Utilize The Membrane-Binding Domain Of Cyclooxygenase-2 To Block The Opening To The Active Site*. *J Biol Chem*, 31;294(22):8690-8698. Doi: 10.1074/Jbc.Ra119.007405. Epub 2019 Apr 18. Pmid: 31000626; Pmcid: Pmc6552414.
- Vejerano Ep, K. K. (2025). *Persistent Free Radicals In Leaves As A Stable Standard For Quantifying Free Radicals*. *Methodsx*, Doi: 10.1016/J.Mex.2025.103302. Pmid: 40248462; Pmcid: Pmc12005876.
- Velden, V. D. (2020). *Safety And Efficacy Of Selective Cox-2 Inhibitors*. *Current Pharmaceutical Design*, 26(26), 3129–3135.
- Wahab. (2020). *N Vitro Biological Assessment Of Berberis Vulgaris And Its Active Constituent, Berberine: Antioxidant, Anti-Acetylcholinesterase, Anti-Diabetic And Anticancer Effects*. *Bmc Complementary Medicine And Therapies*, 20(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/S12906-020-02950-W>.

- Walid Et Al., E. E. (2025). *New Nicotinamide–Thiadiazol Hybrids As Vegfr-2 Inhibitors For Breast Cancer Therapy: Design, Synthesis And In Silico And In Vitro Evaluation. Published By The Royal Society Of Chemistry*, Doi: 10.1039/D5ra01223f.
- Wulandari, •. V. (2022). Uji Antioksidan Ekstrak Leptastrea Purpurea Fraksi Etanol Secara In Vitro Dan In Silico. *Program Studi Farmasi Fakultas Sains Dan Teknologi Universitas Ma Chung Malang*.
- Yuniarni, U. S. (2015). Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Buah & Daun Asam Jawa (*Tamarindus Indica*) Serta Kombinasinya Pada Tikus Jantan Galur Wistar. *Prossiding Snapp*, 1(1), 83-88.
- Zhao, Y. F. (2018). *Alkaloids From Lycopodiella Cernua And Their Anti-Inflammatory Activity. Phytochemistry*, 155, 161-168.



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran

Lampiran A. Hasil Determinasi



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor Nomor 87, Pesanggrahan, Kota Batu, Jawa Timur 65313
Telepon 0341 593396, Laman materiamedica.jatimprov.go.id,
Pos el materiamedicabatu@jatimprov.go.id

Batu, 13 Juni 2025

Nomor : 000.9.3/2092/102.20/2025
Sifat : Terbuka
Hal : Determinasi Tanaman Paku Kawat

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : 1. Richie Kusuma Adi Wijaya
2. Puji Sepkala Puspita
3. Ezra Dwi Saputra Sembiring
4. Johane Christo Winata
Fakultas : Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Ma Chung

1. Perihal determinasi tanaman paku kawat
 - Famili : Lycopodiaceae
 - Genus : Lycopodiella
 - Spesies : *Lycopodiella cernua* (L.) Pic.Serm.
 - Sinonim : *Lycopodium cernuum* L. = *Palhinhaea cernua* (L.) Franco & Vasc.
 - Nama Daerah : Paku kawat, rane gampang (Sunda); pakis kawat, simbar watu (Jawa).
 - Kunci Determinasi : 1a-17b-18b-19a-20b-21b: Lycopodiaceae-1: *Lycopodium-L.cernuum*.
2. Morfologi : Habitus: Bercabang banyak, hijau muda, berakar dalam tanah.
Batang: Tegak, naik tegak sedikit demi sedikit atau tumbuh telentang, biasanya dengan cabang tegak, kalau menyentuh tanah akan tumbuh akar; cabang halus dikelilingi daun. Daun: Berbentuk garis, hampir selalu agak lunak, panjang 2-5 mm. Sporangia: Sporangia dalam ketiak daun sporofil yang beringgit, terkumpul dalam bulir yang jelas; bulir duduk pada ujung cabang yang bedaun normal, menunduk atau tegak.
3. Bagian yang digunakan : Daun.
4. Penggunaan : Penelitian (Tugas Akhir).
5. Daftar Pustaka
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Kepala UPT Laboratorium Herbal
Materi Medica Batu

Dr. RATNA YULIANTI, M.M.
Pembina Tingkat I
NIP. 197107112000122002

Lampiran B. Perhitungan % Rendemen

Bobot Ekstrak (gram)	Bobot simplisia (gram)	Rendemen (%)
413,9	839,8	49,29

$$\begin{aligned}\% \text{ Rendemen} &= \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\% \\ &= \frac{413,9 \text{ gram}}{839,8 \text{ gram}} \times 100 \\ &= 49,29\%\end{aligned}$$



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran C. Perhitungan larutan DPPH 40 ppm (kontrol negatif)

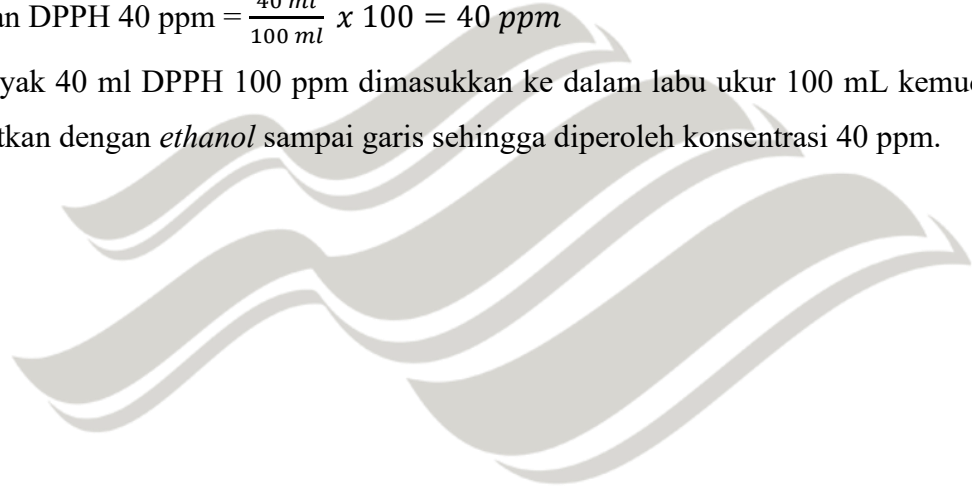
Untuk membuat larutan DPPH 40 ppm terlebih dahulu dibuat larutan DPPH induk yaitu sebesar 100 ppm.

$$\text{Induk DPPH } 100\text{ppm} = \frac{10 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \times 1000 = 100 \text{ ppm}$$

Sebanyak 10 mg DPPH ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan *ethanol* sampai garis sehingga diperoleh konsentrasi 100 ppm.

$$\text{Larutan DPPH } 40 \text{ ppm} = \frac{40 \text{ ml}}{100 \text{ ml}} \times 100 = 40 \text{ ppm}$$

Sebanyak 40 ml DPPH 100 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL kemudian dilarutkan dengan *ethanol* sampai garis sehingga diperoleh konsentrasi 40 ppm.



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran D. Perhitungan asam galat 10 ppm (kontrol positif)

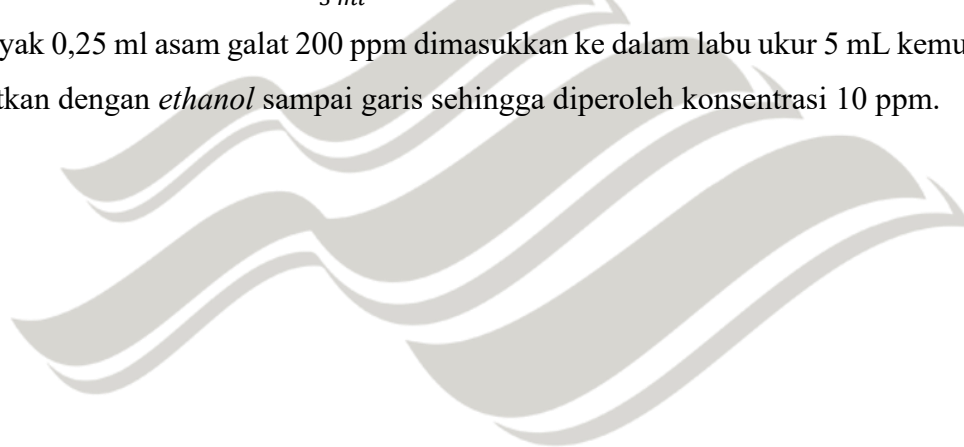
Untuk membuat larutan asam galat 10 ppm terlebih dahulu dibuat larutan asam galat induk yaitu sebesar 200 ppm.

$$\text{Induk asam galat 200 ppm} = \frac{1 \text{ mg}}{5 \text{ ml}} \times 1000 = 200 \text{ ppm}$$

Sebanyak 1 mg asam galat ditimbang dan dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian dilarutkan dengan *ethanol* sampai garis sehingga diperoleh konsentrasi 200 ppm.

$$\text{Larutan asam galat 10 ppm} = \frac{0,25 \text{ ml}}{5 \text{ ml}} \times 200 = 10 \text{ ppm}$$

Sebanyak 0,25 ml asam galat 200 ppm dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL kemudian dilarutkan dengan *ethanol* sampai garis sehingga diperoleh konsentrasi 10 ppm.



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran E. Perhitungan pembuatan larutan sampel *Lycopodiella cernua* metode DPPH

Baku induk sampel 10.000 ppm dibuat dengan cara menimbang 100mg ekstrak kental *Lycopodiella cernua* dan dilarutkan menggunakan *ethanol* p.a sampai 10 ml pada tanda atas labu ukur.

$$\frac{100mg}{10 ml} \times 1000 = 10.000 ppm$$

Dari larutan sampel 10.000 ppm diambil masing-masing larutan 0,03 mL; 0,06 mL; 0,09 mL; 0,12 mL; 0,15 mL; dan 0,18 mL lalu diencerkan dengan *ethanol* p.a pada labu ukur 10 ml sehingga didapatkan larutan 30 ppm; 60 ppm; 90 ppm; 120 ppm; 150 ppm; dan 180 ppm masing masing dibuat tiga pengulangan (triplo).

1. Pembuatan larutan sampel 30 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.000 ppm \times V_1 = 30 ppm \times 10 ml$$

$$V_1 = 0,03 ml$$

2. Pembuatan Larutan sampel 60 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.000 ppm \times V_1 = 60 ppm \times 10 ml$$

$$V_1 = 0,06 ml$$

3. Pembuatan larutan sampel 90 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.000 ppm \times V_1 = 90 ppm \times 10 ml$$

$$V_1 = 0,09 ml$$

4. Pembuatan larutan sampel 120 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.000 ppm \times V_1 = 120 ppm \times 10 ml$$

$$V_1 = 0,12 ml$$

5. Pembuatan larutan sampel 150 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$10.000 \text{ ppm} \times V_1 = 150 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,15 \text{ ml}$$

6. Pembuatan larutan sampel 180 ppm

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

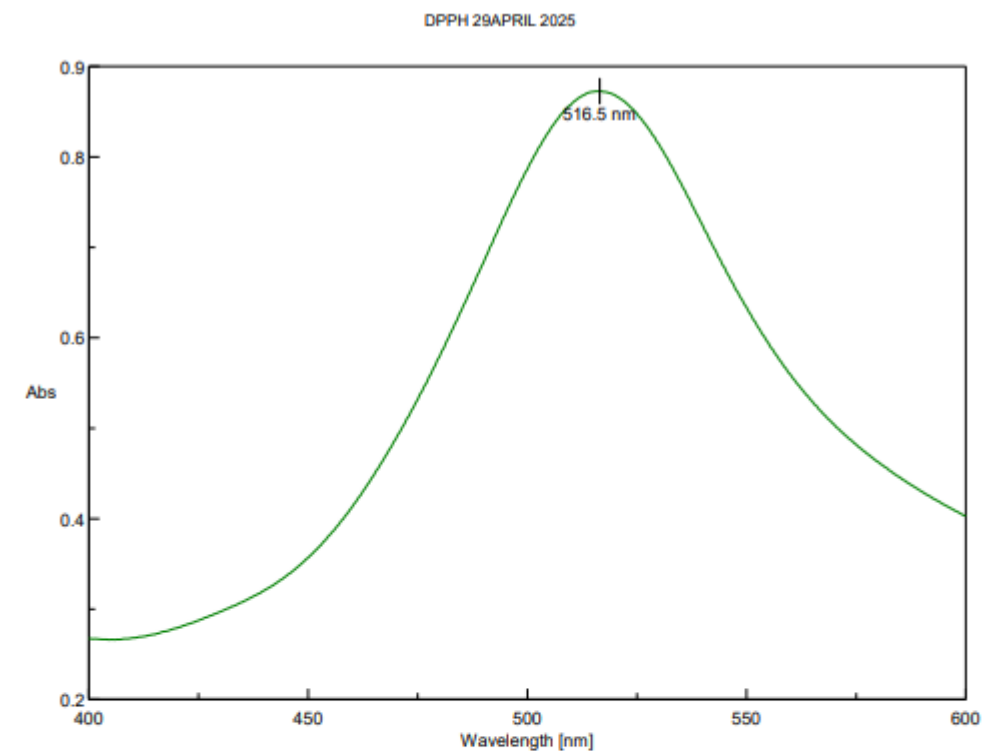
$$10.000 \text{ ppm} \times V_1 = 180 \text{ ppm} \times 10 \text{ ml}$$

$$V_1 = 0,18 \text{ ml}$$



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran F. Panjang gelombang maksimum DPPH



[Comments]

Sample name

Comment

User

Division

Company

Ma Chung University

— DPPH 29APRIL 2025

[Detailed Information]

Creation date 21/03/2025 5:18
Date modified 22/03/2025 15:01

Data array type Linear data array
Horizontal axis Wavelength [nm]
Vertical axis Abs
Start 600 nm
End 400 nm
Data interval 0.5 nm
Data points 401

[Measurement Information]

Instrument name V-760
Model name V-760
Serial No. B017961800

Measurement date 21/03/2025 5:16

Photometric mode Abs
Measurement range 600 - 400 nm
Data interval 0.5 nm
Bandwidth 2.0 nm
Response 0.06 sec
Scan speed 400 nm/min
Change source at 340 nm
Light source D2/W1
Filter exchange Step
Correction Baseline

Lampiran G. perhitungan IC₅₀ dan SD

Tabel G. 1 (% Inhibisi) replikasi 1

Kons (ppm)	Abs.Sn (sampel)	Abs.cn (DPPH)	Abs. cp (as.galat)	Sn-cn	Cp-cn	DPPH	% inhibisi
30	0,8292	0,8726	0,7861	-0,0433	-0,0865	0,5011	50,1118
60	0,8202	0,8726	0,7861	-0,0523	-0,0865	0,6052	60,5212
90	0,8049	0,8726	0,7861	-0,0677	-0,0865	0,7826	78,2558
120	0,7906	0,8726	0,7861	-0,0820	-0,0865	0,9483	94,8338
150	0,7817	0,8726	0,7861	-0,0908	-0,0865	1,0505	105,0505
180	0,7655	0,8726	0,7861	-0,1071	-0,0865	1,2383	123,8260

Tabel G. 2 (% Inhibisi) replikasi 2

Kons (ppm)	Abs.Sn (sampel)	Abs.cn (DPPH)	Abs. cp (as.galat)	Sn-cn	Cp-cn	DPPH	% inhibisi
30	0,8289	0,8726	0,7842	-0,0437	-0,0884	0,4941	49,4115
60	0,8200	0,8726	0,7842	-0,0526	-0,0884	0,5948	59,4839
90	0,8049	0,8726	0,7842	-0,0677	-0,0884	0,7657	76,5731
120	0,7908	0,8726	0,7842	-0,0818	-0,0884	0,9253	92,5306
150	0,7817	0,8726	0,7842	-0,0909	-0,0884	1,0283	102,8293
180	0,7650	0,8726	0,7842	-0,1076	-0,0884	1,2173	121,7293

Tabel G. 3 (% Inhibisi) replikasi 3

Kons (ppm)	Abs.Sn (sampel)	Abs.cn (DPPH)	Abs. cp (as.galat)	Sn-cn	Cp-cn	DPPH	% inhibisi
30	0,8298	0,8726	0,7851	-0,0428	-0,0875	0,4889	48,8909
60	0,8199	0,8726	0,7851	-0,0527	-0,0875	0,6021	60,2104
90	0,8038	0,8726	0,7851	-0,0688	-0,0875	0,7862	78,6188
120	0,7900	0,8726	0,7851	-0,0826	-0,0875	0,9440	94,3974
150	0,7800	0,8726	0,7851	-0,0926	-0,0875	1,0583	105,8312
180	0,7639	0,8726	0,7851	-0,1087	-0,0875	1,2424	124,2397

1. Perhitungan IC_{50} Replikasi 1

$$y = 0,494x + 33,56$$

$$50 - 33,56 = 0,494x$$

$$x = 33,28, \text{ sehingga nilai } IC_{50} = 33,28 \text{ ppm}$$

2. Perhitungan IC_{50} Replikasi 2

$$y = 0,4834x + 33,001$$

$$50 - 33,001 = 0,4834x$$

$$x = 35,1582, \text{ sehingga nilai } IC_{50} = 35,1582 \text{ ppm}$$

3. Perhitungan IC_{50} Replikasi 3

$$y = 0,5042x + 32,426$$

$$50 - 32,426 = 0,5042x$$




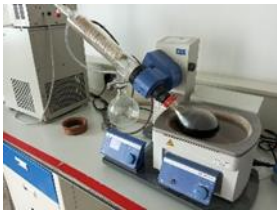
$$x = 34,855, \text{ sehingga nilai } IC_{50} = 34,855 \text{ ppm}$$

Tabel G. 4 perhitugan SD

Replikasi	ppm
1	33,28
2	35,1582
3	34,855
Rata- rata	34,4311
SD	1,008315

Lampiran H. Hasil Ekstraksi

Tabel H. 1 Proses Ekstraksi

No	Gambar	Keterangan
1		Proses Penimbangan Simplisia Kering
2		Proses Maserasi Sampel
3		Proses Penyaringan Filtrat Sampel Hasil Maserasi
4		Proses Evaporasi Filtrat

5






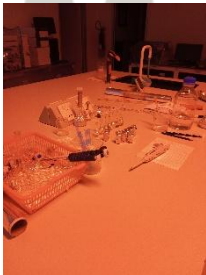
Ekstrak yang Dihasilkan



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran I. Uji DPPH

Tabel I. 1 Proses Uji DPPH

No	Gambar	Keterangan
1		Penimbangan Sampel elstrak kental <i>Lycopodiella cernua</i>
2		Penimbangan Induk DPPH
3		Penimbangan Asam Galat
4		Proses Preparasi dan Inkubasi

5



Proses Analisis Spectrofotometer



UNIVERSITAS
MA CHUNG

Lampiran J. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking *Celecoxib*



Discovery Studio Visualizer

File Edit View Chemistry Structure Sequence Chart Scripts Tools Window Help

Macromolecules Simulation Receptor-Ligand Interactions Pharmacophores Small Molecules X-ray My Tools

Tools

View Interactions

Define the receptor and ligand.

Define Receptor: complex celecoxib

Define Ligand: cel... celecoxib (NUNK0)

Step through ligands.

Display receptor-ligand interactions.

Ligand Interactions

Interaction Options...

Expand Contract

Show Distances Show Types

Display receptor surfaces.

Aromatic H-Bond Charge

Hydrophobic Sanability SAS

Expand Contract

Change the visibility of the receptor and ligand.

Receptor Ligand

Interacting Atoms Pocket Atoms

Show receptor-ligand interactions on a 2D diagram.

Show 2D Diagram

Define and Edit Binding Site

complex celecoxib

UNK0

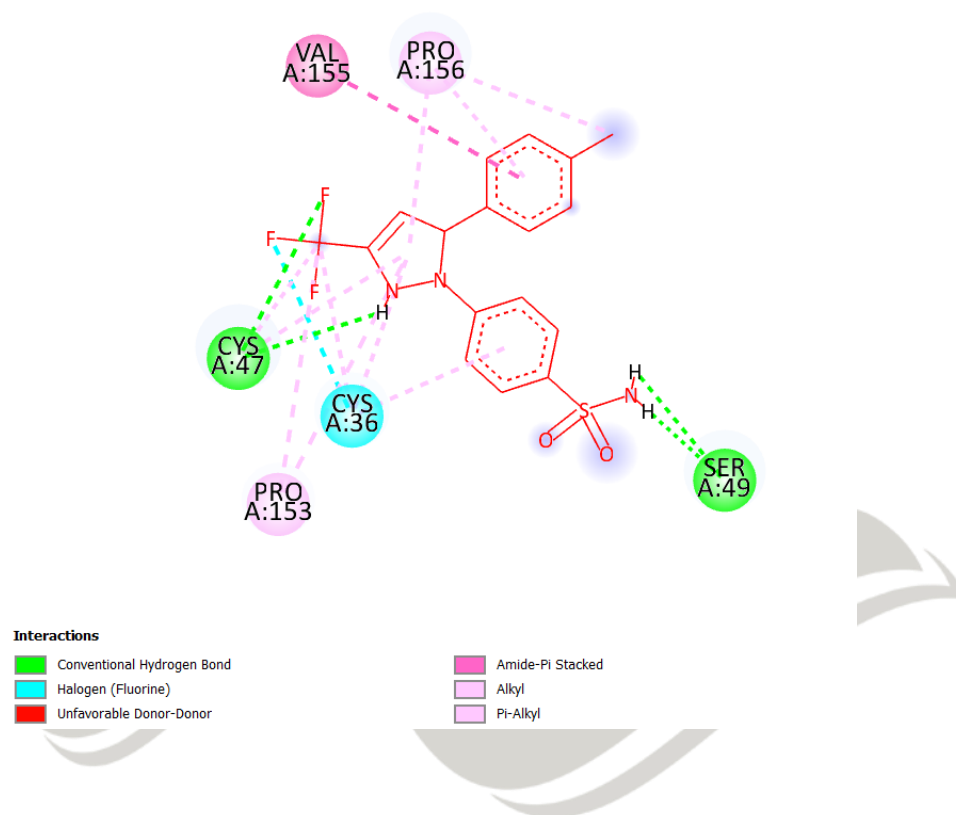
PRO150 PRO153 VAL155

Name	Visible	Color	Parent	Distance	Category	Types	From	From Chemistry	To	To Chemistry	Angle DHA	Angle HAY	Theta	Theta 2	Gamma	Closest Atom Distance
1 A:CY547...	Yes	Green	Ligand N...	2,92861	Hydrogen Bond/Halogen	Convent...	A:CY54...	H-Donor/Halogen Acce...	N:UNK...	H-Acceptor/Halogen	150,009	145,162				
2 N:UNK0...	Yes	Green	Ligand N...	2,41328	Hydrogen Bond	Convent...	N:UNK0...	H-Donor	A:CY...	H-Acceptor	145,748	100,186				
3 N:UNK0...	Yes	Green	Ligand N...	2,72691	Hydrogen Bond	Convent...	N:UNK0...	H-Donor	A:SE...	H-Acceptor	92,526	139,318				
4 N:UNK0...	Yes	Green	Ligand N...	2,56667	Hydrogen Bond	Convent...	N:UNK0...	H-Donor	A:SE...	H-Acceptor	101,857	101,642				
5 A:CY536...	Yes	Blue	Ligand N...	3,20385	Halogen	Halogen ...	A:CY53...	Halogen Acceptor	N:UNK...	Halogen						
6 A:VAL15...	Yes	Pink	Ligand N...	4,85778	Hydrophobic	Amide P...	A:VAL1...	Amide	N:UNK0	Pi-Orbitals			43,375	37,15	19,365	3,999
7 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	5,05174	Hydrophobic	Alkyl	N:UNK0...	Alkyl	A:PR...	Alkyl						
8 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,65526	Hydrophobic	Alkyl	N:UNK0...	Alkyl	A:CY...	Alkyl						
9 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,16779	Hydrophobic	Alkyl	N:UNK0...	Alkyl	A:CY...	Alkyl						
10 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,89079	Hydrophobic	Alkyl	N:UNK0...	Alkyl	A:PR...	Alkyl						
11 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,27977	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:CY...	Alkyl						
12 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,92658	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:CY...	Alkyl						
13 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	5,49698	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:PR...	Alkyl						
14 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	4,98078	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:PR...	Alkyl						
15 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	5,18623	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:CY...	Alkyl						
16 N:UNK0...	Yes	Pink	Ligand N...	3,79944	Hydrophobic	Pi-Alkyl	N:UNK0...	Pi-Orbitals	A:PR...	Alkyl						

Molecule / AminoAcid/Chem / AminoAcid / Atom / Chain / Residue / Bond / Group / Ligand Non-bond Monitor / Non-bond / Unfavorable Non-bond / Unsatisfied Non-bond / Label

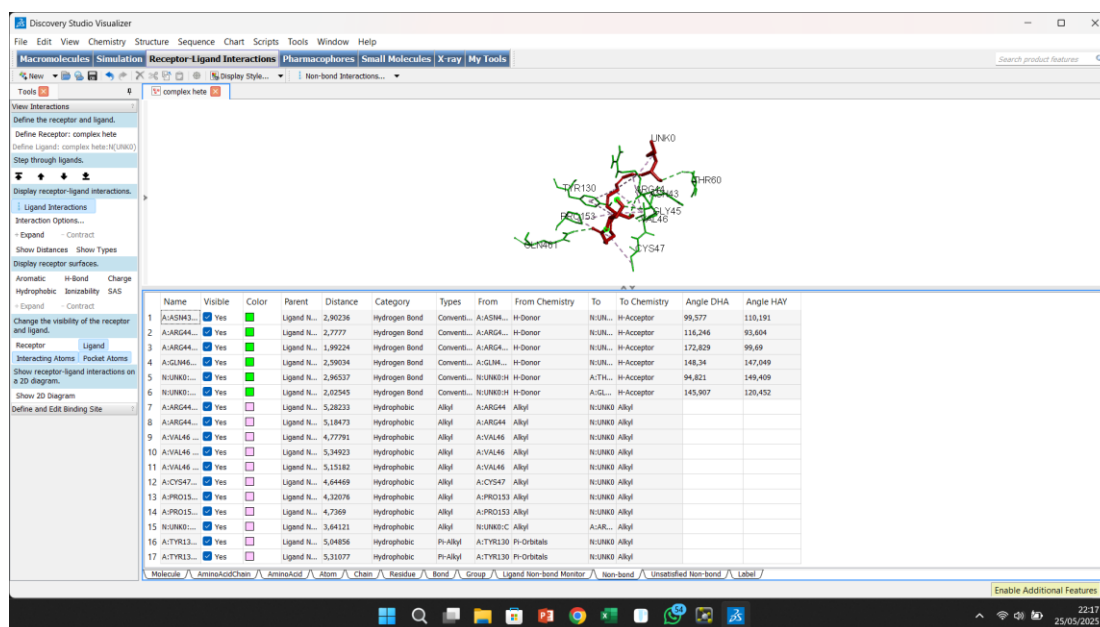
Use the Select tool to select one or more objects. Click to select an object, drag to select multiple objects.

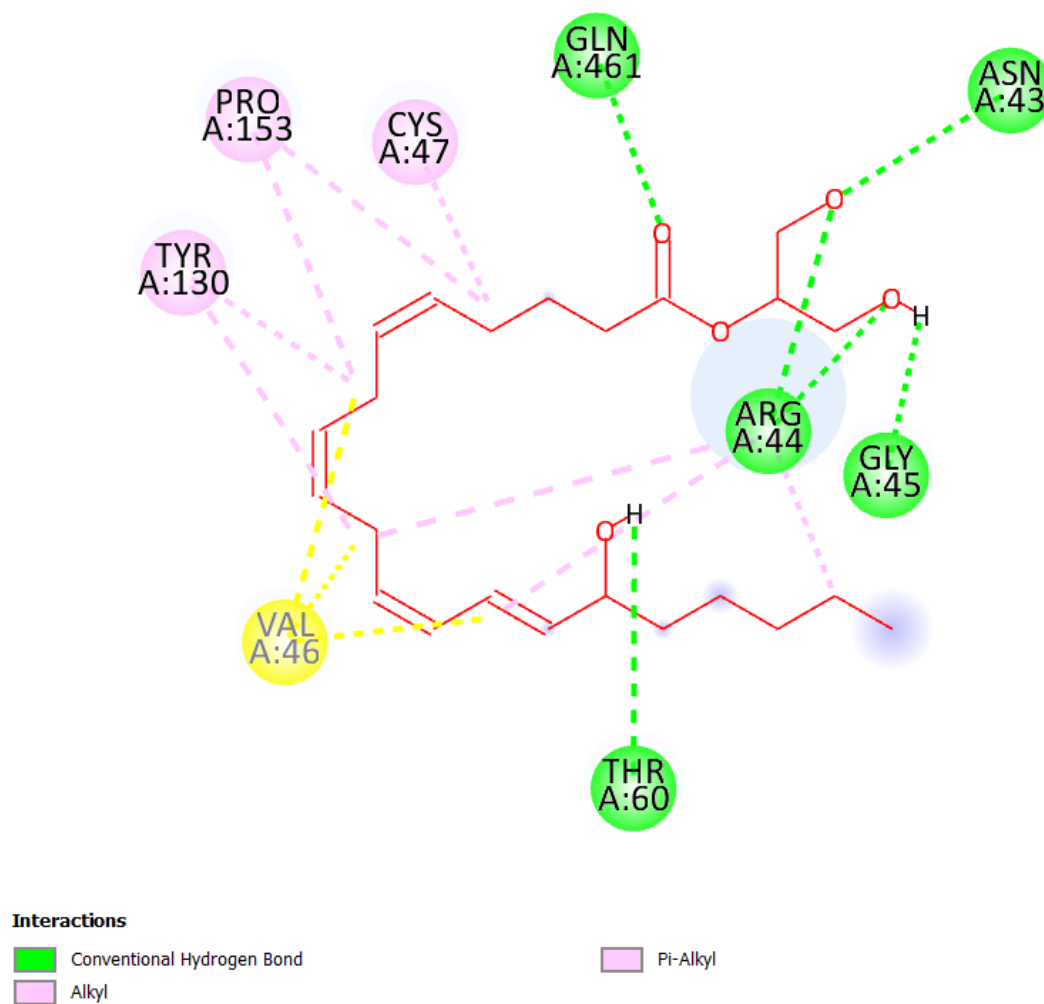
22:26 25/05/2025



UNIVERSITAS
MA CHUNG

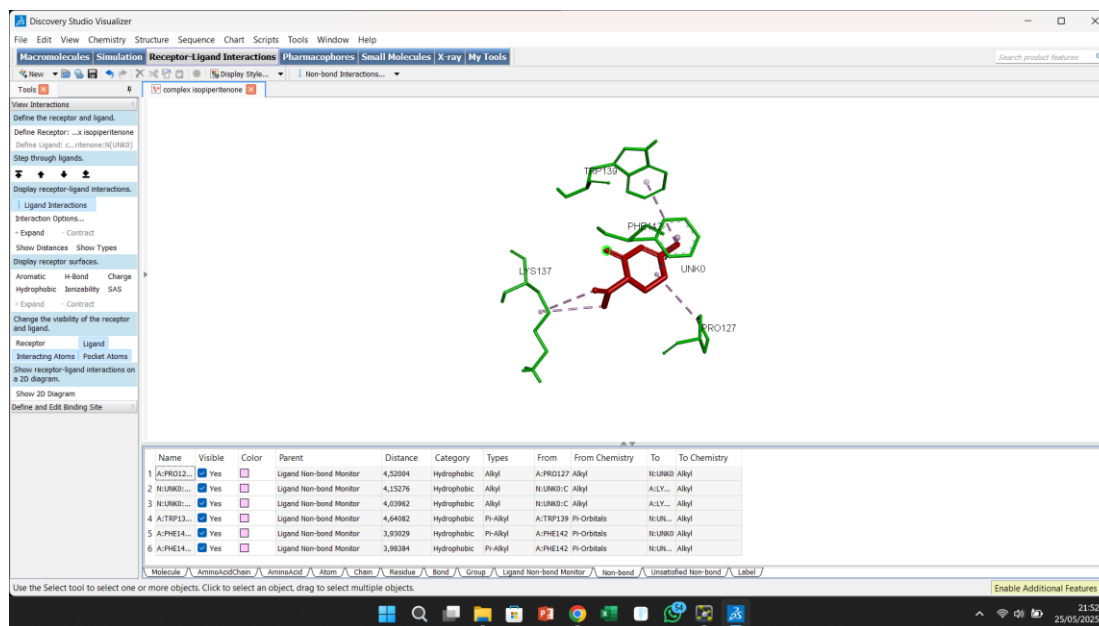
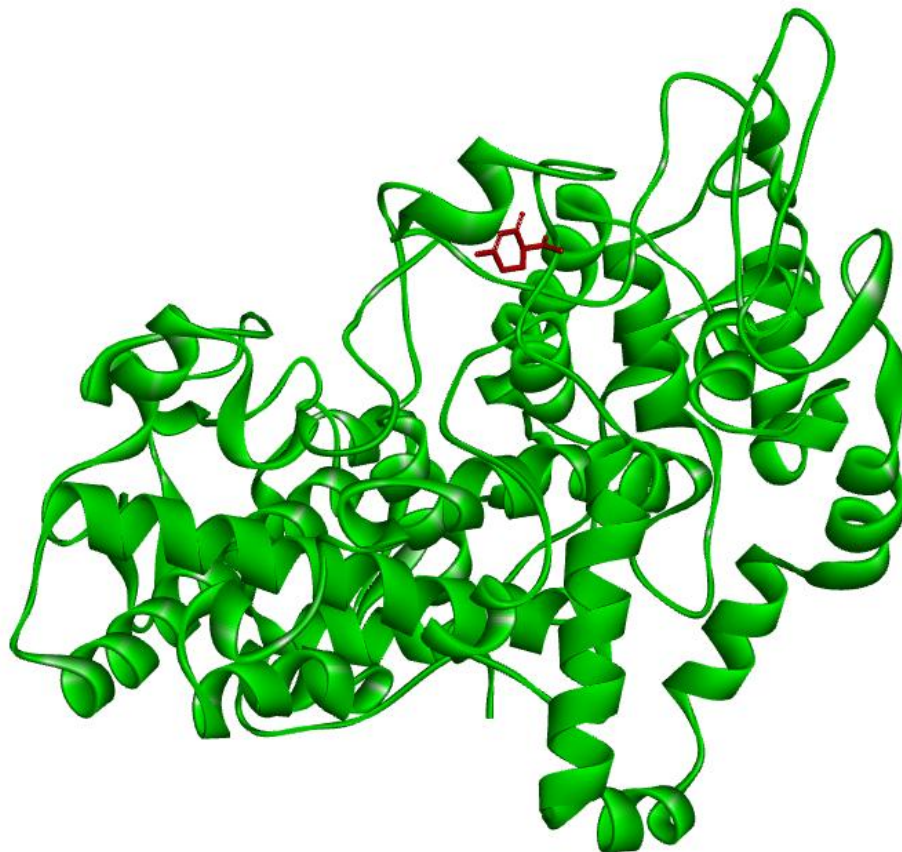
Lampiran K. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking *15-HETE-G*

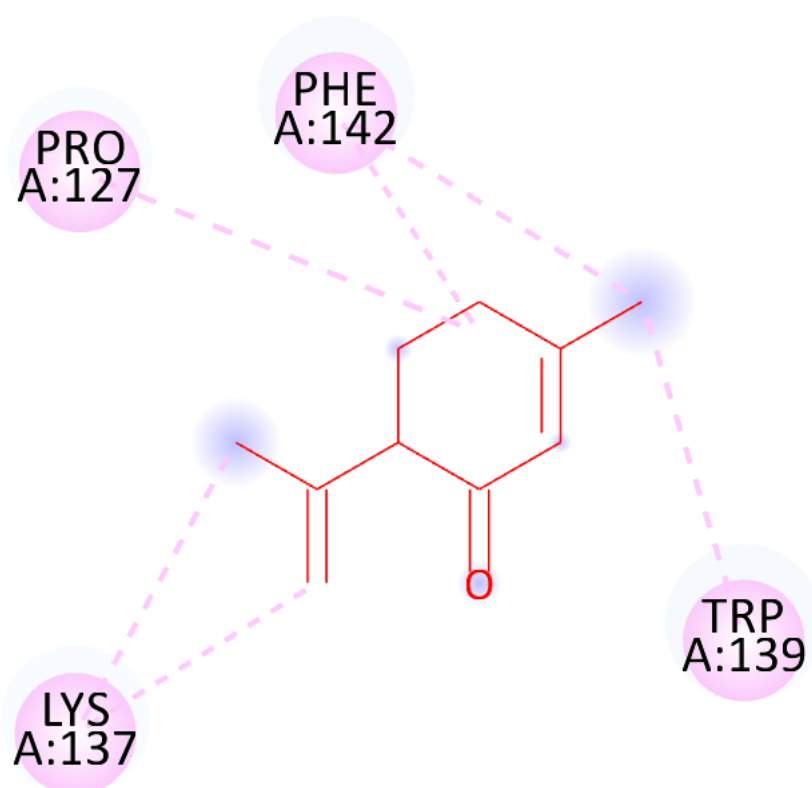





MA CHUNG

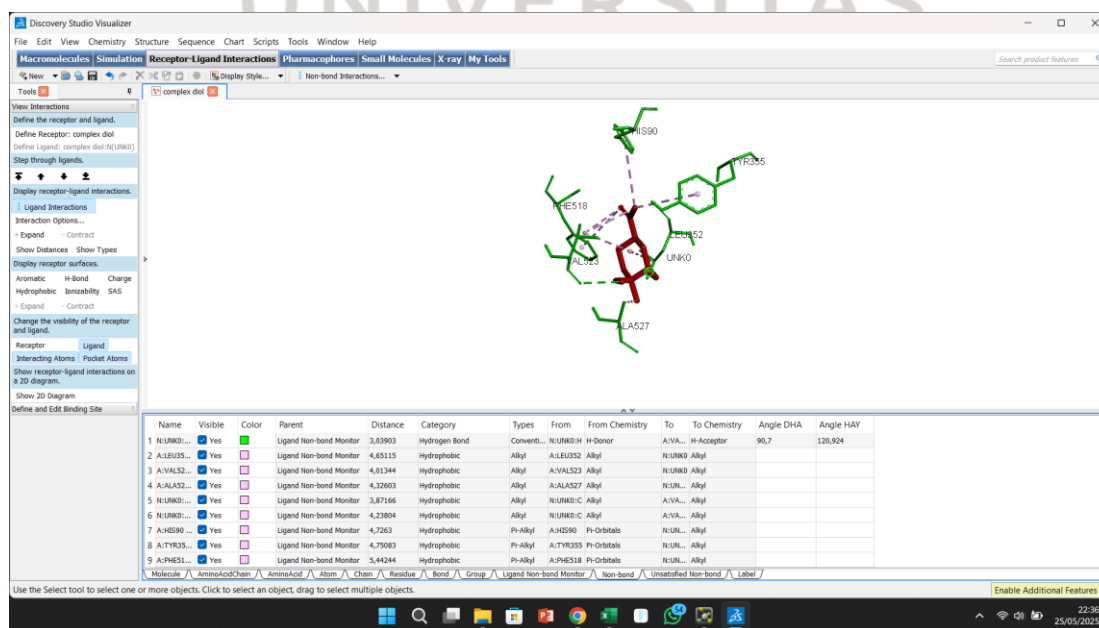
Lampiran L. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking (-)-Isopiperitenone

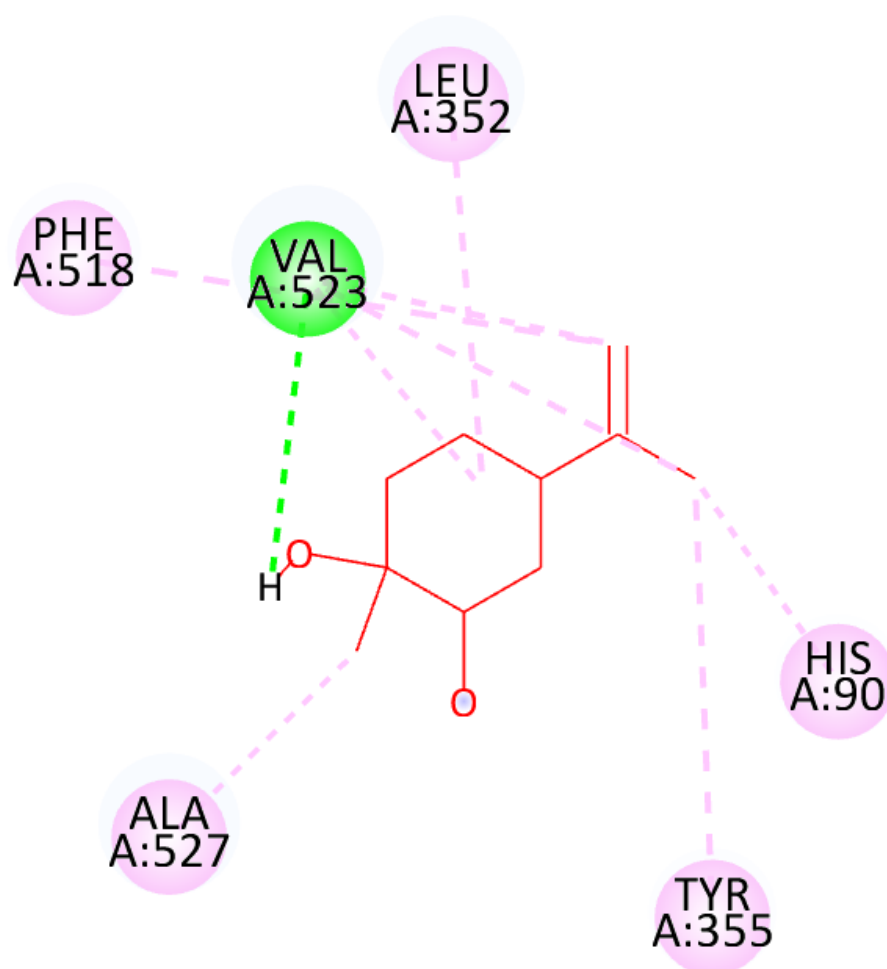


**Interactions** Alkyl Pi-Alkyl

MA CHUNG

Lampiran M. 2D dan 3D Hasil Molekular Doking *Limonene-1,2-diol*



**Interactions**

Conventional Hydrogen Bond

Alkyl

Pi-Alkyl

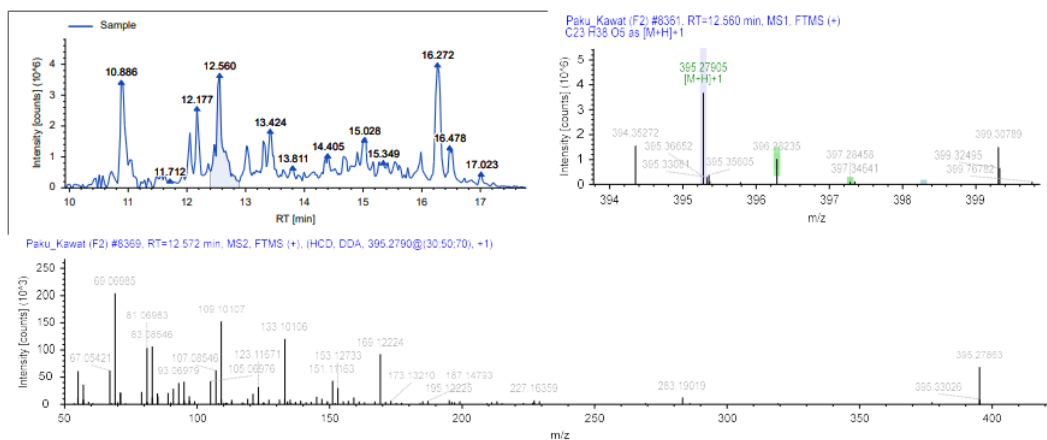
Lampiran N. hasil analisis *LC-HRMS*

Compounds
10-Apr-2025 1:30

File name: Paku_Kawat
Study: Paku_Kawat_Johanes



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	15-HETE-G	12.55	C23 H38 O5	394.27178	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

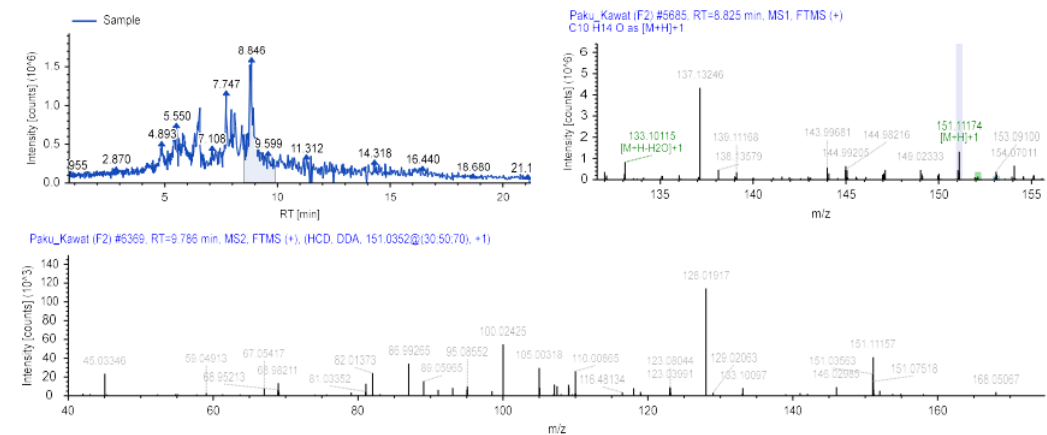


Compounds
10-Apr-2025 1:30

File name: Paku_Kawat
Study: Paku_Kawat_Johanes



Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	(-)-Isopiperitenone	8.82	C10 H14 O	150.10445	n/a



© Reported with Compound Discoverer 3.3

3

Compounds

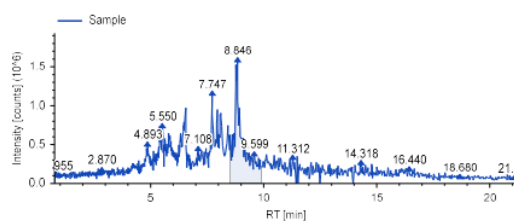
10-Apr-2025 1:30

File name: Paku_Kawat

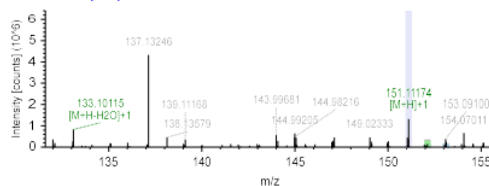
Study: Paku_Kawat_Johanes



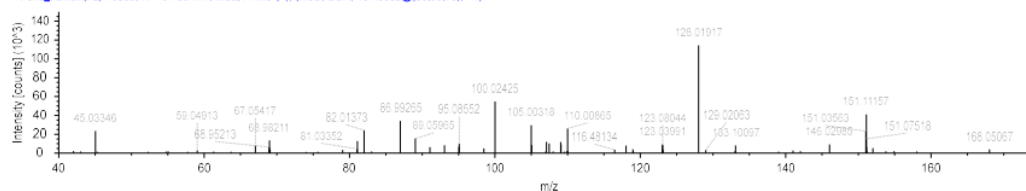
Structure	Name	RT [min]	Formula	Calc. MW	Group Areas
	(-)-Isopiperitenone	8.82	C10 H14 O	150.10445	n/a



Paku_Kawat (F2) #5685, RT=8.825 min, MS1, FTMS (+)
C10 H14 O as [M+H]⁺-1



Paku_Kawat (F2) #6369, RT=9.786 min, MS2, FTMS (+), (HCD, DDA, 151.0352@ (30.50.70), +1)



© Reported with Compound Discoverer 3.3

3

UNIVERSITAS
MA CHUNG